



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

HEMODYNAMICA GLOMERULAR EN
EL SINDROME NEFROTICO
EXPERIMENTAL INDUCIDO CON
AMINONUCLEOSIDO DE
PUROMICINA

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G A

P r e s e n t a

LAURA ROMERO URESTE

MEXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

RESUMEN

En este trabajo se caracterizan las alteraciones hemodinámicas glomerulares que ocurren en el síndrome nefrótico (SN) por aminonucleósido de muromicina (ANP) en el periodo en que la retención de sodio precede a la proteinuria, y se evalúa la participación de los cambios morfológicos que sufren los capilares glomerulares (CGs) y su relación con la caída del coeficiente de ultrafiltración (Kf) por medio de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) con captopril y la infusión de plasma hiperoncótico (PHO). Ambas maniobras producen relajación mesangial y aumento del Kf por el incremento en el área de filtración.

Se estudiaron 14 ratas, 3 días después de inducir el SN por la inyección subcutánea de ANP (15 mg/100 g); en 3 (SN/IEC) se administró captopril 3 días antes y 3 días después en el agua de beber (1.5 g/L); en 6 se infundió PHO al 15% (1 ml/100 g) durante 45 min antes de la micropunción para evaluar la hemodinámica glomerular (SN/PHO), las 5 restantes sirvieron como controles del SN y 8 ratas normales (C) como testigo. Después de los estudios de micropunción los riñones se perfundieron y se fijaron para la exploración con microscopía de luz y electrónica, la cual, sólo demostró aplanamiento y fusión de los podocitos en los tres grupos experimentales.

Los resultados de la hemodinámica glomerular mostraron una caída en el Kf en los grupos SN, SN/IEC y SN/PHO

respectivamente. Los valores sólo fueron estadísticamente significativos contra el grupo control. Los grupos SN/IEC y SN/PHO no fueron diferentes respecto al grupo SN. Esto sugiere que el captopril ni el PHO pudieron revertir las alteraciones hemodinámicas, indicando en primer lugar que la caída en el K_f por ANP es secundaria a cambios estructurales, probablemente relacionados con la fusión de podocitos que reducen la permeabilidad de la pared capilar. En segundo lugar que la retención de sodio en el SN no depende de angiotensina II (AII). Es probable que algún mecanismo regulado por el sistema nervioso simpático esté involucrado en la reabsorción de sodio y agua a nivel del túbulo colector o en las porciones terminales del túbulo distal.

S I M B O L O S

- A = Area de superficie disponible para la filtración.
AI = Angiotensina I.
AII = Angiotensina II.
AIII = Angiotensina III.
AA = Arteriola aferente.
AE = Arteriola eferente.
ADR = Adriamicina.
AMPc = Adenosín monofosfato cíclico.
ANP = Aminonucleósido de puromicina.
AVP = Arginina vasopresina.
AYG = Aparato yuxtaglomerular.
C = Concentración de proteínas totales.
CA = Concentración de proteínas en la arteriola aferente.
CE = Concentración de proteínas en la arteriola eferente.
CGs = Capilares glomerulares.
cm = Centímetros.
CP = Capilares peritubulares.
Din = Depuración de inulina.
ECA = Enzima convertidora de angiotensina I.
FF = Fracción de filtración.
FG = Filtración glomerular.
FG/n = Filtración glomerular por nefrona.
FP/n = Flujo plasmático por nefrona.
FPR = Flujo plasmático renal.
FS/n = Flujo sanguíneo por nefrona.
g = Gramos.
GMPc = Guanosín monofosfato cíclico.
h = Horas.

Hto = Hematocrito.

IEC = Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
I a angiotensina II.

Kf = Coeficiente de ultrafiltración.

L = Litro.

M = Molar.

MBG = Membrana basal glomerular.

ME = Microscopía electrónica.

mg = Miligramos.

mm Hg = Milímetros de mercurio.

P = Presión hidrostática.

PBF = Presión con bloqueo de flujo (stop-flow).

PCB = Presión hidrostática en la cápsula de Bowman.

PCG = Presión hidrostática en los capilares glomerulares.

PGE1 = Prostaglandina E1.

PGE2 = Prostaglandina E2.

PGs = Prostaglandinas.

PHO = Plasma hiperoncótico.

Pin = Concentración de inulina en plasma.

PNF = Presión efectiva de filtración.

PT = Presión hidrostática tubular (stop-flow).

PTH = Hormona paratiroidea.

Ra = Resistencia aferente.

Re = Resistencia eferente.

S = Permeabilidad de la pared capilar al agua.

SN = Síndrome nefrótico.

SNCM = Síndrome nefrótico de cambios mínimos.

SRAA = Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

TAM = Tensión arterial media.

TFin = Concentración de inulina tubular.

Tx = Tromboxanos.

μ = Micras.

Uin = Concentración de inulina en orina.

μ l = Microlitro.

V = Volúmen urinario.

π = Presión oncótica.

π A = Presión oncótica aferente.

π E = Presión oncótica eferente.

π CB = Presión oncótica en la cápsula de Bowman.

π CG = Presión oncótica en los capilares glomerulares.

π T = Presión oncótica tubular.

$\Delta\pi$ = Diferencia de presión oncótica transcapilar.

ΔP = Diferencia de presión hidrostática transcapilar.

INDICE

	<u>PAG.</u>
RESUMEN	I
SIMBOLOS.....	III
INDICE.....	VI
CAPITULO I - INTRODUCCION	1
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCION RENAL.....	1
1.2. HEMODINAMICA GLOMERULAR.....	9
1.2.1. Determinantes en la ultrafiltración glomeru	13
1.2.2. Diferencia de la presión hidrostática trans	14
capilar.....	
1.2.3. Diferencia de la presión oncótica transcapi	17
lar.....	
1.2.4. Coeficiente de ultrafiltración.....	18
1.2.5. Consecuencias de la alteración de los deter	18
minantes de la FG.....	
1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA....	21
1.3.1. Renina.....	24
1.3.2. Angiotensinógeno.....	26
1.3.3. Enzima convertidora de angiotensina I.....	26
1.3.4. Angiotensina II.....	27
1.4. SINDROME NEFROTICO.....	32
1.4.1. Aspectos clínicos y etiopatológicos.....	33
1.4.2. Aspectos morfológicos.....	34
1.4.3. Fisiopatología.....	35
1.4.4. Síndrome nefrótico experimental.....	43
CAPITULO II - OBJETIVOS	46
CAPITULO III - MATERIAL Y METODOS	48
3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	48
3.2. ESTUDIOS DE MICROPUNCIÓN.....	48

	<u>PAG.</u>
3.2.1. Preparación quirúrgica.....	48
3.2.2. Toma de muestras para micropunción.....	51
3.2.3. Medición de presión intratubular y capilar.....	53
3.3. MICROANÁLISIS DE LOS ESTUDIOS DE MICRO - PUNCIÓN.....	57
3.3.1. Fabricación de las micropipetas para el procesamiento de las muestras.....	57
3.3.1.1. Micropipeta de cuarzo.....	57
3.3.1.2. Micropipeta volumétrica.....	62
3.3.1.3. Micropipeta de transferencia.....	62
3.3.2. Determinación de inulina en las muestras tubulares.....	63
3.3.3. Determinación de proteínas plasmáticas..	65
3.3.4. Determinación de proteínas plasmáticas y urinarias.....	67
3.4. CALCULOS.....	68
3.5. ESTUDIOS MORFOLOFICOS.....	69
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	70
3.6.1. Prueba de homogeneidad de varianzas -- (Prueba de Bartlett).....	70
3.6.2. Análisis de varianza paramétrico.....	71
3.6.3. Análisis de varianza no paramétrico.....	72
CAPITULO IV - RESULTADOS	73
4.1. Hemodinámica glomerular	73
4.1.1. Efecto del aminonucleósido de piramicina	73
4.1.2. Efecto del captopril.....	79
4.1.3. Efecto de la infusión de plasma hiperon-	

	<u>PAG.</u>
cótico.....	80
4.2. ESTUDIOS MORFOLOGICOS.....	89
CAPITULO V - DISCUSION.....	97
CAPITULO VI - CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFIA	102

I - INTRODUCCION

1.1. ESTRUCTURA Y FUNCION RENAL.

La función de una célula no depende solamente de la captación de un constante suministro de nutrientes y de la eliminación de sus productos finales del metabolismo, sino también de la existencia de condiciones fisicoquímicas estables en el líquido extracelular que la rodea, al cual Claudio Bernard llamo "medio interno" constituido por ión hidrógeno, agua, sodio, cloruro, calcio, magnesio, sulfato y fosfato.

Una de las funciones más importantes del riñón es precisamente la regulación de ésta estabilidad. Además, desempeña otras funciones tan importantes como: a) excreción de productos metabólicos (urea, ácido úrico, creatinina, bilirrubina, productos terminales del catabolismo de la hemoglobina y los metabolitos de varias hormonas); b) la excreción de sustancias químicas extrañas (drogas, pesticidas, aditivos de los alimentos y sus respectivos metabolitos); c) la regulación de la presión arterial a través de varios mecanismos. El equilibrio del sodio es un factor crítico en la regulación del gasto cardiaco y en la función endócrina de los riñones, ya que estos liberan la hormona renina, componente central del sistema renina-angiotensina-aldosterona el cual juega un papel muy importante en la regulación de la presión arterial; d) la regulación de la producción de eritrocitos por la hormona eritropoyetina renal; e) la regulación de

la actividad de la vitamina D y f) la síntesis de glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores (gluconeogénesis) durante el ayuno prolongado para finalmente liberarla a la sangre (1).

La unidad funcional de riñón es la nefrona, la cual consiste de un glomérulo (formado a su vez por un manojo de asas capilares interconectadas denominados capilares glomerulares (CGs)), la cápsula de Bowman (dentro de la que sobresalen los CGs) y un túbulo que se extiende a partir del glomérulo y que presenta una segmentación definida a lo largo de su trayectoria (Fig. 1) (1).

Los CGs están formados por tres capas: a) el endotelio capilar, ampliamente fenestrado por poros, b) la membrana basal glomerular (MBG) constituida por glucoproteínas y mucopolisacáridos, y c) una capa de células epiteliales o podocitos, que presentan un gran número de extensiones o pies enclavados en la MBG y cubiertos por una espesa capa de sustancias extracelulares polianiónicas (glucosialoproteínas) (Fig. 2) (1, 2). Existen endiduras entre los pies adyacentes de los podocitos a través de los cuales el filtrado que atraviesa las células endoteliales y la MBG pasa al interior del espacio de Bowman, aunque por la presencia de glucosialoproteínas dichas endiduras no ofrecen vías de paso completamente abiertas (Fig. 2) (2, 3). Debido a la morfología y composición química de los CGs la barrera

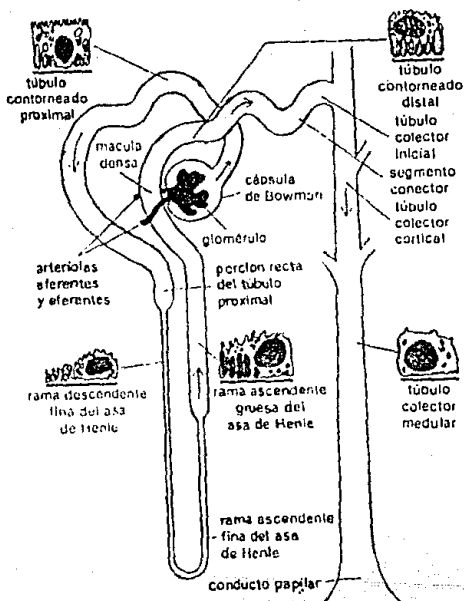


FIG. 1 - Estructura básica de una nefrona, constituida por una unidad de filtración llamada glomérulo y por un túbulo. (Ref. 1).

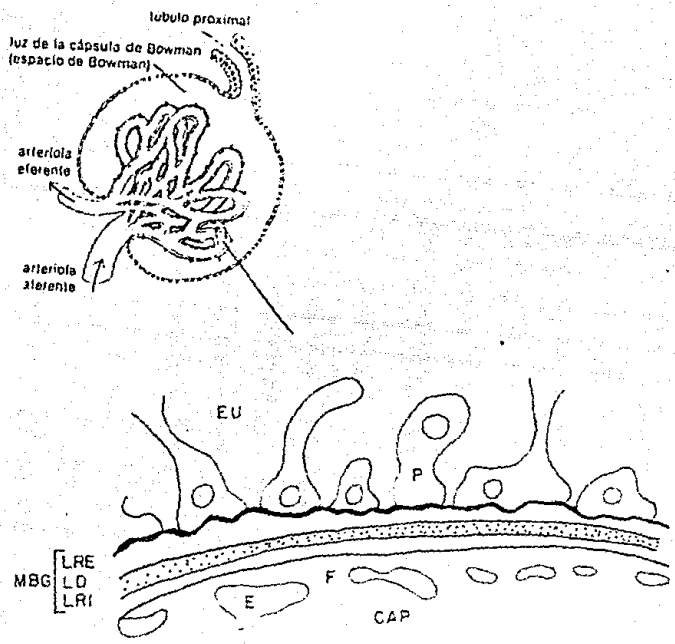


FIG. 2 - Anatomía de los capilares glomerulares.
EU=espacio urinario, P=podocitos, MBG=membrana basal glomerular, LRI=lámina rara interna, LRE=lámina rara externa, LD=lámina densa, E=endotelio capilar, F=fenestraciones o poros, CAP=luz capilar. (Ref. 1).

para la filtración es altamente selectiva al tamaño y a la carga molecular restringiendo el paso de las proteínas, principalmente albúmina y otras macromoléculas y ofreciendo poca resistencia a la filtración del agua y pequeños solutos (4 - 8). Sin embargo, los factores hemodinámicos como el flujo renal (FPR) y la presión capilar glomerular (PCG) también están asociados con la filtración glomerular (FG) (9). En resumen, el paso transcápilar de plasma, agua y proteínas en los CGs está regulado por un número de factores que incluye: a) la velocidad de flujo plasmático glomerular; b) el balance neto entre las presiones que favorecen (presión hidrostática $\langle P \rangle$, ejercida por el plasma y el agua) o que impiden la filtración (presión oncótica $\langle \pi \rangle$ ejercida por las proteínas plasmáticas) en los CGs; c) el tamaño molecular, la carga y la configuración de las partículas que son filtradas; d) las propiedades intrínsecas, bioquímicas y biofísicas de la pared capilar glomerular y e) la hemodinámica glomerular. Todos estos factores mantienen un cierto balance y regulan la homeostásis glomerular previniendo la fuga de proteínas al espacio urinario. En el caso contrario, el desbalance de estos factores conducirá al paso transcápilar de las proteínas originando la "proteinuria" (10).

La sangre entra a cada riñón por una arteria renal, que se divide en ramas más pequeñas, dando origen a una serie de arteriolas aferentes (AA) paralelas entre sí,

cada una de las cuales origina un glomérulo. Los CGs a su vez se recombinan para formar las arteriolas eferentes (AE), por las que sale la sangre y pasa a los capilares peritubulares (CP). Estos vuelven a juntarse para formar los canales venosos a través de los cuales la sangre abandona el riñón (Fig. 3).

El aparato yuxtaglomerular (AYG) es una estructura especializada ubicada en la pared de la AA y poco extendida hacia la AE en el punto donde estos vasos se encuentran cercanos al hilio del glomérulo (Fig. 4). El AYG contiene células especializadas, algunas de ellas son granulares (células mioepiteloides o yuxtaglomerulares) que secretan renina. La liberación de la renina de las células mioepiteloides ocurre en dirección del lumen tubular y del intersticio, para después alcanzar la circulación sistémica por vía linfática. La parte del túbulo distal que entra en contacto con el AYG se le conoce como mácula densa (Fig. 4). Este sistema se cree que proporciona un mecanismo por medio del cual la liberación de renina es controlada por medio de una señal del fluido tubular distal (11, 12).

La formación de orina comienza con la filtración del plasma prácticamente libre de proteínas a través de los CGs hacia la cápsula de Bowman. La orina que entra al final del proceso a la pelvis renal es diferente del filtrado glomerular, ya que al pasar a través de las diferentes porciones del túbulo, su composición se va

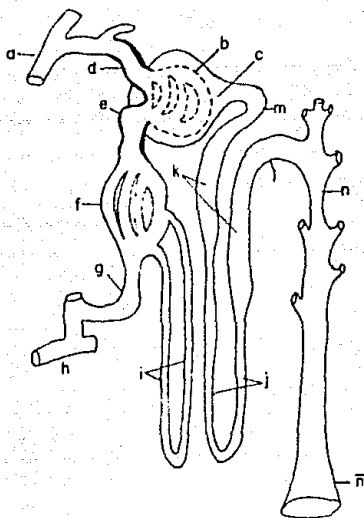


FIG. 3 - La nefrona y sus partes. a) Arteria arciforme; b) Glomérulo; c) Cápsula de Bowman; d) Arteriola aferente; e) Arteriola eferente; f) Capilares peritubulares; g) Vénula; h) Vena arciforme; i) Vasos rectos; j) Segmentos delgados del asa de Henle; k) Segmentos gruesos del asa de Henle; l) Túbulo distal; m) Túbulo proximal; n) Túbulo colector; ñ) Pelvis renal. (Ref. 2).

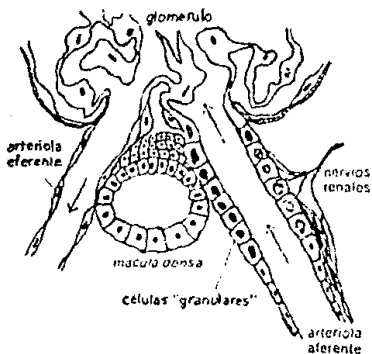


FIG. 4 - Aparato Yuxtaglomerular. Las células granulares secretan renina y se cree que también funcionan como baroreceptores. Las terminaciones nerviosas provienen del sistema nervioso simpático. (Ref. 1).

alterando. Este cambio ocurre por dos procesos generales: la reabsorción y la secreción tubular. Ya que el túbulo está íntimamente relacionado con los CP, se puede permitir la transferencia de materiales entre el plasma contenido en ellos y la luz tubular. Por lo tanto, cuando la dirección del transporte va desde la luz tubular hacia el plasma del CP, el proceso se llama reabsorción tubular. El movimiento en la dirección opuesta se llama secreción tubular (Fig. 5). Finalmente, se dice que una sustancia es excretada cuando ésta ha aparecido en la orina final (1).

1.2. HEMODINAMICA GLOMERULAR.

El glomérulo renal de los mamíferos es un complejo microvascular constituido por elementos endoteliales, epiteliales y mesangiales. Las interacciones coordinadas entre dichos elementos y las fuerzas físicas actuando sobre ellas hacen posible la separación de un pequeño ultrafiltrado del gran volumen de plasma que constantemente fluye a través de este complejo capilar. La hemodinámica glomerular se refiere a la biofísica de las fuerzas interactuantes mencionadas, que suceden en la red capilar glomerular.

La técnica conocida con el nombre de "depuración plasmática" desde hace muchos años se ha utilizado para evaluar la función renal tanto en la clínica como en la

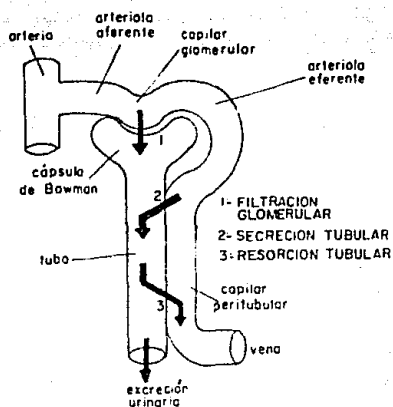


FIG. 5 - Componentes básicos de la función renal. (Ref. 1).

investigación. La depuración plasmática de una sustancia es el volumen de plasma que tendría que pasar a través de las nefronas en determinado tiempo para proporcionar la cantidad de dicha sustancia presente en la orina. Esta a su vez es una medida de la FG, porque el volumen de plasma completamente depurado de dicha sustancia es igual al volumen de plasma filtrado.

Las sustancias utilizadas para la cuantificación de la depuración plasmática deben llenar los siguientes requisitos:

- 1) Que sea libremente filtrable por el glomérulo.
- 2) Que no se reabsorba.
- 3) Que no secrete.
- 4) Que los túbulos no la sintetizen.
- 5) Que los túbulos no la desdóblen.

El polisacárido de fructosa inulina, llena por completo tales requisitos, aunque su uso es más frecuente en la investigación debido a que no existe en forma normal en el organismo, y debe administrarse por vía intravenosa a un ritmo continuo de infusión durante varias horas (13). En la práctica clínica generalmente se utiliza la creatinina (sustancia endógena formada a partir de la creatina del músculo), que se libera hacia la sangre a una velocidad constante, y su concentración sanguínea cambia muy poco durante un período de 24 h (13). Debido a que

una pequeña porción de la creatinina sufre reabsorción tubular la determinación de la FG no es muy exacta, por esta razón recientemente se utiliza el iodotalamato marcado con ^{131}I para medir la FG.

En 1938 Richard & Walker (14), fueron los primeros que utilizaron la técnica de micropunción para poder proporcionar información acerca del mecanismo de filtración glomerular. Richard & Walker lograron extraer fluido del espacio de Bowman y lo compararon con el plasma que entraba al riñón por la arteria renal. De este análisis se derivaron varias piezas de información:

1. Las macromoléculas tales como la albúmina y la globulina eran excluidas del espacio de Bowman y del túbulo proximal.
2. El volumen de filtración era grande.
3. Los constituyentes del fluido del espacio de Bowman eran esencialmente idénticos a los de la fase acuosa del plasma y que existían en concentraciones similares.

Estos hallazgos proporcionaron evidencia de que la FG es el primer paso en la formación de la orina. Desde entonces esta técnica de micropunción ha sido un pilar para la investigación en la fisiología renal. Esta consiste en la inserción de una micropipeta en un segmento de la nefrona y la extracción de líquidos para su análisis, asimismo, para medir presiones, perfundir

túbulos y realizar otras manipulaciones en nefronas aisladas in situ.

Recientemente, se ha desarrollado una técnica para perfundir segmentos aislados de una sola nefrona in vitro, haciendo posibles muchos estudios que previamente sólo se podían hacer con micropunción. Esta técnica sólo es aplicable a las nefronas corticales superficiales ya que pueden observarse a través de la superficie del riñón. Por lo que ha sido uno de los principales obstáculos para estudiar las estructuras medulares así como la heterogeneidad funcional de las nefronas.

1.2.1. Determinantes en la ultrafiltración glomerular.

La FG depende de la presión neta de filtración (PNF), que corresponde a la suma algebraica de las presiones hidrostáticas y coloidosmóticas actuando a través de los CGs. Las fuerzas que inducen la filtración son, la presión hidrostática del capilar glomerular (PCG) y la presión oncótica en la cápsula de Bowman (CB), mientras que las fuerzas que se oponen son la presión hidrostática en la cápsula de Bowman (PCB) y la presión oncótica en el capilar glomerular (CG), producida por las proteínas plasmáticas. Debido a que el filtrado glomerular es casi un ultrafiltrado del plasma, la concentración de las proteínas en la cápsula de Bowman es extremadamente baja y

por lo tanto $\Delta\pi$ es igual a π_{CG} (15-17). Sin embargo, también la permeabilidad de la pared capilar (S) al agua y el área de superficie disponible para la filtración (A) son factores importantes en la FG (13, 14). El producto de estos dos últimos factores se define como Kf o coeficiente de ultrafiltración. De acuerdo con esto:

$$FG = Kf \times PNF$$

$$FG = Kf (\Delta P - \Delta\pi)$$

$$FG = S \times A < (PCG - PCB) - (\pi_{CG} - \pi_{CB}) >$$

$$FG = S \times A < (PCG - PT) - (\pi_{CG} - \pi_T) >$$

1.2.2. Diferencia de la presión hidrostática transcápilar.

Los avances tecnológicos en micropunción, se basan en los estudios realizados en la cepa de ratas Munich-Wistar. Esta cepa se caracteriza por poseer glomérulos sobre la superficie cortical renal facilitando la medición directa de la PCG por medio de la aplicación de la técnica de "servo-null" (18, 19). El sistema básico del servo-null se explica claramente en la parte de material y métodos. Con esta técnica se han encontrado valores de PCG de aproximadamente 45 mm Hg (15,20 - 24).

Por otra parte, utilizando el método de presión a flujo detenido (stop-flow) se han estimado valores más bajos y variables de aproximadamente 35 a 90 mm Hg (9,25). En esta técnica se supone que cuando el flujo de líquido a

lo largo del túbulo es obstruido con un bloque de aceite, la presión dentro del túbulo aumentará y eventualmente alcanzará un valor suficiente para evitar que la filtración continúe (26). El valor de la presión tubular (PT) así medido, se denomina presión de "stop-flow" o presión con flujo detenido. En consecuencia, la concentración de proteínas sistémicas (C) y la presión oncótica (π_A) no aumentará a lo largo del capilar glomerular y por lo tanto, la filtración habrá sido prevenida. De esta forma la presión hidráulica dentro del glomérulo se calcula indirectamente sumando la presión del stop-flow (PT) y la presión oncótica intracapilar (π_{CG}), que al igualarse al valor de PCG la fuerza neta favoreciendo la filtración se reducirá a cero. Y por lo tanto, se asume que la presión oncótica intracapilar es equivalente a π_A (19, 25, 27).

Tomando en cuenta la medición directa de la PCG junto con las mediciones de las otras presiones para la estimación indirecta de la misma, es posible evaluar la presión neta de ultrafiltración en función de la distancia a lo largo de la red capilar glomerular. El valor de PCG se estima que es la misma en los extremos aferente y eferente, ya que la disminución de la presión a lo largo de la red debido al flujo plasmático (FP/n) es extremadamente baja y por lo tanto, ΔP se mantiene constante a lo largo del capilar glomerular (Fig. 6) (27). Como se puede observar en la figura 6 el perfil de $\Delta \pi$ no

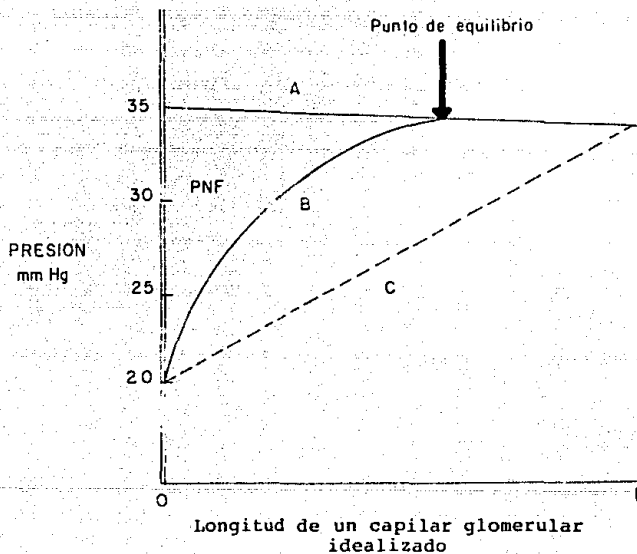


FIG. 6 - Perfiles de las presiones hidrostáticas y oncótica a lo largo de un capilar glomerular idealizado. a) Gradiente de presión hidrostática transcapilar $P = P_{CG} - P_{CB}$; b) Gradiente de presión oncótica transcapilar $\Delta\pi = \pi_{CG} - \pi_{CB}$; c) PNF = Presión neta de filtración. (Ref. 27).

se comporta de una manera lineal. Esto se debe a que en el extremo aferente, es más rápida la filtración y por lo tanto C y π aumentarán también rápidamente.

Debido a que π sólo puede ser calculada en sus extremos aferente y eferente no se ha podido describir una curva completa de $\Delta\pi$, y por lo tanto su comportamiento en la figura 6 puede ser uno de tantos perfiles posibles y no se puede asegurar un solo valor para PNF. Por ésta razón, sólo se puede tomar un valor máximo de PNF cuando se asume que $\Delta\pi$ aumenta de una manera lineal a lo largo del capilar glomerular (curva punteada) y que sólo es igual a ΔP en el extremo más eferente y PNF dependerá del sitio de partida de la verdadera curva de $\Delta\pi$ y el sitio exacto en el cual el equilibrio de filtración es alcanzado a lo largo del capilar glomerular.

1.2.3. Diferencia de la presión oncótica transcápilar.

Las mediciones de la concentración de proteínas totales (C) en el extremo aferente (CA) y eferente (CE), revelan que C aumenta conforme se incrementa el flujo sanguíneo a lo largo de la red capilar, y esto es una consecuencia del hecho de que el ultrafiltrado está casi libre de proteínas. Los valores calculados en condiciones normales para la CA y la CE son de 5-6 g% y 8-9 g% respectivamente (27). La presión oncótica calculada a partir de la CA y de la CE por medio de una ecuación

matemática, aumenta de aproximadamente 15 a 20 mm Hg en el extremo aferente (πA) a 35 o 40 mm Hg en el eferente - (πE) (28). En vista de que la PCG es relativamente constante y por lo tanto de ΔP a lo largo del glomérulo, la PNF disminuye de un valor de más o menos 13-24 mm Hg al inicio del glomérulo hasta casi cero al final del mismo (Fig. 6). Esto es, aumenta a un valor en el extremo eferente en el cual se iguala y opone a ΔP , previniendo así la filtración. La equivalencia de ΔP y $\Delta \pi$ se denomina "equilibrio de presión de filtración" (Fig. 6)(27). Este término fue introducido por Smith y col. en 1940 (29).

1.2.4. Coeficiente de ultrafiltración.

Los valores promedio de Kf son de aproximadamente 0.08 ml/(seg x mm Hg). Se ha observado también que permanece casi sin cambio aún cuando el flujo aumenta hasta el doble (30). No obstante, aunque existe cierta insensibilidad del Kf a los cambios del FP/s, en condiciones de lesión glomerular primaria puede ser menor de lo normal (31). Diversos mediadores químicos determinan la concentración de las células del mesangio, lo que produce una reducción del área de superficie del glomérulo y por lo tanto también en el Kf. Esta reducción a su vez tiende a disminuir la FG.

1.2.5. Consecuencias de la alteración de los determinantes de la FG.

Los cambios en la FG pueden ocurrir como resultado de alteraciones en el Kf, en la PNF o en ambos factores. Los cambios en la PNF pueden ocurrir a su vez por alteraciones en el ΔP , en el πA y/o en el FP/n. Del mismo modo, los cambios en el Kf pueden ser provocados por alteraciones en sus determinantes (S y A) (27). En la tabla 1 se resumen las consecuencias de la alteración de los determinantes de la FG sobre ella misma.

La FG es altamente dependiente del FP/n, ya que ambos aumentan o disminuyen casi proporcionalmente. Esta observación se ha probado en innumerables investigaciones realizadas utilizando sustancias vasodilatadoras (glucocorticoides, glucagon, hormona del crecimiento, dopamina, aminoácidos, etc.) y vasoconstrictoras (AII, AVP, PTH, Tx).

Las sustancias vasodilatadoras elevan el FP/n que se asocia con una caída en las resistencias arteriolas aferente (RA) y eferente (RE). Este cambio en el FP/n provoca a su vez que se incrementen la FG/n y por lo tanto la FG total. De manera opuesta, las sustancias vasoconstrictoras disminuyen el FP/n y aumentan la PCG que se asocia a un incremento en las resistencias pre y postglomerulares. Estos cambios a su vez provocan que la FG y la FG/n también disminuyan.

El diámetro luminal de las arteriolas de conejo

DETERMINANTES

FACTORES PRINCIPALES QUE TIENDEN A INCREMENTAR LA MAGNITUD DE LOS DETERMINANTES DIRECTOS.

↑ Kf	<p>↑ Superficie glomerular debido a la relajación de las células mesangiales glomerulares.</p> <p>R = ↑ FG</p>
↑ PCG	<p>↑ La presión renal arterial.</p> <p>↓ RA (dilatación aferente).</p> <p>↑ RE (constricción eferente).</p> <p>R = ↑ FG</p>
↑ PCB	<p>↑ Presión intratubular debida a la obstrucción del túbulo o del sistema urinario extrarenal.</p> <p>R = ↓ FG</p>
↑ π CG	<p>↑ Presión oncótica del plasma sistémico.</p> <p>↓ Flujo total de plasma renal.</p> <p>R = ↓ FG</p>

TABLA 1 - Resumen de los determinantes directos de la FG y de los factores que los influyen. La reversión de todas las flechas representa la disminución de la magnitud de Kf, PCG, PCB y π CG.

perfundidas con AII y norepinefrina se reducen de manera importante (32, 33). La estimulación o la activación refleja de los nervios renales causan vasoconstricción arteriolar, originando una disminución del FP/n y en consecuencia una caída de la FG (34, 35). El Kf también se reduce notablemente lo que contribuye a disminuir la FG. Se ha postulado que el Kf disminuye por la contracción de las células mesangiales glomerulares, ya que se han encontrado miofilamentos contráctiles en el interior de estas células (36-39). Estudios recientes han demostrado que el glomérulo posee receptores específicos para un gran número de sustancias vasoactivas, e incluso por sí mismo es capaz de realizar la biosíntesis de novo de varias de ellas (AMPC, GMPc, PGs y AII) en respuesta a varios estímulos hormonales (40, 41).

1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un complejo hormonal de enzimas, proteínas y péptidos que participan en forma importante en la regulación de la presión arterial y el balance de líquidos y electrolitos (42, 43). Este consiste de las enzimas renina, enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y angiotensinasas; de los péptidos angiotensina I (AI), angiotensina II (AII) y angiotensina III (AIII); de la globulina alfa 2 (angiotensinógeno) y de la hormona esteroide aldosterona (Fig. 7). El SRAA puede activarse principalmente cuando

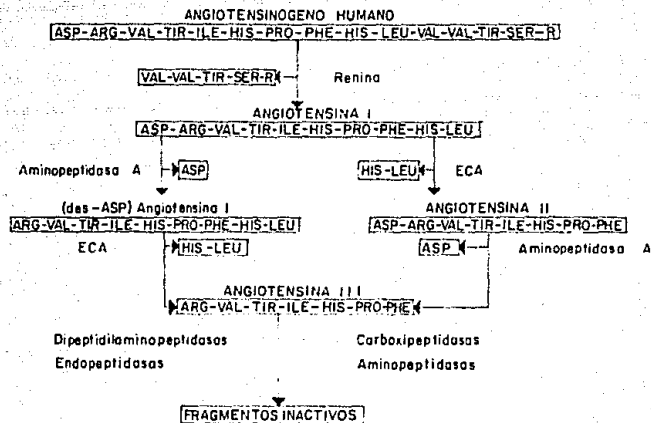


FIG. 7 - Bioquímica del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.
 (Ref. 145).

el volumen circulante y/o la concentración de sodio en el túbulo distal disminuyen de manera importante, provocando una caída en la presión arterial. Este reflujo es detectado por las células granulares del AYG, que responden liberando hacia la sangre la hormona renina. En la sangre, la renina actúa sobre el sustrato angiotensinógeno (sintetizado principalmente en el hígado), para producir el decapeptido AI contenido en el extremo amino del sustrato. Este tiene poca o nula actividad biológica y es transformado al octapeptido AII por la acción de la ECA. Esta enzima es una dipeptidil dipéptido hidrolasa que remueve en un paso los aminoácidos His-Leu del extremo carboxilo de la AI. Por otra parte, la aminopeptidasa A actúa sobre la AII removiendo el ácido aspártico de su extremo amino formando así el heptapeptido AIII. La AII y la AIII interactúan con receptores específicos sobre tejidos blanco, estimulando la contracción de las células musculares lisas vasculares y la secreción de aldosterona en la zona glomerulosa localizada en la corteza suprarrenal. La aldosterona a su vez estimula la reabsorción de sodio y agua en el túbulo distal y en los conductos colectores reestableciendo el volumen circulante y la presión arterial sistémica (Fig. 7) (44, 45). Finalmente las angiotensinasas son un grupo de enzimas hidrolíticas (aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas) que degradan a las angiotensinasas en sus correspondientes aminoácidos (F. . 7). La concentración plasmática de renina está regulada por una

multitud de factores (46).

1.3.1. Renina.

La renina es producida en las células musculares lisas modificadas (principalmente con hiperplasia) de la AA del glomérulo renal denominadas células yuxtaglomerulares (47). En estas células la renina es almacenada en gránulos intracelulares de los cuales es liberada por medio de un proceso de degranulación que ocurre cuando los gránulos de renina se fusionan a la membrana celular y vacían su contenido al torrente sanguíneo. Sin embargo, antes de que esto suceda, la renina pasa a través de una serie de procesos moleculares (Fig. 8) (48, 49). Inicialmente, ésta es sintetizada como una preproteína, cuyo fragmento pre es rápidamente removido por el retículo endoplásmico liberando la prorrenina. Esta, a su vez es almacenada en los gránulos, en donde sufre una maduración y activación por ruptura proteolítica y glucosilación a renina (50, 51).

Los principales mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina en el riñón son: a) por medio de un barorreceptor intrarrenal que responde a cambios en la presión sanguínea; b) por la concentración de sodio que pasa por el segmento del túbulo distal a nivel de la mácula densa; c) por el sistema nervioso simpático y las

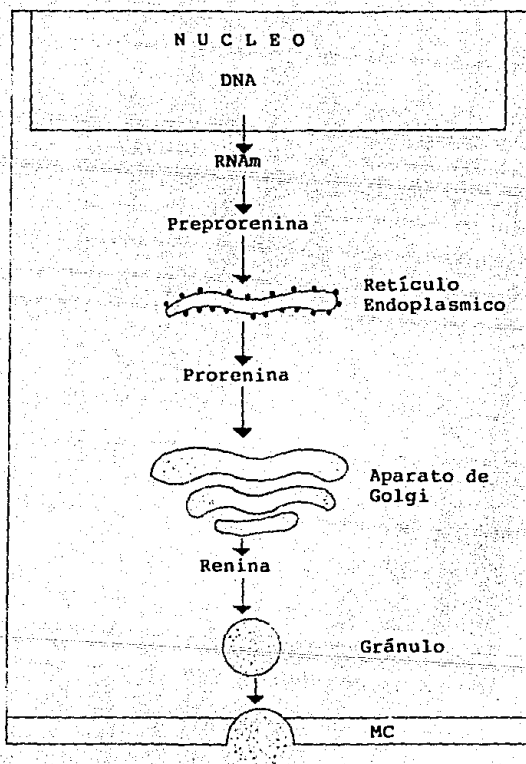


FIG. 8 - Esquema de la biosíntesis y secreción de la hormona renina. MC=Membrana Celular.

catecolaminas circulantes; d) por otros factores hormonales como AII, PGs y esteroides y; e) por otros electrolitos plasmáticos como Ca, K, etc. (11, 46, 52).

1.3.2. Angiotensinógeno.

La concentración plasmática de esta alfa-2-globulina es de 4-7 mg/ ml (53). Se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también existen evidencias de que puede ser sintetizado en el riñón y en el cerebro (54). Los estrógenos, los glucocorticoides, la insulina, las PGs, la AII y la binefrectomía, estimulan la secreción de angiotensinógeno, mientras que la tiroidectomía y la adrenalectomía la disminuyen (55 - 57).

1.3.3. Enzima convertidora de angiotensina I.

La ECA aparece durante la diferenciación temprana del túbulo proximal y en el endotelio de los CGs desde los estadios más tempranos de la diferenciación del riñón (58). Esta enzima es una metaloproteína que es inhibida con EDTA y es dependiente de cloruros. Se encuentra presente en casi todos los órganos y líquidos corporales de los mamíferos (48, 58, 59). Se han desarrollado inhibidores específicos y potentes de esta enzima en base a sus propiedades y mecanismos de acción (60). Estos agentes actúan suprimiendo la respuesta vasopresora de AII o revirtiendo la hipertensión experimental dependiente de

renina (61, 62). Uno de los inhibidores más utilizados en los humanos en el campo de la investigación, es el captopril. Pruebas clínicas han demostrado que la administración oral de captopril produce una disminución en la presión sanguínea, la cual generalmente se asocia a una caída de la concentración de AII y aldosterona plasmática (Fig. 9) (60 - 64). Sin embargo, el captopril no tiene sólo este mecanismo de acción, ya que también estimula la biosíntesis de PGE2 que tiene acción vasodilatadora (Fig. 9) (63).

Ng y Vane (64) observaron que la AI se convertía en AII durante su paso a través de la circulación pulmonar. Estudios posteriores mostraron que la ECA es un componente del endotelio vascular, localizado a nivel de la superficie luminal de la membrana plasmática, facilitando la conversión de AI a AII (65 - 67).

1.3.4. Angiotensina II.

La AII es uno de los reguladores de la excreción de sodio más poderosos del cuerpo, que opera a través de mecanismos extrarenales, tales como la estimulación de la secreción de aldosterona, así como también por medio de mecanismos intrarenales. Muchas evidencias sugieren que las acciones intrarenales de la AII son cuantitativamente más importantes que los cambios en la secreción de aldosterona en la regulación del balance de Na y de la

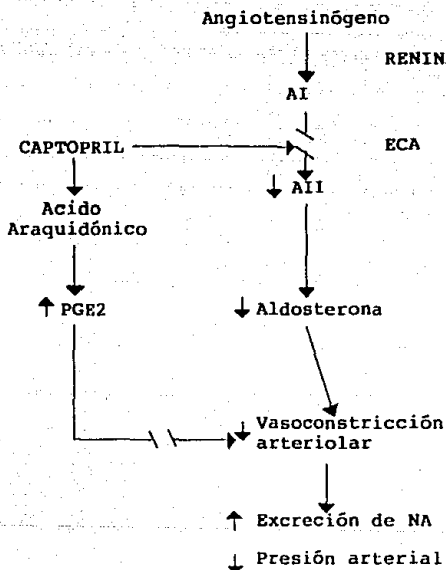


FIG. 9 - Acciones fisiológicas del captopril sobre el SRAA y la producción de prostaglandinas vasodilatadoras, promoviendo aumento en la excreción de sodio y disminución de la presión arterial. (Ref. 63).

presión arterial (68). La AII a concentraciones fisiológicas aumenta la reabsorción tubular proximal. Sin embargo, se requieren de más estudios para determinar si la AII también tiene un efecto importante sobre segmentos tubulares distales. La AII también produce una vasoconstricción específica de la AE, tendiendo a incrementar la reabsorción de sodio al alterarse las fuerzas físicas de los CP (Fig. 10) (32, 66). La AII puede incluso disminuir la excreción de sodio e incrementar su capacidad para concentrar la orina al reducirse el flujo sanguíneo de la médula renal. La regulación de la excreción de Na por medio de la AII está estrechamente ligada con el control de la presión arterial y la homeostásis del volumen a través de un mecanismo natriurético (67). Bajo muchas condiciones fisiológicas, tales como cambios en la ingesta de Na, la AII multiplica la efectividad del mecanismo natriurético para prevenir las fluctuaciones en el volumen del líquido corporal y en la presión arterial. En aquellas circunstancias asociadas con una depresión circulatoria, tales como la caída en la función cardíaca, reducciones en la presión sanguínea y aumento en los niveles de AII causan retención de sodio hasta que la presión arterial es restaurada a condiciones normales. Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas en las cuales la AII se eleva anormalmente, un incremento en la presión arterial (hipertensión) es requerida por el riñón para "escapar" a las potentes acciones antinatriuréticas de la AII y regresar la excreción de Na

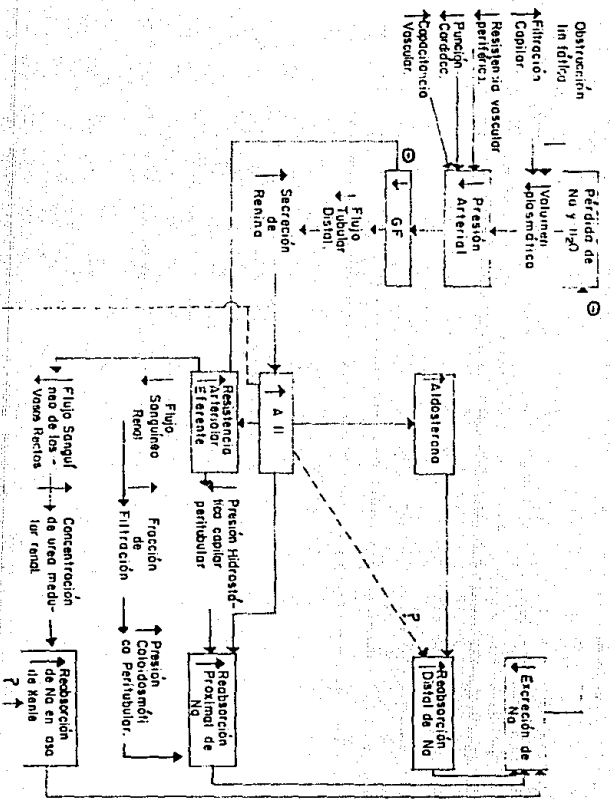


FIG. 10 - Acciones intrarrenales y extrarrenales de la AII sobre la excreción de sodio. (Ref. 66).

a la vía normal del mecanismo natriurético (Fig. 10) (66).

En resumen, la AII ejerce múltiples influencias sobre la función renal a través de sus efectos en las estructuras vasculares glomerulares y tubulares. De esta manera sus propiedades vasoconstrictoras pueden influir en la FG por medio de: 1) la alteración del flujo sanguíneo renal por un cambio en las RA y RE; 2) cambiando el ΔP y; 3) alterando el Kf (68, 69). También la AII actúa indirectamente a través de la modulación de la aldosterona por la hormona adrenal que estimula la reabsorción tubular distal (68, 69).

Se han observado diversos efectos de la AII en el cerebro. El primer grupo de acciones sugiere que la AII es una hormona reguladora de la hipovolemia. Las acciones centrales y periféricas de la AII pueden ser en algunos casos completamente independientes, pero conduciendo hacia la misma meta de mantener la homeostásis del fluido corporal. El segundo efecto de la AII, es la regulación cíclica de las hormonas reproductoras y de la pituitaria. La tercera función es como un neurotransmisor que interactúa con las catecolaminas, serotonina y otros péptidos (70). Datos experimentales in vivo e in vitro han comprobado que las PGs vasodilatadoras antagonizan las acciones intrarrenales (vasculares y glomerulares) de la AII (71).

1.4. SINDROME NEFROTICO.

El SN se caracteriza principalmente por la aparición de proteinuria (concentración de proteínas urinarias excediendo los 3 g/día), hipoalbuminemia (baja concentración de albúmina plasmática), edema (transudación de líquido a los espacios intersticiales de los tejidos) e hiperlipidemia (alta concentración de lípidos plasmáticos) (72). El término "síndrome nefrótico primario" se utiliza como un término colectivo para describir el cuadro clínico de la enfermedad, siempre y cuando no exista alguna causa aparente para su desarrollo. El síndrome nefrótico de cambios mínimos (SNCM), la glomerulonefritis mesangial proliferativa, la esclerosis glomerular focal, la esclerosis glomerular difusa, la glomerulonefritis membranosa, la glomerulonefritis mesangiocapilar y la glomerulonefritis proliferativa endocapilar, son algunas entidades clínicas primarias idiopáticas, ya que son provocadas por una causa desconocida. Sin embargo, estas entidades también pueden evocar al SN.

Esta clasificación de enfermedades primarias se basa en los estudios morfológicos realizados a partir de las biopsias tomadas de los pacientes. La gran variedad de los patrones de la enfermedad, depende en parte de las situaciones geográfica y socioeconómica en la que el individuo se desenvuelve (73, 74).

Para el propósito del presente trabajo, sólo detallaré los aspectos más relevantes que se refieren al SNCM.

1.4.1. Aspectos clínicos y etiopatológicos.

Existen varios sinónimos del SNCM como: nefrosis lipóide, síndrome nefrótico idiopático, infantil o sensible a esteroides (75, 76). La predominancia de las diferentes enfermedades renales que causan el SNCM está muy relacionado con la edad y el sexo, ya que aproximadamente el 80% de los casos son infantes principalmente del sexo masculino y sólo un 20% son pacientes adultos mostrando la misma incidencia en ambos sexos (77). La lesión puede aparecer en el primer año de vida, pero es más común después de esta edad, teniendo un pico de incidencia al tercer año de vida (77). La característica clínica primaria aparente y por la cual los pacientes acuden al servicio médico, es la formación de edema en las piernas y en la región sacra. Conforme avanza la enfermedad el edema se difunde a los párpados y al resto de la cara. Además del edema, el paciente puede presentar dolor de cabeza, irritabilidad, malestar, fatiga y depresión. Por otra parte, el desarrollo de celulitis, peritonitis o neumonía pueden ser las primeras indicaciones de un SN severo.

El edema puede revertir el patrón de coloración de la

lígula de las uñas, tanto de los pies como de las manos, a rosa en vez de blanco. El paciente también puede presentar hernias umbilicales e inguinales especialmente cuando existe gran cantidad de ascitis (acumulación de líquido en la cavidad peritoneal) por un período de tiempo prolongado. La presión sanguínea típicamente es normal, aunque se ha registrado un cierto porcentaje de incidencia con presión sistólica y diastólica elevada en algunos niños (78). En pacientes adultos con SNCM son más frecuentes los casos de hipertensión (79).

Aunque la etiología exacta del SN sigue sin conocerse, las múltiples hipótesis emitidas hasta ahora parecen tener una intensa confluencia en el terreno inmunoalérgico asociado con mecanismos de hipersensibilidad, sobre todo a polen, alimentos, virus, tóxicos, etc. (80 - 84)

1.4.2. Aspectos morfológicos.

El término de "cambios mínimos", sugiere que la estructura glomerular es normal o está mínimamente alterada. Ópticamente pueden observarse grados muy discretos de hiper celularidad mesangial o de engrosamiento del mesangio, pero ambos cambios son siempre de difícil valoración. Las alteraciones tubulares consisten en el hallazgo de acumulaciones de material protéico o lipídico en la luz tubular, es frecuente el edema intersticial, pero

sin signos de esclerosis intersticial ni de lesiones vasculares y ausencia de depósitos de inmunoglobulinas por inmunofluorescencia (85- 87).

La ultraestructura muestra ausencia de depósitos electrodensos en la MBG y un espesor y densidad de la lámina densa normal. Las únicas alteraciones significativas radican, en la fusión de los podocitos, acompañada de alteraciones en el citoplasma de estas células epiteliales viscerales, como por ejemplo, la presencia de numerosas vacuolas y la formación de pseudomicrovellosidades (87).

1.4.3. Fisiopatología.

La característica clínica central del SN es la presencia de edema. Sin embargo, el mecanismo responsable de su formación no se ha caracterizado completamente. La explicación clásica de la formación del edema se basa en un aumento de la permeabilidad en los capilares glomerulares para las proteínas plasmáticas. La albuminuria resultante conduce a una hipoalbuminemia y por lo tanto, a una caída en la presión oncótica. El subsecuente desbalance en las fuerzas de Starling, producen una transudación de líquido del espacio intravascular al intersticial provocando disminución del volumen circulante. La hipoalbuminemia resultante activa sensores de volumen y baroreceptores a través de distintos

mecanismos hemodinámicos y neurohumorales que dan lugar a retención de sodio y agua por el riñón (Fig. 11) (88).

De acuerdo con la hipótesis anterior, la formación del edema debería estar siempre asociada a la disminución de los volúmenes plasmático y sanguíneo; además de maniobras que elevan el volumen plasmático a lo normal en pacientes edematosos con SN, deberían inducir una respuesta natriurética. Sin embargo, en distintos estudios clínicos no se ha podido demostrar esta relación (89).

En muchas circunstancias tanto en humanos como en animales de experimentación, la presencia de hipoalbuminemia no se acompaña de edema, lo cual sugiere la participación de otro factor además de la hipoalbuminemia en la retención de sodio que acompaña al SN (89, 90). Para explicar mejor estos aspectos, se ha propuesto una hipótesis en la cual la retención de sodio es primaria a la formación del edema (Fig. 12) (91). En esta hipótesis, por un lado, la retención de sodio induce a un incremento en la presión hidrostática capilar promoviendo movimiento de fluido intravascular al espacio intersticial desarrollando el edema. Por otro lado, el aumento en la filtración de las proteínas plasmáticas, origina la hipoalbuminemia, la cual a su vez disminuye la presión oncótica del plasma que de la misma forma facilita el movimiento de líquido al espacio intersticial

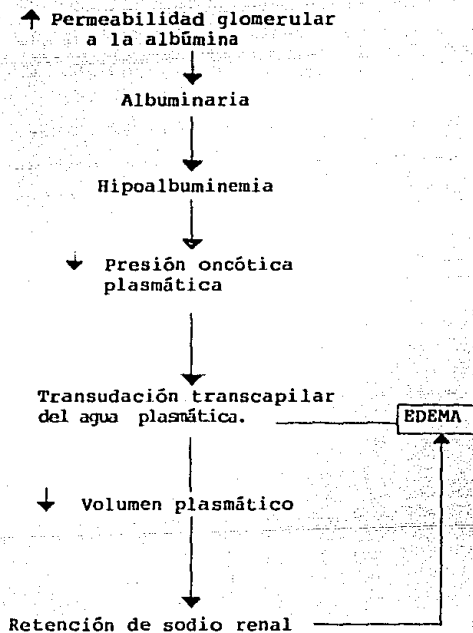


FIG. 11 - Teoría clásica de la formación del edema y la retención de sodio en el SN, a partir de un aumento de la permeabilidad glomerular para la albúmina. (Ref. 88).

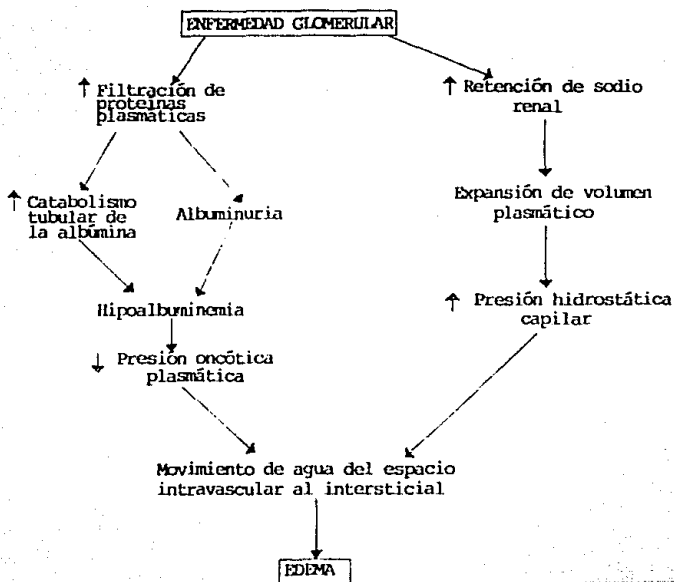


FIG. 12 - Mecanismo de formación del edema en el SN por una retención de sodio primaria y la contribución de la hipoalbuminemia promoviendo el movimiento de agua del espacio intravascular al intersticial. (Ref. 91).

contribuyendo así a la formación del edema. Se ha encontrado que la π del líquido intersticial cae paralelamente con la π del plasma conforme se desarrolla la hipoalbuminemia, induciendo que el flujo neto se mantenga en el rango normal evitando el desarrollo del edema. Esto explicaría por qué el edema no se forma a pesar de la severa hipoalbuminemia. La disminución de la π intersticial se cree que es ocasionada por un aumento en el flujo linfático, el cual regresa las proteínas iniciales al compartimiento vascular (92).

Durante mucho tiempo se consideró al SRAA como el mecanismo antinatriurético responsable de la retención de sodio y agua en el SN. Sin embargo, se ha observado que muchos pacientes nefróticos, tienen volúmenes plasmáticos normales o elevados, presión sanguínea normal o elevada y concentraciones plasmáticas de renina y aldosterona normales o bajas (93, 94). Varios autores han sugerido que parece haber un mecanismo intrarrenal que induce a la retención de sodio y agua (95 - 99), lo cual ha dado fuertes argumentos en favor de la hipótesis de que existe una retención de sodio primaria a la aparición del edema, además de que pueden existir otros mecanismos más (Fig. 13). Pedraza Chaverrí y Col. (100), valoraron el papel del SRAA en el SN experimental inducido con ANP y su relación con la excreción de sodio, y encontraron que la retención de sodio aparece en una etapa temprana, ya que la excreción urinaria de sodio disminuyó a partir del día

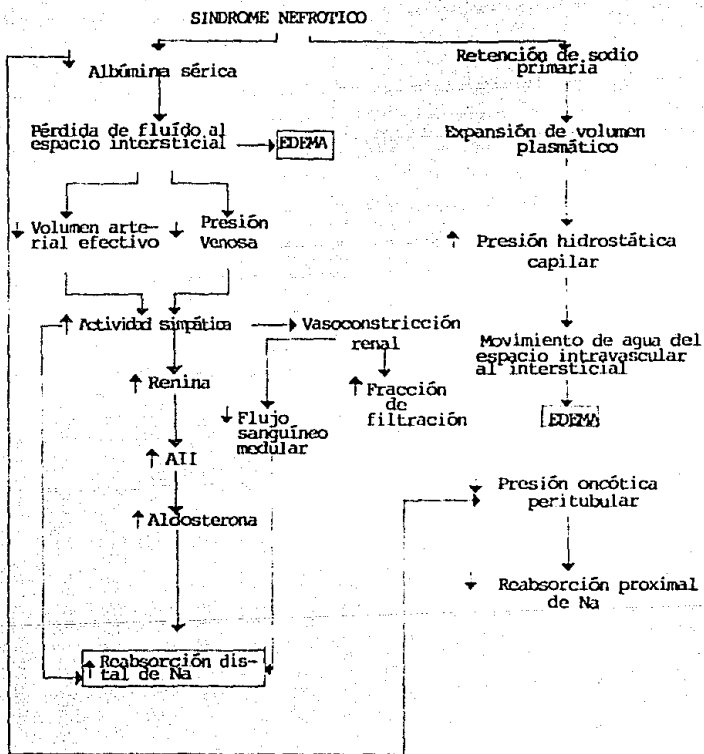


FIG. 13 - Mecanismo de formación del edema y la retención de sodio para explicar las diferencias de volumen, presión, concentración de aldosterona y renina en el SN.

2 continuando hasta el día 7, después de la inducción del SN. La secreción de renina aumentó a partir del día 5 y la proteinuria apareció en el día 4 cuando el animal ya estaba reteniendo sodio activamente. La actividad de la ECA y la concentración plasmática de aldosterona aumentaron el día 1. Debido a estos resultados, los autores concluyeron que la retención de Na en éste modelo, es independiente de la secreción de renina (Fig. 14). Por otra parte, Ichikawa (101) con su modelo de proteinuria unilateral en ratas con SN observó, que la proteinuria y la retención de Na se manifestaron sólo en el riñón perfundido con ANP, concluyendo así que eran mediados por factores intrarrenales.

En este esquema los factores físicos en los CP son una excepción, ya que a pesar de que la FF aumenta, la hipoalbuminemia periférica origina una caída en la presión oncótica capilar peritubular y la reabsorción proximal de sal se inhibe. Así, la retención de sodio resulta primordialmente de un incremento en la reabsorción tubular distal. Este esquema podría explicar el aumento o disminución en el volumen circulante, la presión sanguínea, renina y aldosterona (102).

Se cree que los factores intrarrenales responsables de la retención de sodio puede estar relacionada a una caída en la tasa de FG o a un aumento en la reabsorción tubular distal (101). Por otra parte, la fusión de

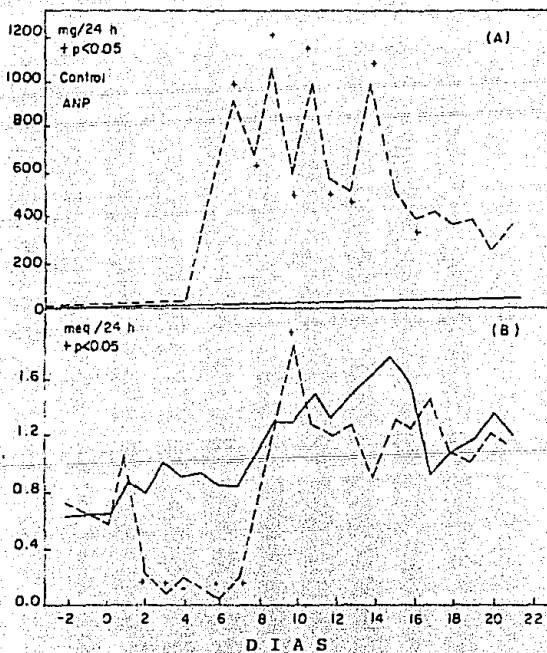


FIG. 14 - Datos del trabajo de Pedraza y Col. (Ref. 100).
(A) Excreción urinaria de proteínas.
(B) Excreción urinaria de sodio.

podocitos también se ha considerado como un factor importante al reducir el área disponible para la filtración (103 - 106).

Los estudios histoquímicos y de inmunofluorescencia no han comprobado una clara disminución en el metabolismo de los proteoglicanos de heparán sulfato, pero si han demostrado alteraciones moleculares de estos constituyentes de la MBG en ratas con SN experimental (106-109).

Dentro de la fisiopatología de la hiperlipidemia, Kaysen y Col. (110) han sugerido que se debe a una disminución del catabolismo de las lipoproteínas y a un aumento en la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (110). El defecto puede ser el resultado de una pérdida urinaria de moléculas cargadas negativamente que transportan las de heparán sulfato y un importante cofactor para lipoproteínas de baja densidad.

1.4.4. Síndrome nefrótico experimental.

Para estudiar el SN se han diseñado varios modelos experimentales que consisten en la inyección de suero antirriñón de rata (111, 112), de aminonucleósido de puromicina (ANP) (113, 114), de adriamicina (ADR) (115) y de daunomicina (116). Al SN experimental inducido por ANP se le ha dado mucha importancia ya que es muy similar al

SNCM encontrado en los humanos (113, 114). Si bien, el mecanismo por medio del cual el ANP produce el daño renal no se ha elucidado totalmente, se ha observado con el uso de colorantes "catiónicos" una disminución en las cargas negativas de la pared capilar glomerular (117). Esto podría permitir el paso de moléculas negativas como la albúmina y otras proteínas y producir albuminuria (118, 119). Otros autores han propuesto que existe una lesión de las células epiteliales ocasionando la pérdida de los podocitos y la aparición de defectos focales en la cubierta epitelial de la MBG (119, 120). También se han identificado defectos selectivos, tanto de carga como de tamaño (121 - 124). Kerjaschki y col. (125) encontraron una glucosilación defectuosa en una sialoproteína glomerular llamada "podocalixina", que justificaría el defecto selectivo de carga de la barrera de filtración.

También se ha estudiado el papel de los radicales libres de oxígeno sobre el daño renal por ANP, ya que estos pueden inducir diferentes daños a nivel celular, principalmente peroxidación de lípidos y daño de la MBG (126, 127). Durante el metabolismo del ANP, se liberan hipoxantina que al ser degradada por la enzima xantina oxidasa, genera el ion superóxido, el cual a su vez produce la lesión renal (Fig. 15) (126, 127).

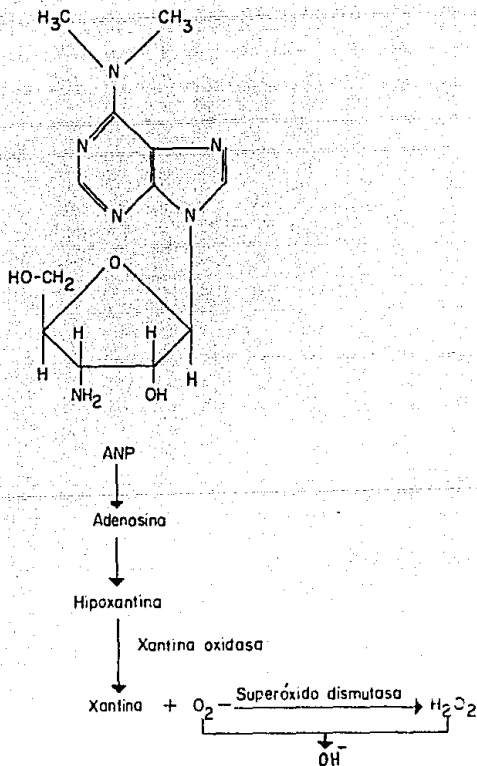


FIG. 15 - Producción de radicales libres de oxígeno que producen el daño renal en el SN experimental, a partir de la degradación del ANP por medio de la enzima Xantina-oxidasa.

II - OBJETIVOS

Estudios de micropunción han revelado en el síndrome nefrótico experimental inducido por la inyección subcutánea de aminonucleósido de puromicina que la filtración glomerular total y por nefrona están disminuidas debido a la caída del flujo plasmático por nefrona principalmente del coeficiente de ultrafiltración, mientras que el gradiente de presión hidrostática transcápilar y la presión capilar glomerular están elevadas significativamente. Sin embargo, no se ha podido determinar hasta que punto estos cambios en la hemodinámica glomerular pueden repercutir en la retención de sodio. Por lo tanto, con el fin de determinar las causas que inducen la retención de sodio antes de la aparición de la proteinuria, este estudio pretende caracterizar los cambios que sufren los determinantes de la filtración glomerular en ratas con síndrome nefrótico inducido con ANP.

La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que juega un papel muy importante en la regulación de la presión arterial y el balance de los electrolitos por medio de varios mecanismos extra e intrarrenales, además tiene efectos sobre la hemodinámica glomerular pues produce una vasoconstricción predominantemente de la arteriola eferente y de las células mesangiales. Estos efectos dan lugar a un aumento de la presión intraglomerular y disminución del coeficiente de ultrafiltración. Para valorar su participación en este

modelo experimental de síndrome nefrótico sobre los cambios en los determinantes de la filtración glomerular, se administró oralmente un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina llamado captopril.

Para establecer si la caída en el coeficiente de ultrafiltración se debe a cambios estructurales o funcionales se utilizó la infusión de plasma hiperoncótico que es una maniobra vasodilatadora que produce relajación mesangial e induce a su vez aumento del área disponible para la filtración y por lo tanto, también aumento de la filtración glomerular.

III - MATERIAL Y METODOS

3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

En este estudio se utilizaron 22 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 150 y 250 g. Para el grupo control se separaron 8 ratas, las cuales se mantuvieron bajo régimen dietético con acceso al agua ad libitum. En 14 ratas se indujo SN, por medio de la inyección subcutánea de ANP (6 - dimetilamino - 9 - <3'-amino - 3'-dioxiribosil> purina), en una dosis de 15 mg por cada 100 g de peso corporal (Gpo SN). A 3 de estas ratas se les administró captopril (SQUIBB, México, D. F.) con una dosificación de 1.5 g/L tres días antes y tres días después de la inducción del SN (Gpo SN/IEC), y a 6 se les infundió plasma hiperoncótico al 15% (1 ml/100 g) 45 min antes de la micropunción (Gpo SN/PHO). Las 5 ratas restantes se usaron como controles del grupo nefrótico. Al tercer día de la inducción del SN, las ratas fueron preparadas para los estudios de micropunción.

3.2. ESTUDIOS DE MICROPUNCIÓN.

3.2.1. Preparación quirúrgica.

Después de 24 h de ayuno, las ratas se anestesiaron con inactin (Byk Gulden Konstanz. México, D. F.) a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal por vía intraperitoneal (128). Con un tubo de polietileno P-250 se canuló la traquea; mientras que las venas

yugulares, la vejiga y el uretero se canularon con tubo - P-50, para recolectar muestras de sangre y orina durante el estudio (129).

En riñón se separó de la glándula suprarenal y de la grasa perirenal, a continuación la rata se colocó en una mesa termoregulada que mantuvo la temperatura del animal entre 36 y 37 °C (Fig. 16A y 17). El riñón se suspendió en una cápsula de lucita de tal forma que conservara su posición normal, evitando comprimir el uretero y el pedículo renal (Fig. 16B). Se depositó una capa de fluido elástico (Xantopren de Bayer. México, D. F.) en la periferia del riñón para sellar el espacio entre éste y la cápsula de lucita y de esta forma mantener cubierto el riñón con solución Ringer el resto del experimento (Fig. 16C). Se perfundió 1 ml de plasma por 100 g de peso a una velocidad de 11.64 ml/h para sustituir la pérdida de volumen durante la cirugía. La superficie del riñón se iluminó con una fuente de luz intensa conducida por una fibra óptica con punta de cuarzo que evitó la transmisión del calor; esta luz permitió visualizar claramente los túbulos y capilares de las nefronas localizadas en la corteza renal con un microscopio estereoscópico Leitz (Fig. 17).

En un tubo de polietileno Eppendorf se extrajo una muestra de sangre de 400 μ l como blanco a través de una arteria femoral y se reemplazó con sangre de una rata

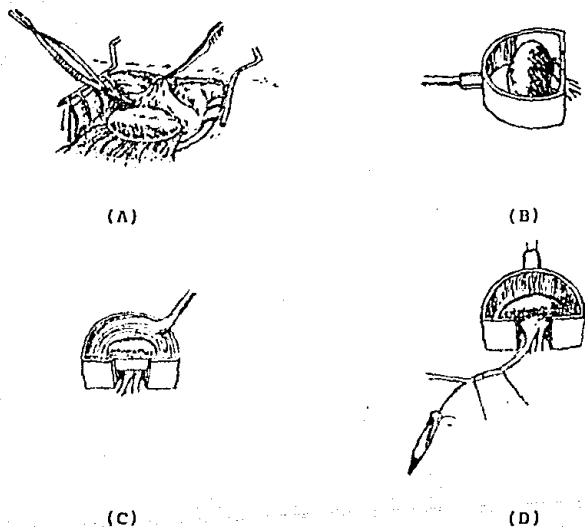


FIG. 16 - Separación del tejido perirenal para la exposición del riñón (A). Colocación del riñón en la cápsula de lucita (B). Recubrimiento del contorno del riñón para mantenerlo cubierto con solución salina (C). Recolección de muestras durante la micropunción (D). (Ref. 19).

donadora, por la vena yugular. Se inició una perfusión de inulina en Ringer (40 mg/ml) a una velocidad de 2.3 ml/h con una bomba de infusión Harvard (Infusion/withdrawal pump. Harvard apparatus. Southantick, Mass 01760). Durante todo el experimento se midió la presión arterial a través de una de las arterias femorales con un transductor de presión (Mod. RPS7C8). Gould Physiological Pressure Transducer P231D. Measurements Sistem. Div. Oxnard, Instruments, Quincy, Mass). Después de un período de 60 min se inició la recolección de orina en tubos de polietileno con aceite mineral previamente pesado en balanza analítica (Fig. 16D). El volumen urinario se calculó por diferencia de peso de la muestra colectada. Al principio y al final de la recolección de orina se obtuvo una muestra de sangre de una arteria femoral. Al mismo tiempo, se puncionaron 6 túbulos proximales, y se colectó el líquido tubular durante 3 min aproximadamente, para determinar la FG/n. También se puncionaron arteriolas superficiales y se obtuvo una muestra de sangre a la cual se le determinó la concentración de proteínas. Finalmente, se midió la presión intratubular y capilar por la técnica descrita en la figura 18.

3.2.2. Toma de muestras para micropunción.

Se utilizaron pipetas de vidrio con punta de 9 a 11 μ de diámetro llenas de aceite mineral teñido con Sudán Negro (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo) para la

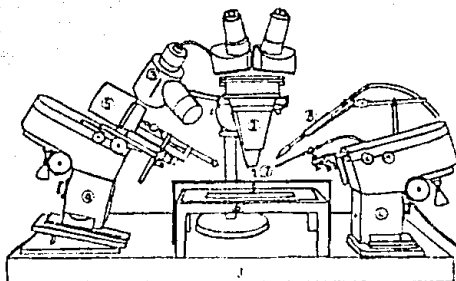


FIG. 17 - Equipo especial para micropunción. (1) mesa de piedra. (2) microscopio. (3) fuente de luz. (4) manipuladores. (5) bomba de perfusión. (6) mesa operativa. (7) sujetador de la cápsula de lucita. (8) depósito de aceite. (Ref. 130).

obtención de muestras tubulares. Estas pipetas se fijaron a un adaptador conectado a una jeringa de 20 ml para aspirar o inyectar a través de la micropipeta. El adaptador con la micropipeta se colocó en un manipulador Leitz, el cual permitió imprimir movimientos finos a la micropipeta (Fig. 17). Con estas micropipetas se puncionó la porción terminal de los túbulos proximales.

Para recolectar el líquido tubular se inyectó una pequeña cantidad de aceite para bloquear la luz tubular y permitir el paso libre del líquido tubular al interior de la pipeta, durante 3 min. En cada experimento se obtuvieron 6 muestras de filtrado tubular (Fig. 18A) (130). Posteriormente, con pipetas de 12 a 14 μ de diámetro en la punta y llenas con aceite mineral puro se puncionaron las AE y se obtuvieron muestras de sangre con las cuales se determinó la concentración de proteínas plasmáticas (Fig. 18B). Los valores obtenidos en sangre extraída de la arteria femoral se utilizaron para estimar indirectamente la concentración de proteínas en la AA, ya que en el trayecto entre aorta y AA la comparación de la sangre no sufre ninguna modificación (131).

3.2.3. Medición de presión intratubular y capilar.

Para la medición de presión intratubular y capilar se utilizó un equipo "servo-null" (Mod. 4A Instrument for physiology San Diego, Ca.), conectado a un transductor de

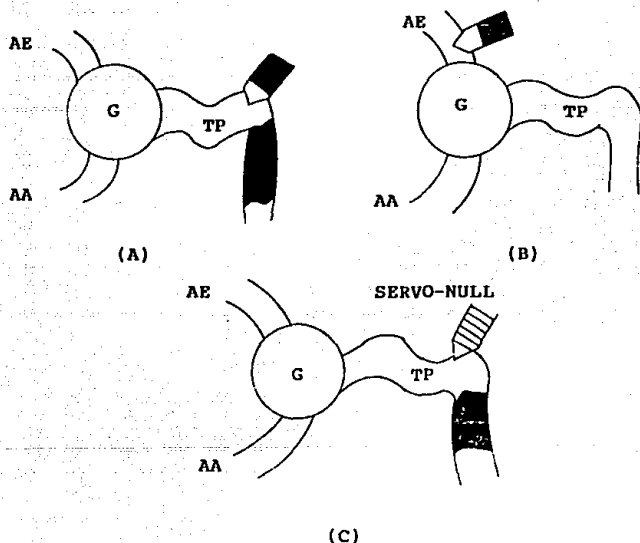


FIG. 18 - Representación esquemática de la manera en que se efectúa la micropunción en nefronas individuales para medir y calcular los diversos componentes de la hemodinámica glomerular. (A) Recolección de muestras tubulares para calcular la FG/n. (B) Recolección de muestras de la arteriola eferente para determinar la concentración de proteínas y calcular T_v y FF. (C) Medición de la presión tubular con bloqueo de flujo para calcular la PCG. AE=arteriola eferente; AA=arteriola aferente; G=glomérulo; TP=túbulo contorneado proximal.

presión (Gould Physiological Pressure Transducer P231D, Gould INC. Measurements System Div. Oxnard, Ca. 93030) a una bomba de presión y a un polígrafo Grass (Mod. RPS7C8 Grass Medical Instruments, Quincy, Mass.) calibrado de 0 a 50 mm Hg. Este equipo detecta los cambios en la conductividad eléctrica dentro de la pipeta de punción la cual está llena de solución salina 1 M. Al introducir la pipeta en el capilar o en el túbulo ingresa a esta solución relativamente hipotónica, disminuyendo la conductividad dentro de la pipeta (Fig. 18C y 19) (19). Este cambio se detecta por el servo-null el cual activa una bomba que aumenta la presión dentro de la pipeta hasta igualar la presión con la del capilar o del túbulo, de tal forma que se recupera la conductividad inicial dentro de la pipeta. Al mismo tiempo, el transductor va midiendo la presión que la bomba aplica al sistema para igualarse a las presiones intracapilar e intratubular y éstas se registran en el polígrafo (Fig. 19) (19).

Para medir la presión intratubular e intracapilar se utilizaron pipetas con punta de 6μ de diámetro. Para medir la presión intratubular con bloqueo de flujo, se inyectó dentro del túbulo una pequeña cantidad de aceite con una pipeta aplicando presión hasta detener el flujo tubular; en este momento se introdujo la pipeta del servo-null adyacente al aceite y registró la presión intratubular necesaria para detener el flujo tubular y la filtración glomerular, lo que permitió calcular

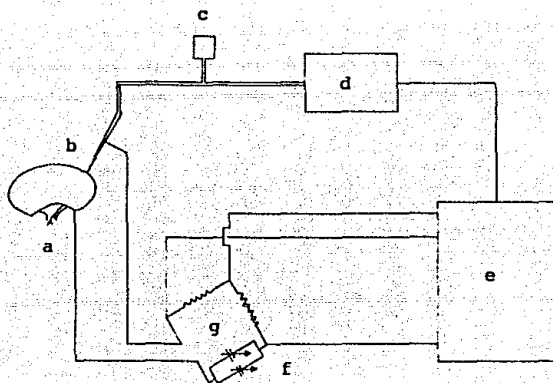


FIG. 19 - Esquema básico de operación del sistema de presión Servo-Null. a) riñón; b) pipeta; c) transductor de presión; d) bomba; e) amplificador; f) controles de balance; g) puente eléctrico. (Ref. 19).

indirectamente la presión dentro del capilar glomerular.

En la fabricación de micropipetas para la micropunción se utilizaron capilares de vidrio de 10 cm de longitud y 0.5 de diámetro. Estos capilares se lavaron previamente con mezcla crómica y agua destilada y posteriormente se secaron por centrifugación para eliminar ciertas impurezas. A continuación los capilares se estiraron en un estirador Livingston ajustado para producir micropipetas de aproximadamente 1.5 mm de longitud (Fig. 20).

Con el propósito de obtener una buena punción, se biseló la punta de la micropipeta por medio de un micromanipulador Leitz, al cual se sujeto la micropipeta y permitió colocar suavemente la punta de ésta sobre una piedra de afilar rotatoria (Norton 500) mojada con agua. La punta de la pipeta se visualizó con un microscopio Leitz. Finalmente, la punta de la pipeta se lavó con agua y se secó con acetona (Fig. 21).

3.3. MICROANÁLISIS DE LOS ESTUDIOS DE MICROPUNCIÓN.

3.3.1. Fabricación de las micropipetas para el procesamiento de las muestras.

3.3.1.1. Micropipeta de cuarzo.

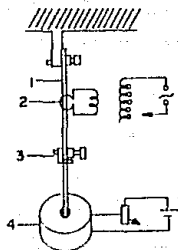


FIG. 20 - Estirador de pipetas. (1) pipeta; (2) resistencia; (3) sujetador de la pipeta; (4) electromagneto fijo al aparato. (Ref. 130).

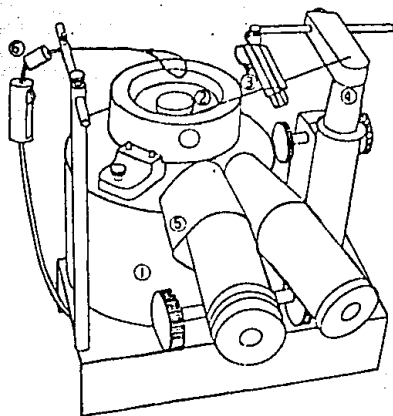


FIG. 21 - Afilador de pipetas. (1) motor; (2) piedra rotatoria; (3) pipeta; (4) manipulador; (5) microscopio; (6) manguera del agua. (Ref. 130).

Esta micropipeta consiste de un capilar de cuarzo de 7 cm de longitud y aproximadamente 100 μ de diámetro de un capilar de 5 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro sujeto con polietileno (Fig. 22A). Para calibrar el volumen de cuarzo de una solución de ^{131}I (iodotalamato) se tomaron muestras de diferentes volúmenes con la micropipeta de cuarzo bajo un microscopio estereoscópico. Después se midió la longitud del capilar ocupada por el volumen de la muestra con un vernier colocado en la platina del micromanipulador. Las muestras se diluyeron en 1 ml de agua destilada y se contó la radiactividad en un contador Gammacord (Gammacord II Ames, Miles). Las lecturas obtenidas se compararon con la lectura de una solución estándar que contenía 100 μ l de ^{131}I en 1 ml de agua destilada. El volumen (V_{mr}) en ml de cada muestra radiactiva se calculó con la siguiente fórmula:

$$V_{mr} (\text{ml}) = (R_m \times 100) / R_{st}$$

En donde: R_m = radiactividad de la muestra (cpm por ml)

R_{st} = radiactividad del estándar (cpm por ml)

Con el volumen (V_{mr}) y la longitud (L_{mr}) de la muestra se calculó la pendiente (P) de la micropipeta.

$$P = V_{mr} / L_{mr}$$

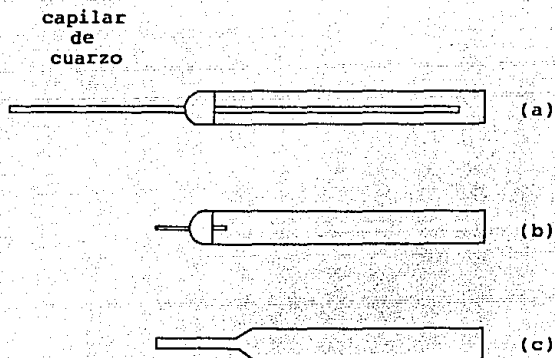


FIG. 22 - Micropipetas para el procesamiento de las muestras obtenidas en los estudios de micropunción. (a) Micropipeta de cuarzo; (b) Micropipeta volumétrica; (c) Micropipeta de transferencia.

3.3.1.2. Micropipeta volumétrica.

La micropipeta volumétrica se fabricó a partir de un capilar de vidrio de 100 μ de diámetro, el cual se estiró en un micromechero para reducir su diámetro interno y que en una longitud de 0.75 a 1 cm contuviera de 7 a 9 y 11 a 14 nl para procesar las muestras de sangre de la AE y de líquido tubular respectivamente. Los capilares estirados son insertados parcialmente dentro de un capilar de vidrio de 5 cm de longitud y 5 mm de diámetro que le sirvió de sostén. Posteriormente, se fijó a las paredes del capilar de vidrio con un poco de polietileno (Fig. 22B). Para determinar el volumen de la micropipeta, ésta se llenó con agua la cual a su vez se vació en la micropipeta de cuarzo ya calibrada. Finalmente, el volumen real se calculó con los valores leídos con el vernier y la pendiente de la micropipeta de cuarzo calibrada.

3.3.1.3. Micropipeta de transferencia.

La micropipeta de transferencia se diseñó a partir de un capilar de vidrio de 100 μ de diámetro que se estiró levemente en su parte media con un micromechero. A continuación se partió el capilar de tal forma que la porción estirada se quedara de un solo lado con el resto del capilar (Fig. 22C).

3.3.2. Determinación de inulina en las muestras tubulares.

Con el objeto de medir la concentración de inulina en el líquido tubular se empleó el método fluorométrico de Vureck y Pergram (132 - 133). Este método se basa en la propiedad de la diamedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexamediona) (EASTMAN, Kodak Co. Rochester N. Y.) y el ácido fosfórico, de formar compuestos fluorescentes con azúcares como la fructosa al someterse en incubación a temperatura de ebullición. El reactivo de diamedona se preparó en una concentración de 50 mg por 5 ml de ácido fosfórico al 85% (Fisher Scientific Company, New Jersey). En base a una solución estocck de inulina (10 mg/ml), se preparó una curva estándar de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg/ml. En capilares de vidrio Drummond de 10 x 100 mm previamente sellados por un extremo con un micromechero se colocaron 3 μ l del reactivo de diamedona con ayuda de una microbureta (Mod. SD2Sringe Microburet. Micro-metric Instruments Co. Cleveland Ohio).

Por otra parte, en un capilar de vidrio del mismo tamaño que los anteriores pero con sus extremos libres se depositó una pequeña cantidad de la solución estándar de la curva de inulina. Se selló con aceite por ambos lados para evitar la evaporación de la muestra y se fijó en la platina de un microscopio Leitz junto con los tres capilares que contenían el reactivo de diamedona. La micropipeta volumétrica previamente calibrada y sujeta a

un manipulador, se llenó con la solución estándar del capilar sellado con aceite. Esta muestra a su vez se vació al capilar con diamedona, se centrifugó en una centrífuga para capilares (Microcapillary Centrifuge Mod. MB International Equipment Company) durante un minuto y se selló el otro extremo para volver a centrifugarlo con el fin de mezclar bien el reactivo con la muestra. El volumen de las muestras tubulares se midió con una micropipeta de cuarzo con diámetro constante previamente calibrada que permitió medir volúmenes en nanolitros con un mínimo de error.

Con el valor de la pendiente (P) de la micropipeta de cuarzo y la longitud (L) de la muestra tubular se pudo calcular el volumen de la muestra (Vmt) con la siguiente fórmula:

$$V_{mt} = P \times L$$

Para calcular el flujo tubular se dividió el volumen de la muestra entre el tiempo de recolección. Las muestras se depositaron en una pipeta de transferencia que contenía aceite, y se manipularon de la misma manera que se describió para los estándares de la curva. Cada estándar y la muestra del líquido tubular se procesaron por triplicado. Se prosiguió a medir la fluorescencia de la curva y de las muestras tubulares en un microfluorómetro Aminco.

3.3.3. Determinación de proteínas plasmáticas.

La técnica que se empleó para medir las proteínas plasmáticas fue la sugerida por Viets y Col. (134) la cual se basa en la reacción de la fluoescamina (ROCHE, ROCHE Diagnostics. New Jersey) con los grupos amino primarios de los aminoácidos, péptidos y proteínas para formar productos altamente fluorescentes. Se preparó una curva estándar a partir de aproximadamente 30 ml de sangre extraída de varias ratas. La sangre se centrifugó (centrífuga Mod. CM. International Centrifuge Equipment Company. Boston Mass.) a 3000 rpm durante 20 min para separar el plasma. Para concentrar las proteínas plasmáticas al 10%, el plasma se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 1 h y se vació en unos conos (Type CF25. Centriflo Membrane Cones. Amicon Lexington Mass. 02173). La porción filtrada se almacenó en un tubo de ensayo y con el plasma restante se repitió la misma operación.

Con el plasma hiperoncótico y la porción filtrada que se almacenó se hicieron varias diluciones con las siguientes concentraciones: 10, 7.5, 5.0 y 2.5 g%. Con la ayuda de un refractómetro (Cat. 10400 American Optical Scientific Instrument Division. Bufalo N. Y. 14215), se verificó la concentración de cada dilución y se ajustaron agregando pequeñas alícuotas del plasma hiperoncótico o del filtrado según convino.

Las micropipetas de recolección con las muestras de sangre se insertaron en capilares Drummond que tenían aproximadamente 1 cm de pegamento epóxico, con el propósito de sujetar las pipetas al centrifugar las muestras. Los capilares se cortaron de tal manera que permitieran la extracción de las muestras con la micropipeta de cuarzo calibrada, la cual a su vez se depositó en la micropipeta de transferencia llena de aceite en la punta. Con la micropipeta volumétrica se pipeteó cada muestra y las alícuotas se transfirieron a capilares Drummond que tenían 4 μ l de solución salina al 0.9 %. Con un bulbo adaptado para sujetar capilares, se vació el contenido de los capilares en tubos de vidrio (Cat. 9820. PYREX Laboratory Glassware) de 6 x 50 mm que tenían 40 μ l de buffer de fosfato de sodio (trisódico) (19.07 g/L), con pH ajustado con ácido ortofosfórico entre 8.5 y 9. A continuación se agregaron 40 μ l de una solución de acetona de grado espectroscópico (MERCK, México, D.F.) y fluorescamina (3 mg/ml), con ayuda de una jeringa Hamilton (Mod. PB-600-1. Hamilton Company, Reno, Nevada 89510). Durante ésta última operación los tubos se mantuvieron en constante agitación. Con otros capilares Drummond, se tomaron por capilaridad pequeñas alícuotas de las muestras de cada tubo y se sellaron por un extremo con un micromechero. Se centrifugaron y se sellaron por el otro extremo. Los puntos de la curva se procesaron de la misma forma que se describió para las muestras recolectadas durante el estudio. Tanto la curva como las

muestras recolectadas se procesaron por triplicado. Finalmente, la fluorescencia se midió en un microfluorómetro Aminco.

3.3.4. Determinación de inulina plasmática y urinaria.

Para determinar la concentración de inulina plasmática y urinaria se empleó el método de antrona de Davison (135). Las muestras de sangre obtenidas de las arterias femorales se centrifugaron (Centrífuga Mod. 152. Microfuge Beckman) durante 1 min para separar el plasma. Para determinar la concentración de inulina plasmática se tomó una alícuota de 50 μ l de plasma y se colocó en un tubo que tenía 1 ml de agua destilada y 0.5 ml de TCA para precipitar y eliminar las proteínas presentes. Después se agitó en un vortex y se centrifugó (Centrífuga International Equipment Co. Boston, Mass. Ca. L110), a 1500 rpm durante 10 min, al cabo de los cuales se separó el sobrenadante.

Las recolecciones de orina obtenidas durante la micropunción se diluyeron 1 ó 2 veces. La primera con 1 ml de agua destilada, siempre y cuando el volumen de la muestra excediera de los 500 μ l, mientras que la segunda fué de 100 μ l en 50 ml de agua destilada para todas las muestras.

3.4. CALCULOS.

$$Din \text{ (ml/min)} = (Uin \times V)/Pin$$

$$FG/n \text{ (nl/min)} = (TFin \times V)/Pin$$

$$\pi \text{ (mm Hg)} = 1.76C + 0.28C^2$$

$$PCG \text{ (mm Hg)} = PBF + \pi A$$

$$FF (\%) = 1 - (CA/CE)$$

$$KE \text{ (nl/seg/mm Hg)} = (FG/n)/PNF$$

$$FP/n \text{ (nl/min)} = (FG/n)/FF$$

$$FS/n \text{ (nl/min)} = (FP/n)/(1-Hto)$$

$$\Delta P \text{ (mm Hg)} = PCG - PT$$

$$PNF \text{ (nl/seg/mm Hg)} = \frac{(PCG - \pi A - PT) + (PCG - \pi E - PT)}{2}$$

$$RA \text{ (dinas/seg/cm}^{-5}\text{)} = (TAM - PCG)/(FS/n) \times 7.962$$

$$RE \text{ (dinas/seg/cm}^{-5}\text{)} = (PCG - Pc)/(FS/n - FG/n) \times 7.962$$

3.5. ESTUDIOS MORFOLOGICOS.

Después de la micropunción se prepararon los riñones para los estudios morfológicos. Primero se ligó la aorta por arriba de las venas renales al igual que la arteria mesentérica. Posteriormente, el riñón se perfundió a través de la arteria femoral con amortiguador de fosfatos pH 7.6, hasta exanguinarlo y de la misma forma con glutafomol al 3.5%. Al mismo tiempo se le hizo una pequeña incisión a la vena cava para dejar el paso libre a los líquidos de perfusión. Durante estas maniobras, la presión intraórtica se mantuvo constante, para evitar la concentración de los elementos vasculares del riñón. La presión arterial se registró por la arteria femoral. Una vez fijado el riñón se extrajo y se conservó en una solución de glutafomol al 2% durante 2 h. Para el análisis con ME, el tejido renal previamente fijado se lavó tres veces con una solución amortiguadora de fosfato por períodos de 10 min. Se postfijó en tetraóxido de osmio al 1% con buffer de fosfato durante 2 h. Se volvió a repetir la operación de lavado con solución amortiguadora de fosfato y se prosiguió con la deshidratación sucesiva en alcohol a las siguientes concentraciones: 50, 60, 70, 80, 96 y 100% durante 15 min en cada uno. La preinclusión se hizo en una resina con óxido de propileno en las proporciones 1:1 (durante 48 h). y 3:1 (durante 24 h). Finalmente, la inclusión se preparó con resina pura para su polimerización en 48 h.

Para el análisis de microscopía de luz el tejido renal se fijó en una parte de ácido acético y tres partes de alcohol etílico durante 10 min. Se lavó con abundante agua destilada para quitar el excedente del fijador y se tiñó con azul de toluidina de 1 a 5 min. Se lavó nuevamente con agua destilada y se procedió a deshidratar el tejido en alcohol al 96%. Los cortes se pasaron por acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol de 1 a 3 min en cada uno y se cubrieron con Bálsamo de Canadá o resina para su análisis (136).

3.6. ANALISIS ESTADISTICO.

3.6.1. Prueba de homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett).

Para determinar la homogeneidad de las varianzas de cada parámetro hemodinámico, se utilizó la prueba de Bartlett con la que se determina el valor de Chi cuadrada (137). Si el valor de Chi cuadrada no supera al valor crítico encontrado en las tablas con 3 grados de libertad y una probabilidad de 0.05, la prueba no es significativa indicando homogeneidad en las varianzas y por lo tanto se debe aplicar un análisis de varianza paramétrico. Por el contrario, si la prueba es significativa, se concluye que las varianzas son heterogéneas y debe aplicarse un análisis de varianza no paramétrico.

3.6.2. Análisis de varianza paramétrico.

Se aplicó un análisis de varianza paramétrico para calcular el valor de F y determinar las discrepancias entre los grupos experimentales (138). Si el valor de F calculado superaba el valor de F de las tablas, la prueba se consideró significativa, indicando la existencia de al menos un grupo diferente. Para saber cuales eran estos grupos, se aplicó el método de Bonferroni (138). En esta prueba el valor crítico de t se extrajo de las tablas de percentiles de la distribución de t de dos colas, usando como datos el nivel de significancia y los grados de libertad. El nivel de significancia se calculó dividiendo el valor de la probabilidad elegida (en todo el análisis se utilizó $p < 0.05$) entre el número de comparaciones entre grupos (en este caso se utilizaron 5), $0.05/5 = 0.01$. Los grados de libertad se obtuvieron de la diferencia del número de datos - el número de grupos, por lo tanto, $22 - 4 = 18$. Con estos datos el valor crítico de t fué de 2.878. El valor de t de entre los grupos se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $t = (X_i - X_j) / \sqrt{SM^2(1/n_i + 1/n_j)}$. Donde X_i y X_j son los promedios de los grupos a comparar, SM es la suma de los cuadrados obtenida en el análisis de varianza paramétrico y n_i y n_j son el número de datos de dichos grupos. Los grupos a comparar fueron: C vs SN, C vs SN/IEC, C vs SN/PHO, SN vs SN/IEC y SN vs SN/PHO.

Cuando la t calculada para cada comparación es $\geq t$

crítica (2.878), se concluye que los grupos son diferentes.

3.6.3. Análisis de varianza no paramétrico.

Por otra parte se aplicó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis (139) en los casos en que la prueba de Bartlett fue significativa. Tomando en cuenta las mismas comparaciones anteriores se empleó la siguiente fórmula (138, 140, 141):

$$R_i - R_j \geq <h(k-1) \frac{1}{N} > <N(N+1)/12 > \frac{1}{N} <(1/n_i + 1/n_j) \frac{1}{N} >.$$

En donde R_i y R_j son el promedio de los rangos de los grupos por comparar; n_i y n_j son el número de datos de los 4 grupos y h representa el valor crítico obtenido de la tabla de distribución de Chi cuadrada usando como grado de libertad el número de grupos menos 1 y como probabilidad el valor de 0.05. En este caso los grados de libertad fueron 3 y el valor crítico fue de 7.82. Si la diferencia de los promedios de los rangos es \geq al valor de la segunda parte de la ecuación, se concluye que ambos grupos son diferentes a un nivel de significancia de 0.05. Estas pruebas estadísticas se realizaron con una calculadora HP 41CV. Los datos en las tablas se presentan como la media \pm la desviación estándar.

IV - RESULTADOS

La prueba de Bartlett demostró claramente homogeneidad de las varianzas en todos los parámetros a excepción de la FG y el Kf, ya que los valores de Chi cuadrada de estos dos factores superaron el valor crítico (Tabla 2). Los resultados del análisis de varianza paramétrico indicaron importantes discrepancias en el peso, FG, PBF, PCG, FG/n, FG/n, ΔP , RE y Kf (Tabla 3). El cálculo de la t modificada por el método de Bonferroni demostró cambios en los 3 grupos experimentales respecto al control (Tabla 4). No obstante, no se observaron diferencias en los grupos SN/IEC y SN/PHO respecto al grupo SN (Tabla 4). En la tabla 5 se resumen los datos de la prueba de Kruskal-Wallis para la FG y el Kf que demostraron heterogeneidad de varianzas en la prueba de Bartlett. Estos resultados expresaron diferencias estadísticas de los 3 grupos experimentales sólo respecto al control, pero no del grupo SN vs SN/IEC y SN/PHO. En la tabla 6 se resumen los promedios de los valores de los diferentes grupos y su significancia estadística.

4.1. HEMODINAMICA GLOMERULAR.

4.1.1. Efecto del aminonucleósido de puromicina.

Los cambios en el grupo SN indicaron un aumento importante de la PCG (22%) a causa de un incremento del 43% del PBF (Fig. 23 y 24). Del mismo modo el ΔP también se elevó a causa del aumento en la PCG en la misma proporción

PARAMETRO HEMODINAMICOS	C (8)	SN (5)	SN/IEC (3)	SN/PHO (6)
P	285.0±55.3	217.0±46.4	202.7±15.3 ^b	147.2±17.1 ^c
TAM	105.2±14.8	109.6±11.1	97.3±3.4	111.5±10.1
FG	1.0±0.5	0.37±0.10 ^a	0.18±0.10 ^b	0.35±0.08 ^c
PBF	27.8±3.5	40.0±1.6 ^a	35.3±0.6	39.5±6.5 ^c
PCG	43.5±3.4	53.0±3.8 ^a	48.6±2.2	54.8±7.2 ^c
FP/n	93.7±34.1	51.2±25.6	46.1±34.6	53.4±23.6
FF	0.31±0.05	0.29±0.02	0.23±0.07	0.28±0.04
FG/n	29.0±9.8	14.7±7.3 ^a	10.5±7.9 ^b	14.3±4.4 ^c
π _A	15.7±2.1	13.9±2.2	13.0±1.8	15.3±3.4
π _E	26.3±4.8	23.3±4.0	19.0±0.4	24.9±3.6
ΔP	33.4±3.6	41.7±4.8 ^a	35.4±4.2	39.2±4.0
RA	3.1±1.4	5.3±2.0	5.8±3.2	5.8±2.6
RE	1.9±0.6	4.3±1.5 ^a	4.9±2.7 ^b	4.5±1.6 ^c
Kf	0.043±0.017	0.011±0.004 ^a	0.010±0.008 ^b	0.013±0.003 ^c

TABLA 2. Resultados de la hemodinámica glomerular. a=C vs SN, b=C vs SN/IEC, c=C vs SN/PHO, d=SN vs SN/IEC, e=SN vs SN/PHO. Los valores se representan como el promedio ± desviación estándar.

PARAMETROS HEMODINAMICO	CHI CUADRADA	GRADOS DE LIBERTAD	VALOR CRITICO	PROBABILIDAD
P	6.93	3	7.82	NS
TAM	2.05	3	7.82	NS
FG	19.66	3	7.82	<0.05
PBF	7.29	3	7.82	NS
PCG	3.41	3	7.82	NS
FP/n	0.67	3	7.82	NS
FF/n	1.83	3	7.82	NS
FG/n	2.21	3	7.82	NS
π A	1.20	3	7.82	NS
π E	3.66	3	7.82	NS
Δ P	0.29	3	7.82	NS
RA	1.95	3	7.82	NS
RE	5.91	3	7.82	NS
Kf	10.34	3	7.82	<0.05

TABLA 3. Prueba de Bartlett para obtener el valor de Chi cuadrada y determinar si las varianzas son homogéneas o heterogéneas. NS=no significativo.

PARAMETROS HEMODYNAMICOS	SM	n	VC	F	P
P	1753.31	18	2.878	12.65	<0.05
TAM	141.65	18	2.878	1.65	NS
FG	0.11	18	2.878	6.59	<0.05
PBF	17.35	18	2.878	12.74	<0.05
PCG	22.23	18	2.878	7.89	<0.05
FP/n	885.20	18	2.878	3.53	<0.05
FF/n	0.0022	18	2.878	2.63	NS
FG/n	61.47	18	2.878	6.72	<0.05
π A	6.35	18	2.878	1.11	NS
π E	16.00	18	2.878	2.57	NS
Δ P	16.80	18	2.878	5.04	<0.05
RA	4.72	18	2.878	2.35	NS
RE	2.12	18	2.878	5.85	<0.05
Kf	0.0001	18	2.878	13.15	<0.05

TABLA 4. Análisis de varianza paramétrico. SM=suma de cuadrados, n=grados de libertad, VC=valor crítico, F=razón de varianza, P=probabilidad.

PARAMETROS HEMODINAMICOS	DIFERENCIA DE RANGOS	EC	H	n	N	P	
FG	CvsSN	7.4	4.49	12.03	3	22	<0.05
	CvsSN/IEC	13.9	6.32	12.03	3	22	<0.05
	CvsSN/PHO	7.9	4.03	12.03	3	22	<0.05
	SNvsSN/IEC	6.5	7.36	12.03	3	22	NS
	SNvsSN/PHO	0.5	5.06	12.03	3	22	NS
Kf	CvsSN	11.9	4.49	14.54	3	22	<0.05
	CvsSN/IEC	11.8	6.32	14.54	3	22	<0.05
	CvsSN/PHO	10.0	4.03	14.54	3	22	<0.05
	SNvsSN/IEC	0.07	7.36	14.54	3	22	NS
	SNvsSN/PHO	1.9	5.06	14.54	3	22	NS

TABLA 5. Prueba de Kruskal-Wallis. EC=valores correspondientes a la ecuación, n=grados de libertad, N=números de datos, P=probabilidad.

PARAMETROS HEMODINAMICOS	CvsSN a	CvsSN/IEC b	CvsSN/PHO c	SNvsSN/IEC d	SNvsSN/PHO e
P	2.85	2.90 ^b	6.10 ^c	0.47	2.75
FG	3.12 ^a	3.44 ^b	3.40 ^c	0.78	0.13
PBF	5.13 ^a	2.64	5.18 ^c	1.55	0.21
PCG	3.55 ^a	1.59	4.44 ^c	1.30	0.62
FP/n	2.51	2.36	2.51	0.24	0.12
FG/n	3.20 ^a	3.48 ^b	3.48 ^c	0.73	0.10
Δ P	3.56 ^a	0.74	2.62	2.10	1.01
RE	2.93 ^a	3.11 ^b	3.40 ^c	0.60	0.28
Kf	4.94 ^a	4.29 ^b	2.97 ^c	0.12	0.03

TABLA 6. Cálculo de la t de Bonferroni. El valor de la t crítica es de 2.878 con un nivel de significancia de 0.05 y 18 grados de libertad.

(Fig. 23 y 25). Las diferencias entre estos factores hemodinámicos respecto al control fueron estadísticamente significativas. Aunque el FP/n disminuyó un 45% no alcanzó significancia estadística, lo cual se atribuyó a la gran dispersión de los datos (Fig. 26). Este cambio en el FP/n pudo ocasionar a su vez un incremento casi proporcional de la FG/n (49%) y haciéndose más evidente en la FG total (Fig. 26, 27, 28). Por otra parte, la RE se elevó casi tres veces, en primer lugar como resultado de los incrementos en la PCG y en el PBF, y en segundo lugar a que la TAM y el $\overline{\Pi}A$ no se modificaron (Fig. 23, 24, 29). La FF no se modificó ya que la $\overline{\Pi}A$ y la $\overline{\Pi}E$ tampoco variaron. A pesar de que el análisis estadístico no mostró diferencias en la RA los resultados demuestran que ésta tiende a elevarse contribuyendo así a elevar la PCG (Tabla 2). El Kf descendió de un valor de 0.043 en circunstancias normales a 0.011 ml/seg/mm Hg (Fig. 30). Esta diferencia en el Kf contribuyó a disminuir la FG ya que se encontró fusión de podocitos en este grupo de ratas nefróticas (Fig. 36).

4.1.2. Efecto del captopril.

La TAM disminuyó sólo ligeramente, mientras que la RE aumentó casi el triple siendo esta discrepancia significativa (Tabla 2) (Fig. 29). Aunque la RA también aumentó, las pruebas estadísticas no revelaron significancia estadística (Tabla 2). La PCG no sufrió

grandes cambios ya que la PBF y el ΔP tampoco se modificaron (Fig. 23, 24, 25). Sin embargo, el incremento en las RA y RE la elevaron ligeramente (Fig. 29). Por otra parte, el FP/n disminuyó un 51% y más o menos en la misma proporción la FG/n (64%) (Fig. 26 y 28). Estas variables a su vez ocasionaron un descenso importante en la FG total del 82% (Fig. 27). La caída en el Kf también produjo el descenso en la FG/n y la FG total (Fig. 27, 28, 30 y 37). No se encontraron discrepancias en la FF ya que en los valores de πA y πE tampoco se observaron alteraciones.

4.1.3. Efecto de la infusión de plasma hiperoncótico.

En este grupo experimental se observaron cambios muy parecidos al grupo SN, ya que la PCG sufrió un aumento del 26%, ocasionado por un incremento del 42% de la PBF (Fig. 23 y 24). Aunque el ΔP se elevó un 17% no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, este leve ascenso colaboró incrementando la PCG (Fig. 23 y 25). El FP/n descendió de 93.7 en el grupo C a 53.4 ml/min, pero esta diferencia no fue significativa, tal vez por la misma razón que mencioné anteriormente acerca de la gran dispersión de los datos en este parámetro (Tabla 2) (Fig. 26). La alteración en el FP/n pudo originar un descenso del 51% de la FG remarcándose este cambio en la FG total (65%) (Fig. 27 y 28). Aunque la infusión de PHO es una maniobra vasodilatadora las RA y RE aumentaron de 3.1 a 5.8 mm Hg en el extremo aferente y de 1.9 a 4.5 mm Hg en el eferente

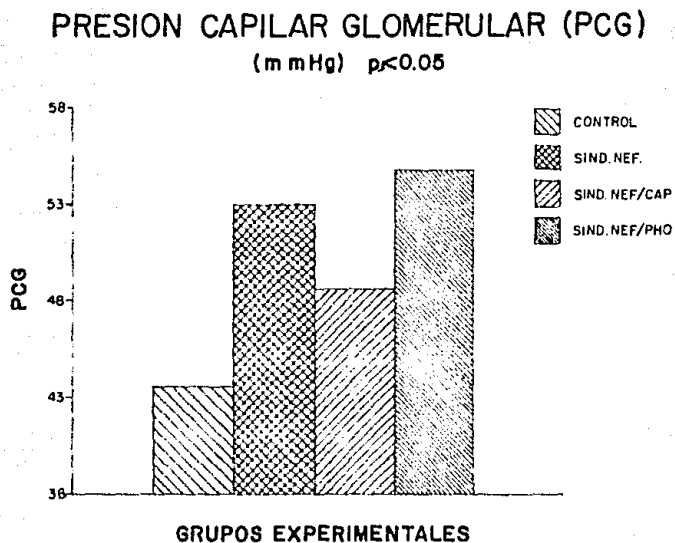


FIG. 23.

PRESION CON BLOQUEO DE FLUJO (PBF)
(mmHg) $p < 0.05$

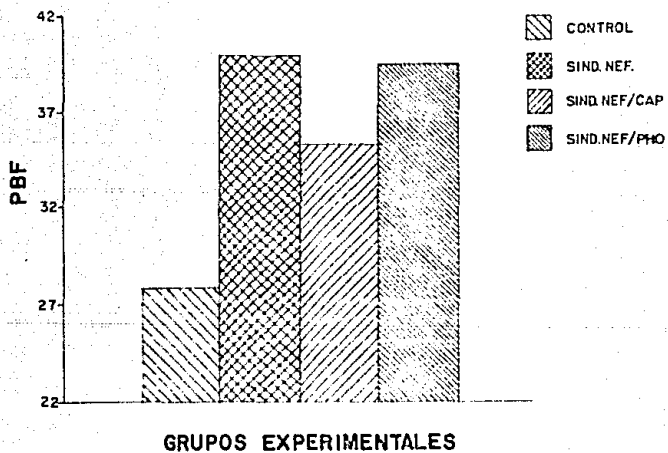


FIG. 24.

GRADIENTE DE PRESION HIDROSTATICA (ΔP)
(mm Hg) $p < 0.05$

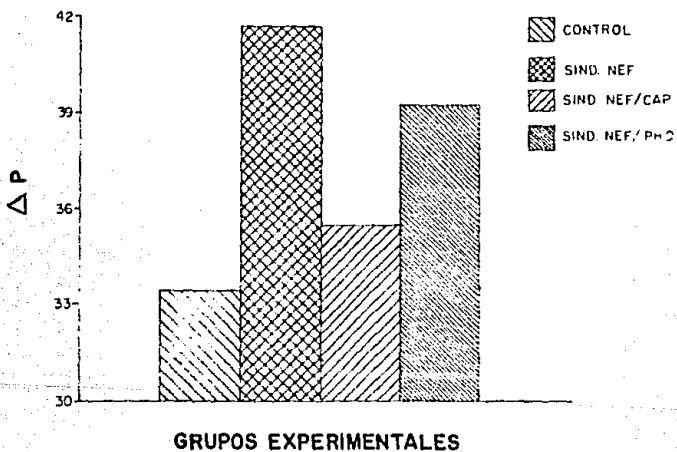


FIG. 25.

FLUJO PLASMÁTICO POR NEFRONA (FP/n)
(nl/min) $p < 0.05$

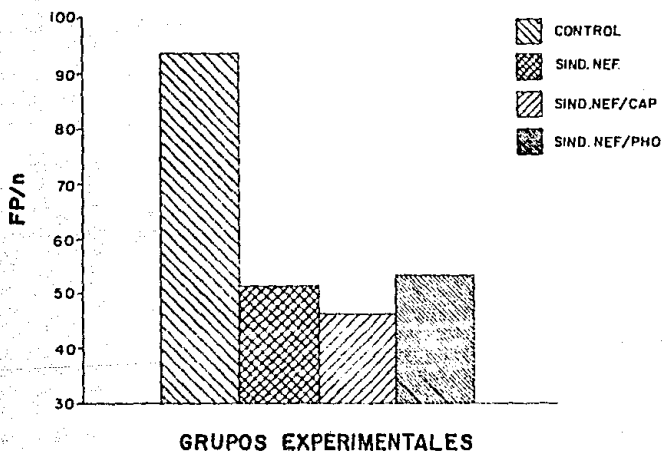


FIG. 26.

FILTRACION GLOMERULAR (FG)

(ml/min) $p < 0.05$

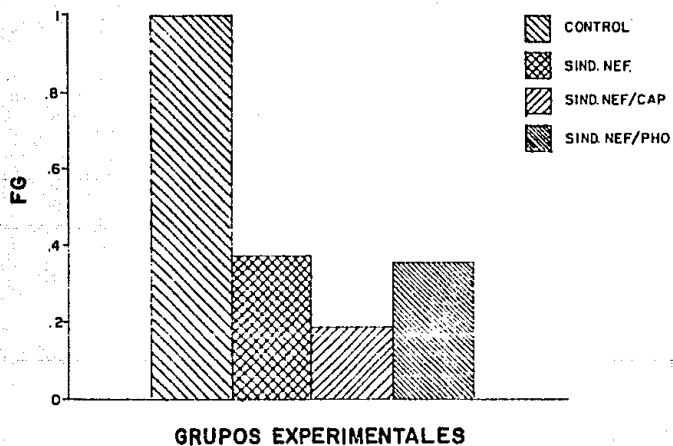


FIG. 27.

FILTRACION GLOMERULAR P/NEFRONA (FG/n)
(nl/min) $p < 0.05$

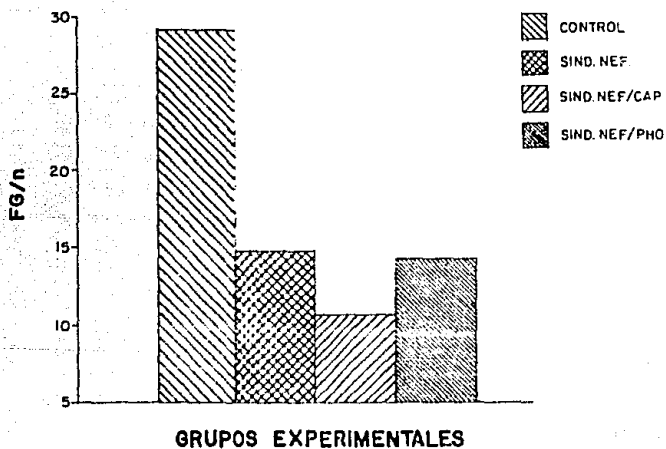


FIG. 28.

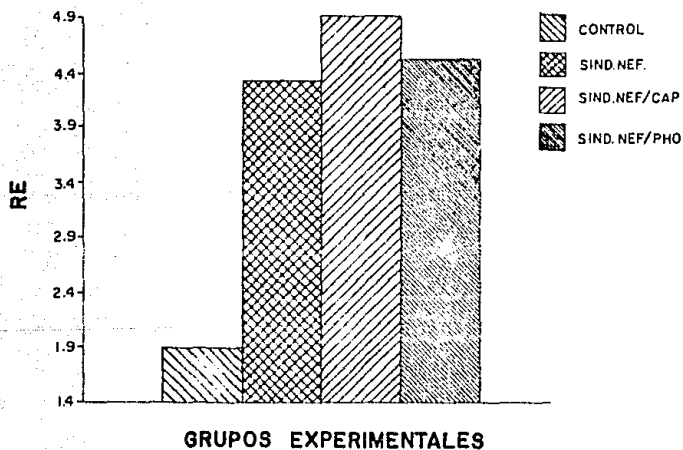
RESISTENCIA EFERENTE (RE)**(dinas/seg/cm⁻⁵) p<0.05**

FIG. 29.

COEFICIENTES DE ULTRAFILTRACION (Kf)
(nl/sag/mmHg) $p < 0.05$

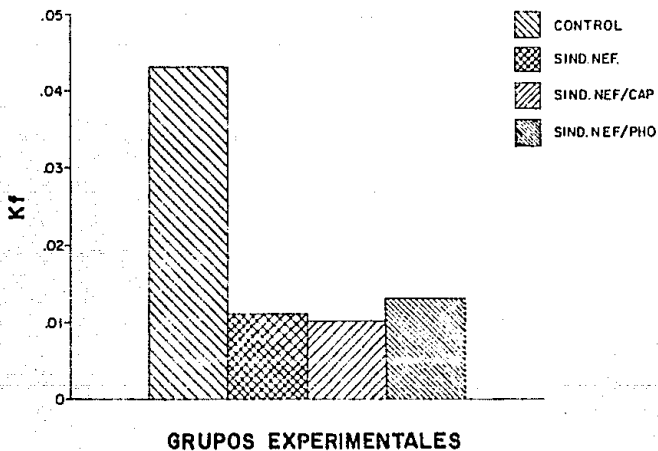


FIG. 30.

(Fig. 29). Tales discrepancias pudieron provocarse por los cambios en la PCG y el PBF, así como por el leve aumento en la TAM, aunque esta modificación no fue representativa (Fig. 23 y 24). La FF no se modificó ya que las presiones oncóticas en los extremos pre y postglomerulares no sufrieron alteraciones. Finalmente el Kf experimentó un notable descenso, el cual a su vez condujo a disminuir la FG/n y la FG total pues se encontró una clara fusión de los podocitos (Fig. 27, 28, 30 y 38).

Debido a que los datos de excreción de sodio, proteínas séricas y urinarias no se completaron por falta de muestras suficientes para todos los grupos, no se muestran estos datos. Sin embargo, se observó que en el día de la micropunción (tercer día), las ratas nefróticas estaban reteniendo sodio mientras que la proteinuria no había aparecido todavía.

4.2. ESTUDIOS MORFOLOGICOS.

El análisis en microscopia de luz no mostró alteraciones importantes, sólo unas asas dilatadas y ligero engrosamiento de las paredes de algunos capilares glomerulares en los tres grupos experimentales SN, SN/IEC y SN/PHO respecto al grupo control (Fig. 31, 32, 33 y 34). La ME reveló una marcada alteración de los procesos podocíticos en los grupos experimentales a comparación del control (Fig. 35, 36, 37 y 38).

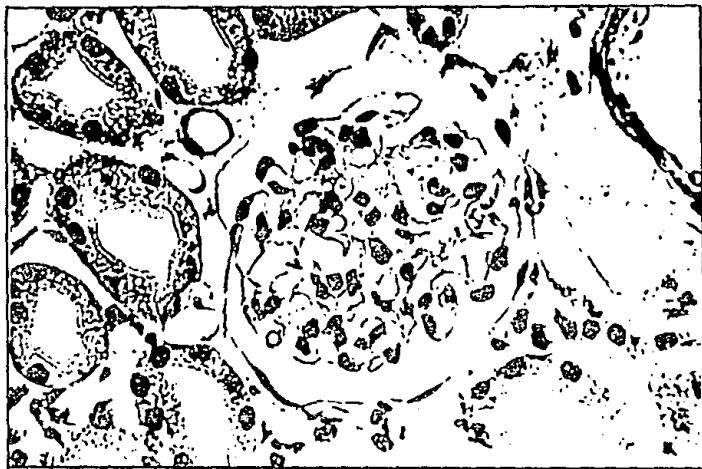


FIG. 31 - Glomérulo normal de una rata control.
H-E X736.

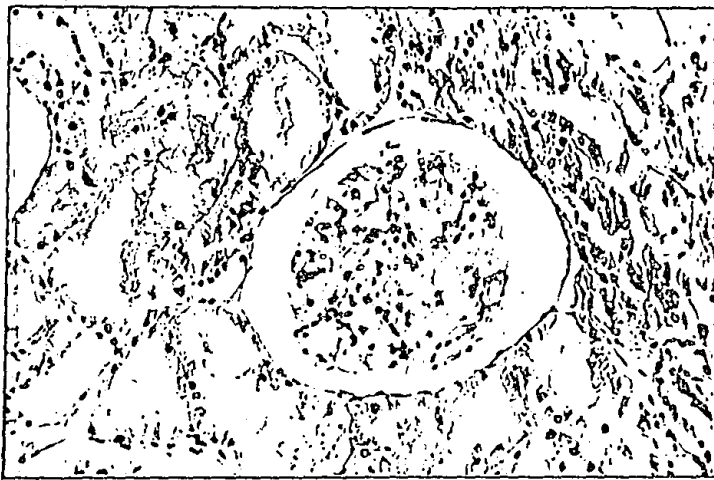


FIG. 32 - Glomérulo de una rata del grupo SN que presenta algunas asas capilares dilatadas. H-E X275.



FIG. 33 - Glomérulo de una rata del grupo SN/C que presenta sólo algunas asas capilares dilatadas. No se observa engrosamiento de las paredes ni hiper celularidad. H-E X680.

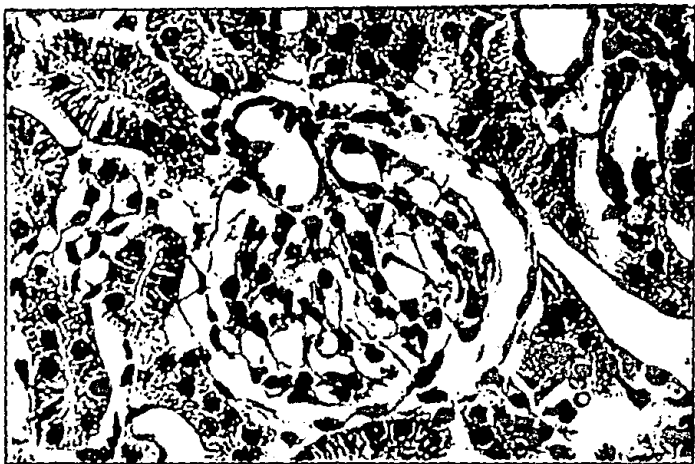


FIG. 34 - Glomérulo de una rata del grupo SN/PHO presentando algunas asas capilares dilatadas. H-E X720.



FIG. 35 - Micrografía electrónica de un glomérulo que muestra una asa capilar con características morfológicas en estado normal correspondiente a una rata del grupo control. X4000.

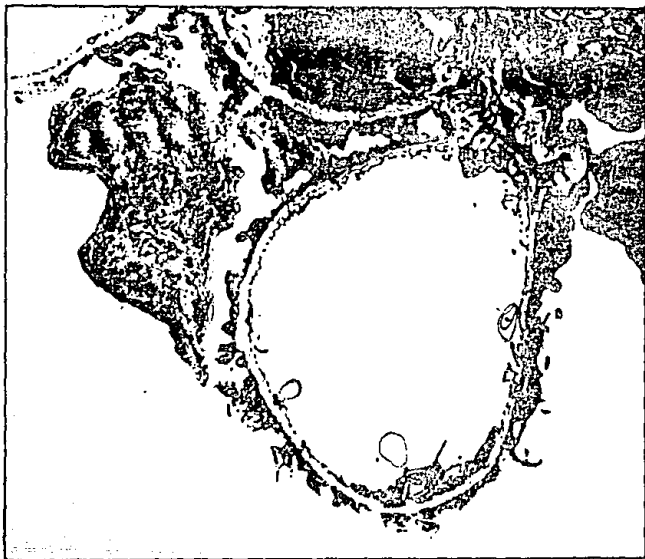


FIG. 36

Micrografía electrónica de un glomérulo que muestra una asa capilar con aplanamiento de podocitos, correspondiente a una rata del grupo SN. X2000.



FIG. 37 - Micrografía electrónica de un glomérulo que muestra una asa capilar con aplanamiento de los procesos podocíticos correspondiente a una rata del grupo SN/C. X3150.

V - DISCUSION

Como lo demostraron los resultados en los grupos experimentales el aminonucleósido de puromicina causó una disminución significativa de la filtración glomerular total y por nefrona, la cual se debió principalmente a una caída del coeficiente de ultrafiltración y a la disminución del flujo plasmático por nefrona. Asimismo, la presión capilar glomerular y el gradiente de presión hidrostática transcápilar aumentaron de manera importante debido a la vasoconstricción preferente de la arteriola eferente. Estos resultados también han sido encontrados por otros autores utilizando el mismo modelo experimental de SN (142). No obstante, estos cambios en los determinantes de la filtración glomerular no pueden explicarse a la acción de la angiotensina II ya que la administración oral de captopril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) no revirtió los cambios en las resistencias aferente y eferente, en la presión capilar glomerular ni en el gradiente de presión hidrostática transcápilar. Estos datos concuerdan con los resultados encontrados por otros autores (143 - 145). Sin embargo, no se puede excluir totalmente la participación de la angiotensina II, pues existen evidencias que sugieren la formación intrarrenal de angiotensina II (146 - 148), la cual podría no haberse suprimido por el captopril, así como su liberación y acción por mecanismos extrarenales que pueden involucrar al sistema nervioso simpático. Se ha demostrado que casi todos los segmentos del nefrón, así como también varios componentes del

aparato yuxtaglomerular reciben una inervación proveniente del sistema nervioso simpático que produce directa o indirectamente cambios en la reabsorción tubular de sodio y el flujo sanguíneo renal (149 - 164). También se ha demostrado que la angiotensina generada localmente ejerce cierto efecto sobre la liberación de norepinefrina y bloquea la recaptación de ésta en las terminaciones nerviosas adrenérgicas. De acuerdo con esto no es posible descartar que la vasoconstricción renal observada en estas ratas con síndrome nefrótico haya sido mediada por estimulación adrenérgica. Por otra parte, tampoco la infusión de plasma hiperoncótico revirtió los cambios en los determinantes de la filtración glomerular sugiriendo que la caída en el coeficiente de ultrafiltración no se debe a relajación mesangial en este modelo. Esto indica que los cambios en el coeficiente de ultrafiltración pueden ser ocasionados por otras alteraciones en los determinantes de este parámetro hemodinámico, que son el área disponible para la filtración y la permeabilidad hidráulica. Parece ser que los cambios en el área disponible para la filtración se deben a alteraciones en los procesos podocíticos, ya que la exploración por microscopía electrónica de los grupos experimentales demostraron una franca fusión y aplanamiento de dichos podocitos a comparación del grupo control. Sin embargo, no se conoce a fondo el mecanismo por el cual el aminonucleósido de puromicina produce esta lesión. Diamond, Bonventre y Karnovsky, estudiaron el metabolismo

del aminonucleósido de puromicina y el papel de los radicales libres de oxígeno en este modelo y encontraron que el alopurinol (un inhibidor de la enzima xantina oxidasa) y la enzima superóxido dismutasa (que metaboliza los iones superóxido a peróxido de hidrógeno) protegen al riñón contra el daño producido por el aminonucleósido de puromicina (126). Sin embargo, se requieren de más estudios para explicar con mayor claridad como se inducen estos cambios durante el metabolismo del aminonucleósido de puromicina y determinar hasta que punto estos cambios estructurales pueden compararse a la contraparte humana del síndrome nefrótico de cambios mínimos.

También, la permeabilidad hidráulica puede estar alterada ya que por medio de trabajos histoquímicos se ha encontrado reducción de las cargas negativas en la barrera de filtración, que están determinadas por la concentración de moléculas de proteoglicanos, sulfato de heparan y de ácido siálico (120, 122, 124, 143).

De acuerdo con estos resultados, es posible que la caída del coeficiente de ultrafiltración en el síndrome nefrótico se deba a cambios estructurales en la barrera de filtración que disminuyen el área disponible para la filtración y la permeabilidad hidráulica. La disminución en el coeficiente de ultrafiltración trae como consecuencia disminución de la filtración glomerular lo cual a su vez promueve la reabsorción de agua y sodio a

nivel del túbulo renal. Parece ser que en el túbulo colector y en la parte terminal del distal se lleva a cabo la reabsorción de sodio y agua (101).

VI - CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se pueden concluir dos puntos importantes:

1. La caída del Kf por ANP es secundaria a cambios estructurales probablemente relacionados con la fusión de podocitos.
2. La retención de sodio en el SN no depende de AII.

VI - BIBLIOGRAFIA

1. Vander AJ: Fisiología renal. México: Mc. Graw Hill; 1986: 1-57.
2. Tisher CC, Madsen KM: Anatomy of the kidney. En: Brenner BM, Rector FC, eds. The kidney. Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 1978: 3-60.
3. Graham RC, Karnovsky MJ: Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. J Exp Med 1966; 124: 1123-1149.
4. Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. J Cell Biol 1967; 35: 213-236.
5. Rennke HG, Cotran RS, Venkatachalam MA: Role of molecular charge in glomerular permeability. J Cell Biol 1975; 67: 638-646.
6. Bohrer MP, Baylis C, Humes HD, Glasscock RJ: Permeability of the glomerular capillary wall. J Clin Invest 1978; 61: 72-78.
7. Brenner BM, Hostetter HT, Humes HD: Glomerular permeability: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. Am J Physiol 1978; 234: F455-F460.
8. Weening JJ, Annemieke V: Effect of decreased perfusion pressure on glomerular permeability in the rat. Lab Invest 1987; 57: 144-149.
9. Brenner BM, Deen WM, Robertson CR: Glomerular filtration. En: Brenner BM, Rector FC, eds. The kidney. Philadelphia: Saunders Co; 1986: 251-271.
10. Kanwar YS: Biology of disease. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. Lab Invest 1984; 51: 7-21.
11. Cantin M: Morphopathology of the renin angiotensin system. En: Genest J, Kuchel O, Hamet P, Cantin M, eds. Hypertension. New York: Mc Graw Hill; 1983: 280-295.
12. Davis JO: The control of renin release. Am J Med 1973; 55: 333-348.
13. Smith HW, Clarke RW: The excretion of inulin and creatinine by the anthropoid apes and other infrahuman primates. Am J Physiol 1938; 122: 132-135.

14. Richards AN, Walker AM: Methods of collecting fluid from known regions of the renal tubules of amphibia and of perfusing the lumen of a single tubule. *Am J Physiol* 1937; 118: 111-120.
15. Brenner BM, Troy JL, Daugharty TM: The dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. *J Clin Invest* 1971; 50: 1776-1780.
16. Gaizutis M, Pesce AJ, Lewy JE: Determination of nanogram amounts of albumin by radioimmunoassay. *Microchem J* 1972; 17: 327-337.
17. Eisenbach GM, Liew JB, Van Boylan JW: Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: a micropuncture study. *Kidney Int* 1975; 8: 80-87.
18. Wiederhielm CA, Woodbury JW, Kirk S, Rushmer RF: Pulsatile pressures in the microcirculation of frog's mesentery. *Am J Physiol* 1964; 207: 173-176.
19. Blantz RC, Tucker BJ: Measurements of glomerular dynamics. En: Martínez-Maldonado, ed. *Methods in Pharmacology*. New York: M Plenum; 1978: 141-163.
20. Brenner BM, Troy JL, Daugharty TM, Deen MW, Robertson CR: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat II. Plasma - Flow dependence of GFR. *Am J Physiol* 1972; 223: 1184-1190.
21. Robertson CR, Deen MW, Troy JL, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat III. Hemodynamics and autoregulation. *Am J Physiol* 1972; 223: 1191-1200.
22. Daugharty TM, Veki IF, Mercer PF, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat V. Response to ischemic injury. *J Clin Invest* 1974; 53: 105-116.
23. Deen WM, Maddox DA, Robertson CR, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat VII. Response to reduced renal mass. *Am J Physiol* 1974; 227: 556-562.
24. Myers BD, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat VIII. Effects of hematocrit. *Circ Res* 1975; 36: 425-435.

25. Gertz KH, Mangos JA, Braun G, Pagel HD: Pressure in the glomerular capillaries of the rat kidney and its relation to arterial blood pressure. *Pflügers Arch Gen Physiol* 1966; 288: 369-374.
26. Gertz KH, Mangos JA, Braun G, Pagel HD: Pressure in the glomerular capillaries of the rat kidney in relation to arterial blood pressure. *Arch Ges Physiol* 1966; 228: 369-373.
27. Baylis C, Brenner BM: The physiologic determinants of glomerular ultrafiltration. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1978; 80: 1-46.
28. Landis EM, Pappenheimer JR: Exchange of substance through the capillary wall. En: Orloff J, Berliner R, eds. *Handbook of physiology circulation*. Washington DC: American Physiological Society; 1961: 961-1034.
29. Smith HW, Chassis H, Goldring W, Ranges HA: Glomerular dynamics in the normal human kidney. *J Clin Invest* 1940; 19: 751-764.
30. Deen WM, Troy JL, Robertson CR, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat IV. Determination of the ultrafiltration coefficient. *J Clin Invest* 1973; 52: 1500-1508.
31. Chang RLS, Deen WM, Robertson CR, Bennett CM, Glascock RJ, Brenner BM: Permeability of the glomerular capillary wall studies of experimental glomerulonephritis in the rat using neutral dextran. *J Clin Invest* 1976; 57: 1272-1286.
32. Edwards RM: Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *Am J Physiol* 1983; 244: F526-F534.
33. Ichikawa I, Kon V: Glomerular mesangium as an effector locus for the tubuloglomerular feedback system and renal sympathetic innervation. *Fed Proc* 1983; 42: 3075-3079.
34. Hermansson K, Larson M, Källskog O, Wolgast M: Influence of renal nerve activity on arteriolar resistance, ultrafiltration dynamics and fluid reabsorption. *Pflügers Arch* 1981; 389: 85-90.
35. Kon V, Ichikawa I: Effector loci for renal nerve control of cortical microcirculation. *Am J Physiol* 1983; 245: F545-F553.

36. Ausiello DA, Kreisberg JJ, Roy C, Karnovsky MJ: Contraction of cultured rat glomerular mesangial cells after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *J Clin Invest* 1980; 65: 754-760.
37. Mahieu PR, Foidart JB, DuBois CH, Dechenne CA, Deheneffe J: Tissue culture of normal rat glomeruli: contractile activity of the cultured mesangial cells. *Invest Cell Pathol* 1980; 3: 121-128.
38. Kreisberg JI, Karnovsky MJ: Isolation and characterization of GEC in vitro. *Kidney Int* 1978; 14: 21-30.
39. Peased DC: Myoid features of renal corpuscles and tubules. *J Ultrastruct Res* 1968; 23: 304-320.
40. Schiondorff D, Rocznik S, Satriano J, Folkert V: Prostaglandin synthesis by isolated rat glomeruli: effect of angiotensin II. *Am J Physiol* 1980; 238: F486-F495.
41. Torres VE, Northrup TE, Edwards RM, Shah SV, Dousa TP: Modulation of cyclic nucleotides in isolated rat glomeruli. *J Clin Invest* 1978; 62: 1334-1343.
42. Brown JJ, Casals-Stenzel J, Cumming AMM, Davis DL, Frase R, Lever AF, Morton JJ, Sample PF, Tree M, Robertson JIS: Angiotensin II, aldosterone and arterial pressure: a quantitative approach. *Hypertension* 1979; 1: 159-179.
43. Guyton AC: Arterial pressure and hypertension. Philadelphia: PA Saunders; 1980.
44. Lee MR: The renin angiotensin system. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12: 605-612.
45. Skeggs LT, Dorer FE, Levin M, Lentz KE, Khan JR: The biochemistry of renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med* 1976; 60: 737-748.
46. Pedraza J, Ibarra ME, Cruz C, Tapia E: Mensajeros intracelulares de la secreción de renina. *Rev Invest Clin (Mex)* 1989;41: 165-168.
47. Lindop GBM: Morphological aspects of renin synthesis, processing, storage and secretion. *Kidney Int* 1987; 20: S18-S24.

48. Richerd N: Cellular biology of the renin angiotensin systems. Arch Intern Med 1984; 144: 2037-2041.
49. Ballerman BJ, Levenson DJ, Brenner EM: Renin angiotensin, kinins, prostaglandins and leukotrienes. En Brenner EM, Rector FC, eds. The kidney. Philadelphia: WB Saunders Co; 1986: 281-340.
50. Morris BJ, Cantazaro DF, Hardman J, Mesterovic N, Teallam J, Hort Y, Bennets BH, Shime J: Structure of human renin and expression of the renin gene. Clin Exp Pharmacol Physiol 1984; 11: 369-373.
51. Galen FX, Devaux C, Houot AM, Menard J, Corvol P, Corvol MT, Gubler MC, Mounier F, Camilleri JP: Renin biosynthesis human tumoral juxtaglomerular cells. Evidences for a renin precursor. J Clin Invest 1984; 73: 1144-1155.
52. Keeton TK, Campbell DJ: The pharmacological alteration of renin release. Pharmacol Rev 1980; 32: 81-227.
53. Tewksbury DA: Angiotensinogen. En: Soffer RI ed. Biochemical regulation of blood pressure. New York: Wiley; 1981: 95-120.
54. Campbell DJ, Bouhnik J, Menard J, Corvol P: Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. Nature 1984; 308: 206-208.
55. Nasjletti A, Masson GMC: Stimulation of angiotensinogen formation by renin and angiotensins. Proc Soc Exp Biol Med 1973; 142: 307-310.
56. Murakami E, Hiwada K, Kokubu T: Effects of insulin and glucagon on production of renin substrate by isolated rat liver. J Endocrinol 1980; 85: 151-153.
57. Weigand K, Wernze H, Falge C: Synthesis of angiotensinogen by isolated rat liver cells and its regulation in comparison to serum albumin. Biochem Biophys Res Commun 1977; 75: 102-110.
58. Mounier F, Hinglais N, Sich M, Gros F, Lacoste M, Deris Y, Alhenc-Gelas F, Gluber M-C: Ontogenesis of angiotensin-I converting enzyme in human kidney. Kidney Int 1987; 32: 684-690.

59. Vallotton MB: The renin-angiotensin system. *Pharmacol. Sci* 1987; 8: 69-74.
60. Cushman DW, Ondetti MA: Inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Prog Med Chem* 1980; 174: 41-104.
61. McCaa RE, Hall JE, McCaa CS: The effect of angiotensin-I converting enzyme inhibitors on arterial blood pressure and urinary sodium excretion. *Cir Res* 1978; 43 Supp I: 132-139.
62. Ondetti MA, Cushman DW: Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological actions. *Critical Rev* 1982; 16: 381-409.
63. Zusman RM: Effects of converting-enzyme inhibitors on the renin-angiotensin-aldosterone, bradykinin and arachidonic acid-prostaglandin system: correlation of chemical structure and biologic activity. *Am J Kydney Dis* 1987; 10 Supp 1: 13-23.
64. Ng KKF, Vane JR: Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 1967; 215: 762-766.
65. Soffer RL: Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu Rev Biochem* 1976; 45: 73-94.
66. Hall JE: Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1986; 250: R960-R972.
67. Mc Giff JC: Natriuretic effect of angiotensin in dogs revealed after administration of reserpine and guanethidine. *Circ Res* 1967; 20: 644-675.
68. Blantz RC: The glomerular and tubular actions of angiotensin II. *Am J Kidney Dis* 1987; 10 Supp 1: 2-6.
69. Blantz RC, Gabbai FB: Effect of angiotensin II on glomerular hemodynamics ultrafiltration coefficient. *Kidney Int* 1987; 31 Supp 20: S108-S111.
70. Phillips MI: Functions of angiotensin in the central nervous system. *Am Rev Physiol* 1987; 49: 413-435.

71. Dunn MJ, Scharschmidt LA: Prostaglandins modulate the actions of angiotensin II. *Kidney Int* 1987; 31 Supp 20: S95-S101.
72. Arnell GC: The nephrotic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 1971; 18: 547-560.
73. Seggie J, Davies PG, Ninin D, Henry J: Patterns of glomerulonephritis in Zimbabwe: survey of disease characterized by nephrotic proteinuria. *QJ Med* 1984; 53: 109-118.
74. Morgan AG, Shah DJ, Williams W, Forrester TE: Proteinuria and glomerular disease in Jamaica. *Clin Nephrol* 1984; 21: 205-209.
75. Chung J, Habib R, White RHR: Pathology of the nephrotic syndrome in children: a study for the international study of kidney disease in children. *Lancet* 1970; 1: 1299-1302.
76. White RHR, Glasgow EF, Mills RJ: Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 1970; 1: 1353-1358.
77. Cameron JS, Turner DR, Ogg CS, Sharpsto P, Brown CB: The nephrotic syndrome in adults with "minimal change glomerular lesion". *QJ Med* 1974; 43: 461-470.
78. International study of kidney disease in children. Nephrotic syndrome: Prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. *Kidney Int* 1978; 13: 159-165.
79. Danielsen H, Kornerup HJ, Olsen S: Arterial hypertension in chronic glomerulonephritis. An analysis of 310 cases. *Clin Nephrol* 1983; 19: 284-287.
80. Soothill T: HLA antigens and atopic features in steroid response nephrotic syndrome of childhood. *Lancet* 1970; 9: 284-301.
81. Glasscock RJ, Alder SG, Ward HJ, Cohen AHM: Primary glomerular diseases. In: Brenner BM, Rector FC, eds. *The kidney*. Philadelphia: Saunders Co; 1986: 929-1013.
82. Grupe WE: Minimal change disease. *Seminars nephrol* 1982; 2: 241-243.
83. Rieeves WG, Cameron JS, Ogg CS: Seasonal nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1973; 3: 412-416.

84. Meadow SR, Sarsfield JK, Scott DC, Rajah SM: Steroid-response nephrotic syndrome and allergy: immunological studies. *Arch Dis Child* 1981; 56: 517-524.
85. Churg J, Crishman E, Goldstein M, Yunis A, Porush JG: Idiopathic nephrotic syndrome in adults: a study and classification based on renal biopses. *N Eng J Med* 1965; 272: 165-174.
86. Habib R, Keinknecht C, eds. The primary nephrotic syndrome of childhood. Classification and clinicopathologic study of 406 cases. New York: Pathol Annu Summers S. C.; 1971: 10-57.
87. Kincaid-Smith P ed. The kidney. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975: 13-25.
88. Bernard DB, Alexander EA: Edema formation in the nephrotic syndrome: Pathophysiologic mechanisms. *Cardiovasc Med* 1979; 4: 605-625.
89. Dorhout Mees EJ, Roos JC, Boer P, Oel HY, Simutapang TA: Observations on edema formation in the nephrotic syndrome in adults with minimal lesions. *Am J Med* 1979; 67: 378-384.
90. Van Liew JB, Noble B, Brentjens JR: Absence of sodium and water retention in rats with severe proteinuria. *Nephron* 1985; 40: 476-481.
91. Bernard DB: Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988; 33: 1184-1202.
92. Fadney HD, Pape JF, Sudsfjord JA: A study on edema mechanisms in nephrotic syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46: 533-538.
93. Boer P, Roos JC, Geyskes GG, Dorhout Mees EJ: Observations on plasma renin substrate in the nephrotic syndrome. *Nephron* 1980; 26: 121-125.
94. Hammond TG, Whitworth JA, Saines D, Thatcher R, Andrews J, Kincaid Smith P: Renin - angiotensin - aldosterone system in nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 1984; 4: 18-23.

95. Brown EA: The nephrotic syndrome. *Postgrad Med J* 1985; 61: 1057-1062.
96. Dising R, Vetter H, Kramer HJ: The renin-angiotensin - aldosterone system with nephrotic syndrome. *Nephron* 1980; 25: 187-192.
97. Brown EA, Markandu ND, Roulston JE, Jones BE, Squires M, Mac Gregor GA: Is the renin-angiotensin-aldosterone system involved in the sodium retention in the nephrotic syndrome?. *Nephron* 1982; 32: 102-107.
98. Brown EA, Markandu ND, Squires M, Sagnella GA, Jones BA, Mac Gregor GA: Evidence that some mechanisms other than the renin system causes sodium retention in nephrotic syndrome. *The Lancet* 1982; 4: 1237-1239.
99. Brown EA, Markandu N, Sagnella GA, Jones BE, Mac Gregor GA: Sodium retention in nephrotic syndrome is due to an intrarenal defect evidence from steroid-induced remission. *Nephron* 1985; 39: 290-295.
100. Pedraza-Chaverrí J, Romero L, Ibarra ME, Chávez MT, Sánchez MC, Cruz C, Peña JC: Caracterización del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) en el síndrome nefrótico (SN). Libro de resúmenes del XVI Congreso Nacional de Bioquímica. Jalapa Ver.: Sociedad Mexicana de Bioquímica. A. C. Universidad Veracruzana; 1986: 152.
101. Ichikawa I, Rennke HG, Hoyer JR, Badr KF, Schor N, Troy JL, Lechene CP, Brenner EM: Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1983; 71: 91-103.
102. Brenner EM, Coe FL, Rector FC, eds. *Renal physiology in health and disease*. Philadelphia: Saunders; 1987: 36-66.
103. Messina A, Davies J, Dillane PC, Ryan GB: Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Am J Physiol* 1987; 126: 220-229.
104. Orci L, Kunz A, Amherdt M, Brown D: Perturbation of podocyte plasma membrane domains in experimental nephrosis. *Am J Physiol* 1984; 117: 286-297.

105. Andrews PM: A scanning and transmission electron microscopic comparison of puromycin aminonucleoside induced nephrosis to hyperalbuminemia induced proteinuria with emphasis on kidney podocyte pedicel loss. *Lab Invest* 1977; 36: 183-196.
106. Bohman S-O, Jaremko G, Bohlin A-B, Berg U: Foot process fusion and glomerular filtration rate in minimal change nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1984; 25: 696-700.
107. Lelongt B, Makino H, Kanwar YS: Status of glomerular proteoglycans in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1987; 31: 1299-1310.
108. Klein DJ, Dehnel PJ, Oegema TR, Brown DM: Alterations in proteoglycan metabolism in the nephrotic syndrome induced by aminonucleoside of puromycin. *Lab Invest* 1984; 50: 543-551.
109. Groggel GC, Border WA, Hovingh P, Linker A: Changes in glomerular heparan sulfate in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987; 128: 521-527.
110. Kaysen GA, Myers BD, Couser WG, Rabkin R, Felts JM: Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab Invest* 1986; 54: 479-498.
111. Heyman W, Lund HZ: Nephrotic syndrome in rats. *Pediatr* 1951; 7: 691-706.
112. Frenk S, Antonowicz I, Craig JM, Metcalf J: Experimental nephrotic syndrome. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955; 89: 424-427.
113. Marsh JB, Drabkin DL: Metabolic channeling in experimental nephrosis II. Lipid metabolism. *J Biol Chem* 1955; 212: 633-639.
114. Fielgelson EB, Drake JW, Recant L: Experimental aminonucleoside nephrosis. *J Lab Clin Med* 1957; 50: 437-446.
115. Bertoni T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thova Y, Mecca G, Donati MB: Adiamycin-induced nephrotic syndrome in rats: secunense of pathologic events. *Lab Invest* 1982; 46: 16-23.
116. Morisaki N, Matsuoka N, Saito Y, Kumagai A: Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism* 1984; 33: 405-410.

117. Vernier RL, Klein DJ, Sisson SP, Mahan JD, Oegama TR, Brown DM: Heparan sulfate rich anionic sites in the human glomerular basement membrane. Decreased concentration in congenital nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1983; 309: 1001-1009.
118. Bennet CM, Glasscock RJ, Change RLC, Deen WM, Robertson CR, Brenner EM: Perm-selectivity of the glomerular capillary wall: studies of experimental glomerulonephritis in the rat using dextran sulfate. *J Clin Invest* 1976; 57: 1287-1294.
119. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner EM: Mechanism of the puromycin induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1977; 60: 152-161.
120. Brenner EM, Hostetter TM, Humes D: Molecular basis of proteinuria of origin glomerular. *N Engl J Med* 1978; 298: 826-833.
121. Ryan GB, Karnovsky MJ: An ultrastructural study of the mechanism proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975; 8: 219-232.
122. Olson JL, Renne H, Venkatachalam MA: Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab Invest* 1981; 44: 271-279.
123. Caulfield JP, Farquhar MG: Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1984; 39: 613-618.
124. Kanwar YS, Jakubowski ML: Unaltered anionic sites of glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1984; 25: 613-618.
125. Kerjaschi D, Vernillo A, Farquhar MG: Reduced sialylation of podocalyxin, the major sialoprotein of rat kidney glomerulus in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1985; 118: 343-349.
126. Diamond JR, Bon Ventre JV, Karnovsky MJ: A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986; 29: 478-483.
127. Beaman M, Birtwistle R, Howie AJ, Michael J, Adu D: The role of

- superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 1987; 73: 329-332.
128. Elmer M, Eskildsen PC, Kristensen LO, Leyssac PP: A comparison of renal function in rats anesthetized with inactin and sodium amytal. *Acta Physiol Scand* 1972; 86: 41-49.
129. Cortell ST, Davidman M, Gennari FJ: Catheter size as a determinant of out flow resistance and intrarenal pressure. *Am J Physiol* 1972; 223: 910-915.
130. Lang F, Gregor R: Micropuncture techniques. Cap 4. 75-103.
131. Franco M, Tapia E, Gabbai F, Cerneño JL, Calleja C, Pérez JM, Barrios R, Torres G, González FJ, Alvarado JA: Alteración de la permeabilidad glomerular en hipertensión renovascular. Participación de angiotensina y lesiones estructurales. *Arch Inst Cardiol Méx* 1986; 56: 13-24.
132. Vurek GG, Pergram SE: Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin. *Anal Biochem* 1966; 16: 409-419.
133. Windholz M, Budavari S, Blumetti RF, Otterbein ES: *The Merck Index*. U.S.A. 1983; 3235.
134. Viets JW, Deen WM, Troy JC, Brenner BM: Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or phthalaldehyde. *Anal Biochem* 1978; 88: 513-521.
135. Davison WD, Sackne M: Simplification of the anthrone method for determination of inulin clearance studies. *J Lab Clin Med* 1963; 62: 351-356.
136. Estrada E, Peralta L, Rivas P: *Manual de técnicas histológicas*. México: AGT; 1982: 140.
137. *Users library solutions. Test statistics*. Hewlett-Packard. HP-41, 55.

138. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980; 47: 1-9.
139. Siegel S: Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. México: Trillas; 1986: 12-26.
140. Hollander M, Wolfe DA: Nonparametric statistical methods. Oxford: Wiley; 1973: 51-77.
141. Miller RG: Simultaneous statistical inference. New York: Mc Graw Hill; 1966: 165-172.
142. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner EM: Mechanism of puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1983; 60: 152-161.
143. Brown EA, Markandu ND, Sagnella GA, Jones BE, MacGregor GA: Lack of effect of captopril on the sodium retention of the nephrotic syndrome. *Nephron* 1984; 37: 43-48.
144. Radin MJ, Wilke WL, Fettman MJ: Effect of captopril on chronic puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *J Pharmacol* 1986; 54: 279-282.
145. Cruz-Rivera C: Efecto del captopril (SQ14-225) sobre el desarrollo del síndrome nefrótico experimental en ratas. Tesis de licenciatura. México: UNAM Facultad Ciencias; 1988: 72-83.
146. Mendelsohn FAO: Evidence for the focal occurrence of angiotensin II in the rat kidney and its modulation by dietary sodium intake and converting enzyme blockade. *Clin Sci Lond* 1979; 57: 173-179.
147. Mendelsohn FAO: Angiotensin II: evidence for its role as an intrarenal hormone. *Kidney Int* 1982; 22 Supp 12: 578-581.
148. Frega NS, Davalos M, Leaf A: Effect of endogenous angiotensin on the efferent glomerular arteriole of rat kidney. *Kidney Int* 1980; 18: 323-327.
149. Barajas L: Inervation of the renal cortex. *Fed Proc* 1978; 37: 1192-1201.

150. Barajas L: Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *AM J Physiol* 1979; 237: F333-F343.
151. Barajas L, Powers K, Wang P: Innervation of the renal cortical tubules: a quantitative study. *Am J Physiol* 1984; 247: F50-F60.
152. Barajas L, Wang P, Powers K, Mishio S: Identification of renal neuroeffector junctions by electron microscopy of reembedded light microscopic autoradiograms of semithin sections. *J Ultrastruct Res* 1981; 77: 379-385.
153. DiBona GF, Sawin LL: Effect of renal nerve stimulation on NaCl and water transport in Henle's loop of the rat. *Am J Physiol* 1982; 243: F576-F580.
154. DiBona GF, Sawin LL: Renal nerves in renal adaptation to dietary sodium restriction. *Am J Physiol* 1983; 245: F322-F328.
155. DiBona GF, Sawin LL: Role of renal nerves in exaggerated natriuresis of experimental hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 182: 43-51.
156. DiBona GF, Sawin LL: Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am J Physiol* 1985; 248: F15-F23.
157. Gottschalk CW: Renal nerves and sodium excretion. *Annu Rev Physiol* 1979; 41: 229-240.
158. Thames MD, DiBona GF: Renal nerves modulate the secretion of renin mediated by non-neural mechanisms. *Circ Res* 1979; 44: 645-652.
159. Ferrario CM, Gildenberg PC, McCubbin JW: Cardiovascular effects of angiotensin mediated by the central nervous system. *Circ Res* 1972; 30: 257-262.
160. Zimmerman BG: Adrenergic facilitation by angiotensin: does it serve a physiological function?. *Clin Sci Lond* 1981; 60: 343-348.
161. DiBona GF: The functions of the renal nerves. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1982; 94: 75-181.
162. DiBona GF: Neural regulation of renal tubular sodium reabsorption

and renin secretion. Fed Procc 1985; 44: 2816-2822.

163. Badder EMB, Duarte B, Seaton JF, Hamaji M, Harrison TS: Angiotensin II restoration of reflex adrenal medullary secretion to anephric dogs is physiologically dose dependent. Endocrinology 1985; 117: 1920-1929.
164. McGiff JC, Fasy TM: The relationship of the renal vascular activity of angiotensin II to the autonomic nervous system. J Clin Invest 1965; 44: 1911-1923.