

Autorregulación renal: Nuevos aportes sobre el funcionamiento del aparato yuxtaglomerular.

GONZALEZ-ENDERS Ernesto*

*Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

CONSIDERACIONES HISTORICAS

Estudios morfológicos. Bartolomé Eustaquio debe ser acreditado como el descubridor de los tributarios renales (1). Pero clásicamente se le adscribe este hecho a Lorenzo Bellini, sin embargo fue sólo en 1662 cuando éste describió e ilustró los conductos colectores recorriendo el parénquima renal desde su parte más externa hacia la pelvis renal (2). De allí que las partes terminales de los conductos colectores también se les denomina conductos de Bellini.

El más insigne contribuyente al desarrollo del conocimiento de la estructura del riñón es sin duda alguna Marcelo Malpighi (3). En 1666, describió la estructura de varias vísceras, incluyendo al riñón (4). Distinguió las zonas cortical y medular renales, reconociendo en la corteza a las estructuras conocidas ahora como glomérulos y túbulos contorneados y en la médula a los túbulos rectos que viajaban hacia la papila y se vaciaban en la pelvis, ya descritos por Bellini.

En 1781, el Abad Felice Fontana (E. González, investigación histórica no publicada, realizada con ayuda de la Biblioteca Central de la Universidad de Lund y de la Biblioteca de Biología Animal de la Universidad de Florencia), describe por primera vez asas tubulares en la médula renal que más tarde se llamarían asas de Henle, pero no se le reconoce este descubrimiento, sino a este último (5). Malpighi fue incapaz de establecer la conexión entre el glomérulo y los túbulos renales, y es recién William Bowman, 200 años después, quién describe esta unión (6). Bowman no conoció los estudios de Fontana y fue Jacobo Henle quien, ya con mejores técnicas microscópicas y conociendo las incipientes descripciones de Fontana (7), detalla las asas medulares en forma de horquilla de pelo de los túbulos uriníferos (8). Las conexiones con los túbulos contorneados corticales, de las ramas ascendente y descendente de las asas medulares fueron descritas por Franz Schweigger-Seidel (9).

El aparato yuxtaglomerular (AYG) está situado donde la porción gruesa ascendente del asa de Henle (cTAL) hace contacto con el glomérulo del mismo nefrón. El retorno del túbulo a su propio glomérulo fué inicialmente descrito hace más de 100 años por Camilo Golgi (10) y no por Karl Peter (11) como clásicamente se conocía. El profesor italiano Romiti así lo menciona en la discusión del trabajo de Peter y es solo recientemente cuando Taugner v Hackenthal (12) le reconocen a Golgi la autoría del descubrimiento.

Funciones renales básicas. En 1843 Carl Ludwig propuso que la orina se formaba mediante un proceso pasivo de ultrafiltración a nivel del glomérulo renal (13). El también propuso que las diferencias entre la composición de la orina y la sangre eran debidas a un proceso de reabsorción de sustancias que ocurrían en los túbulos renales. No propuso ninguna actividad secretoria a nivel tubular. En 1906 Rudolf Metzner, que fué asistente de Ludwig, enfatizó que un proceso activo tomaba parte en el proceso reabsortivo (14). Más aún, el análisis de los datos de función renal que habían hasta esa época, lo llevó a concluir que la formación de orina podía explicarse mejor si la definíamos como un proceso constituido por tres componentes: ultrafiltración de un gran volumen de líquido a nivel glomerular; reabsorción activamente realizada por el epitelio tubular de la mayoría del líquido y soluto filtrados; y secreción también activamente realizada por este mismo epitelio tubular de ciertos componentes urinarios. Entonces Metzner, fué el primero en proponer una teoría de formación de orina más completa y considerablemente más cercana a nuestros conceptos actuales, como los que fueron primeramente publicados algunos años más tarde por Cushny en su “Teoría Moderna” (15). Sin embargo no fué sino hasta 1924 cuando Wearn y Richards confirmaron que el líquido dentro del espacio de Bowman es un ultrafiltrado del plasma (16).

Al final de los años 50, ocurrieron excitantes desarrollos en fisiología renal. El desarrollo y aplicación de las técnicas de depuración (clearance) en el riñón intacto (17,18,19,20) aumentaron tremendamente el conocimiento de la función renal. Por lo demás, estudios bien diseñados de depuración y sus modificaciones ó técnicas de flujo detenido (stop flow) e inyección instantánea aun contribuyen a comprender la función renal (21,22,23,24). Sin embargo debemos reconocer las limitaciones de los estudios de depuración en la medida que la respuesta a ciertas preguntas sólo se consiguieron por evaluación directa de la función del nefrón al desarrollarse y aplicarse las técnicas de micropunción in vivo tanto en anfibios como en mamíferos(25,26). Ocioso es decir que la micropunción ha sido y aun permanece como una herramienta investigativa poderosa (27,28). Las técnicas de micropunción y depuración, aunque tienen ciertas ventajas, tienen también una limitación muy importante: la inaccesibilidad para estudiar directamente todos los segmentos del nefrón.

También existe un cierto número de métodos para estudiar el tejido renal *in vitro*. Uno de ellos es el de la utilización de rebanadas de tejido renal. Aunque se ha hecho un considerable trabajo con las rebanadas, surgen muchos problemas con su uso, debido a que frecuentemente las rebanadas tienen un grosor de 0.5 mm o más, por lo que ellas en su centro, son generalmente hipóxicas o anóxicas y el retardo temporal para la difusión de sustancias dentro de ellas complica cualquier análisis cinético (29). Pero a pesar de esta desventaja, tienen una ventaja muy atractiva y es que las células dentro de las rebanadas son extraordinariamente resistentes, sobreviviendo toda suerte de abusos experimentales tales como anoxia, hipotermia, inmersión en soluciones bizarras y tóxicos químicos sin perder la capacidad de mantener grandes gradientes transcelulares de sodio, potasio, cloro, ácidos orgánicos, etc. Todo esto confirma que el tejido renal es capaz de sobrevivir bastante bien en preparaciones *in vitro*.

Paralelamente con el desarrollo de las técnicas mencionadas, se realizó un importante trabajo en la fisiología del transporte, usando membranas epiteliales *in vitro*, como puede ejemplificarse con los estudios realizados en piel de anfibios que sin duda son ampliamente conocidos y calificados (30,31,32,33). Por esa misma época, los neurofisiólogos penetraron axones gigantes de calamar usando electrodos y abrieron la ruta para el conocimiento del potencial de acción. En 1933, Robert Chambers y Rudolf T. Kempton demostraron que fragmentos de túbulos mesonéfricos de riñones embrionarios podían sobrevivir y funcionar *in vitro* (34). Subsecuentemente esta preparación de túbulos separados ha sido productivamente utilizada por muchos otros investigadores (35,36). Como los axones son células individuales y aisladas en vez de tubos de células epiteliales y como eran mucho más grandes que los túbulos renales, el éxito con los axones fué bien conocido, y a la vez permitió otro avance técnico fundamental asociado al hecho de que los túbulos renales podían ser aislados o separados por disección y/o tratamiento enzimático: segmentos individuales de nefrón podían ser profundidos *in vitro* (35,37).

Autorregulación renal. El término historia en el contexto del mecanismo de retroalimentación túbuloglomerular (RTG) implica que ciertos desarrollos, observaciones y acciones, cada una de ellas no relacionadas en el tiempo, y hechas u ocurridas por azar, crearon las bases para el nuevo concepto de regulación de la tasa de filtración glomerular (TFG) a través del mecanismo de RTG. Diferentes técnicas y herramientas hicieron posible probar este concepto en una forma experimental, de manera que el concepto se hizo un principio identificado y un elemento funcional aceptado que actúa en cada nefrón y que contribuye a la función integrada del glomérulo y el túbulo. El desglosar las características individuales de cada nefrón indicó que el sistema vascular del riñón, incluyendo el sistema glomerular y el sistema tubular, que habían sido descritos como entidades aisladas, interactuaban más estrechamente que lo previamente anticipado y que la hemodinámica glomerular y la dinámica de filtración funcionaban en armonía con el sistema tubular (38,39).

Uno de los fenómenos más estudiados de aquellos años fue la autorregulación renal. Se determinó que la regulación del flujo sanguíneo era concomitante con la regulación de la TFG. La pregunta era entonces: porqué la TFG es constante, porqué la carga tubular de líquido filtrado y solutos se mantiene constante. Con el conocimiento creciente de los mecanismos tubulares para reabsorber el líquido y los solutos filtrados, se aclaró que el paso metabólicamente limitado en el proceso de recambio de fluido en el riñón (líquido filtrado y líquido reabsorbido) es la reabsorción de líquido tubular, dependiendo del complemento energético celular presente. Al conocerse esto, se estableció el término “capacidad reabsortiva tubular” indicando que el nefrón tiene una capacidad limitada para reabsorber el filtrado. Como consecuencia de esto, se requirió de un mecanismo para ajustar la cantidad de filtrado glomerular a la capacidad reabsortiva tubular. Tal mecanismo requiere una retroalimentación de información desde el sistema tubular al sistema glomerular.

El concepto presente de un control de RTG de la TFG fue formulado por primera vez en 1963 durante el II Congreso Internacional de la Sociedad de Nefrología realizado en Praga (40). Las bases estructurales para tal sistema de control habían sido observadas en los años 30. Durante este periodo varios observadores ofrecieron diversos hallazgos estructurales del

AYG como intrigantes pistas a las relaciones funcionales entre túbulo renales, glomérulos y vasos sanguíneos. Era un hecho ya conocido desde hacía algún tiempo que cada túbulo distal está estrechamente unido al polo vascular del glomérulo del mismo nefrón. La existencia de esta relación entre túbulo distales y glomérulos había sido apreciada primariamente por Golgi (10); sin embargo, las claras descripciones de la regularidad del contacto túbulo distal-glomérulo hechas por Peter (11,41) eliminaron toda duda. Peter mostró que el túbulo retorna a su propio glomérulo de tal manera que la porción ascendente tubular hace contacto con los vasos glomerulares. También indicó que el epitelio del túbulo en la región inmediata de contacto es de características similares a la porción ascendente del asa de Henle más que a la de un verdadero túbulo contorneado distal. Peter además mostró que la porción contorneada del túbulo distal empezaba unos cuantos cientos de micras después de la región de contacto. La evidencia electromicroscópica confirmando esta conclusión acerca de la localización de la transición entre las porciones recta y contorneada del túbulo distal ha sido presentada sólo recientemente (42,43).

Las bases estructurales para este sistema de control fueron primeramente descritas por Ruyter (44). El descubrió que algunas células en la pared de la arteriola aferente, diferían del resto de células musculares lisas, y las describió como células mioepitelioideas, dado que ellas provenían de estas mismas células musculares, sugiriendo además que podían jugar un rol en controlar el flujo sanguíneo renal. Okkels y Peterfi realizaron lo que probablemente constituye el primer experimento con un AYG aislado (45). Usando un micromanipulador, estimularon mecánicamente diferentes elementos vasculares en y cerca de los glomérulos de un riñón de rana. Los capilares glomerulares no reaccionaron cuando fueron tocados, sin embargo, los vasos que estaban inmediatamente afuera del glomérulo respondieron a la estimulación mecánica contrayéndose. Esto les hizo concluir que el AYG podría jugar un rol en la regulación local del flujo sanguíneo.

Zimmerman (46) describió el grupo especializado de células epiteliales en la pared de la porción cortical gruesa ascendente recta del asa de Henle, que están en contacto con el glomérulo y acuñó para ellas el término macula densa (MD). Por esta misma época, Zimmerman (46) y Goormaghtigh (47), profesor de patología en la Universidad de Gante, independientemente describieron el grupo vecino de células que están apiladas en capas entre el túbulo distal y los vasos aferente y eferente. Cinco años más tarde, especulando acerca de la significación funcional de estas estructuras vasculares y tubulares, Goormaghtigh (48) las refirió como el *appareil juxta-glomerulaire* (AYG) y postuló un rol funcional para la MD. Literalmente, él sugirió, que la macula densa puede servir como “una placa sensora colocada más adelante del glomérulo donde pudiera regular automáticamente la circulación glomerular de acuerdo a....el estado físico-químico de la orina que pasaba por allí”. Seguidamente McManus (49) evidentemente estuvo de acuerdo con esta posibilidad y sugirió a los futuros micropunturistas que “algunos experimentos del tipo hecho por Richards (16) pudieran determinar la condición en el túbulo distal, sea química o hidrostática, que afecta el flujo a través del glomérulo”. Más de 25 años tuvieron que pasar antes que los fisiólogos pudieran recoger esta Sugerencia.

El arreglo de los componentes del AYG sugirió a muchos observadores que no sólo la MD puede estar en capacidad de controlar el flujo sanguíneo renal (FSR) y TFG, sino que también el AYG podría tener una función endocrina. Observando que las células anulares

en las arteriolas glomerulares eran más numerosas en cortes histológicos de riñones isquémicos, Goormaghtigh (50,51,52,53) postuló que estas células eran el sitio de formación y secreción de material hipertensivo renal ahora conocido ser la renina (54,55).

Túbulos renales aislados. Aunque la microperfusión *in vitro* tiene sus propias limitaciones, tiene la ventaja sobre otras técnicas descritas, en que todos los segmentos del nefrón pueden ser estudiados y los medio ambientes luminal y peritubular pueden ser selectiva y específicamente controlados (56,57,58,59,60,61,62,63,64). La técnica de perfundir segmentos aislados de túbulos renales tiene tres principales ventajas para el fisiólogo renal. Primero, el investigador puede examinar el transporte epitelial con la libertad de manipular a voluntad las soluciones externas (lumen y peritúbulo) que a menudo son poco accesibles en la situación *in vivo*. Segundo, se pueden examinar *in vitro* segmentos discretos del nefrón, histológicamente bien identificados, de forma tal, que sean reducidas el número de potenciales influencias sobre el proceso de transporte en cuestión. Tercero, se puede examinar individualmente todos los segmentos tubulares que comprende el nefrón (inclusive glomérulos aislados), así como analizar el contenido celular de cada uno de estos segmentos. Esta técnica ha sido aplicada a túbulos renales de conejo, que fué la especie primariamente examinada, así como también ratón, rata, hamster, culebra, lenguado, rana, salamandra y segmentos tubulares extraídos de biopsias de riñones humanos (39,61,65). En este conjunto de trabajos que aquí presentamos hemos diseñado y usado diversas aproximaciones metodológicas de túbulos renales aislados para examinar varios aspectos de los procesos generales de transporte transepitelial y su regulación.

AVANCES RECIENTES

Morfología y fisiología del aparato yuxtglomerular renal.

El AYG está formado por un polo tubular y por un polo vascular. El polo tubular está constituido por la MD, que es una placa especializada de células epiteliales localizada en la parte terminal distal de la cTAL (aproximadamente 0 a 500 μm antes de la transición al túbulo contorneado distal), donde ésta última pasa a través del ángulo entre las arteriolas aferente y eferente del glomérulo correspondiente. El polo vascular está formado por las arteriolas aferente, eferente y por el mesangio extraglomerular. En secciones histológicas, a región aparece aproximadamente cuneiforme y ningún vaso sanguíneo ni linfático penetra este complejo celular, continuándose esta región con el mesangio intraglomerular (42,66).

Con el advenimiento de la microscopía electrónica, el examen más detallado del AYG confirmó un cierto número de observaciones previas, corrigió otras y añadió nuevas interrogantes acerca de la función de éstas células. Ya es totalmente aceptado que el AYG comprende tres tipos de células especializadas: el disco de células epiteliales en la pared del túbulo distal que difiere de las células contiguas en la porción ascendente (células de la macula densa); la pirámide de células adyacentes a la macula densa y que forman el mesangio extraglomerular (células lacis o Goormaghtigh); y las dispersas células en la capa muscular media de las arteriolas glomerulares (principalmente en la aferente) que difieren de las típicas células musculares lisas (células granulares o yuxtglomerulares). Un esquema detallado mostrando todas estas estructuras aparece en la figura N° 1.

Debido a que modificaciones significativas en el volumen minuto de plasma filtrado, es decir, en la TFG, tienen un efecto profundo sobre el subsecuente procesamiento tubular de este filtrado, deben existir unos mecanismos por medio de los cuales esta TFG es precisamente controlada. Ejemplos de estos mecanismos son: la respuesta miogénica vascular renal, el sistema de retroalimentación túbulo-glomerular, el sistema renina-angiotensina renal, el sistema quinina-caliceína, las prostaglandinas, las endotelinas, el óxido nítrico y la actividad neural de las terminaciones nerviosas renales. Todos estos mecanismos constituyen los controles intrínseco o autorregulatorio y extrínseco FSR y de la TFG (38,68,69).

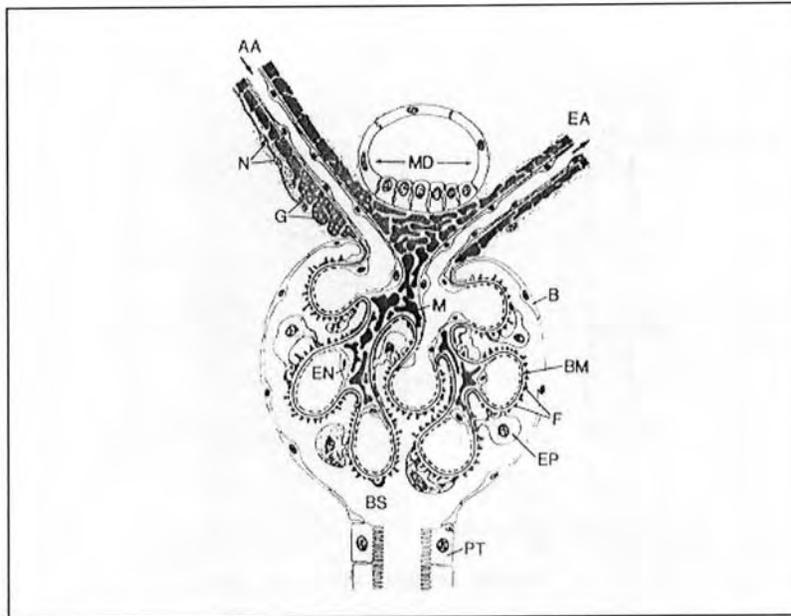


Figura N°1. Esquema mostrando el corpúsculo renal y el aparato yuxtaglomerular. En el polo vascular una arteriola aferente (AA) entra y una arteriola eferente (EA) sale del glomérulo. En el polo urinario el espacio de Bowman (BS), que está delimitado por células epiteliales (B) se convierte en la luz del túbulo proximal. En negro se muestran a las células musculares de las arteriolas y a todas las células derivadas de la musculatura lisa, incluyendo las células granulares (G).

La AA tiene inervación simpática (N). Las células mesangiales extraglomerulares están localizadas en el ángulo entre AA y EA, y continúan hacia dentro del glomérulo constituyendo las células mesangiales (M) propiamente dichas. Los capilares glomerulares están delimitados internamente por células endoteliales fenestradas (EN) y externamente por células epiteliales (EP) con procesos pedicelos (F). La membrana basal glomerular (BM) es continua a todo lo largo del glomérulo. En el polo vascular el asa gruesa ascendente de Henle toca con la mácula densa (MD) el mesangio extraglomerular (67).

Autorregulación o control intrínseco de la circulación renal.

La autorregulación se define como la propiedad intrínseca que tiene un órgano, tal como el riñón, para mantener su flujo sanguíneo ajustadamente constante a pesar de la presencia de cambios en la presión arterial de perfusión (70). Esto implica que la regulación del FSR puede ocurrir independientemente de influencias externas, tal como la actividad neural o las hormonas. Es más, ya que la extracción renal de oxígeno, relativa al FSR es pequeña (10% - 15%), es improbable que el metabolismo renal per se sea el mecanismo responsable de dicha autorregulación. Como la demanda renal de oxígeno requerida para los procesos tubulares de transporte es una función del FSR, es más probable que el éxito de la autorregulación sea regular el FSR. La evidencia acumulada hasta la fecha confirma esta conclusión y además indica que la autorregulación del FSR ocurre tanto en la región cortical como en la región medular del riñón. Sin embargo, se ha mostrado que la autorregulación del flujo sanguíneo medular ocurre sobre un rango más estrecho de presión

arterial, cuando se compara con la autorregulación del flujo sanguíneo renal total (71). Este efecto asimétrico de cambios en la presión arterial sobre el flujo sanguíneo cortical y medular puede en parte explicar la relación entre presión y diuresis así como también la osmolaridad urinaria reducida después de una expansión del volumen del líquido extracelular.

Para estudiar los procesos por medio de los cuales el FSR y la TFG son reguladas, se pueden diseñar experimentos que determinen la respuesta del riñón a variaciones en la presión arterial cuando se eliminan los efectos de control que realizan los factores extrínsecos a este órgano. En estos experimentos, los nervios renales se seccionan y los efectos de aminas simpaticomiméticas se eliminan sea por el uso de agentes bloqueantes o por remoción de la médula adrenal. La presión arterial renal se puede elevar por estimulación del sistema nervioso simpático o disminuir por pinzamiento parcial de la aorta dorsal por encima del origen de la arteria renal. Los resultados que se obtienen en experimentos de este tipo pueden observarse en la figura N° 2. Sobre el rango de presión arterial de 80 a 200 mm Hg, tanto el FSR como la TFG se mantienen relativamente constantes. Por lo tanto, en ausencia de influencias extrínsecas, los mecanismos intrínsecos renales son capaces de autorregular estos dos parámetros.

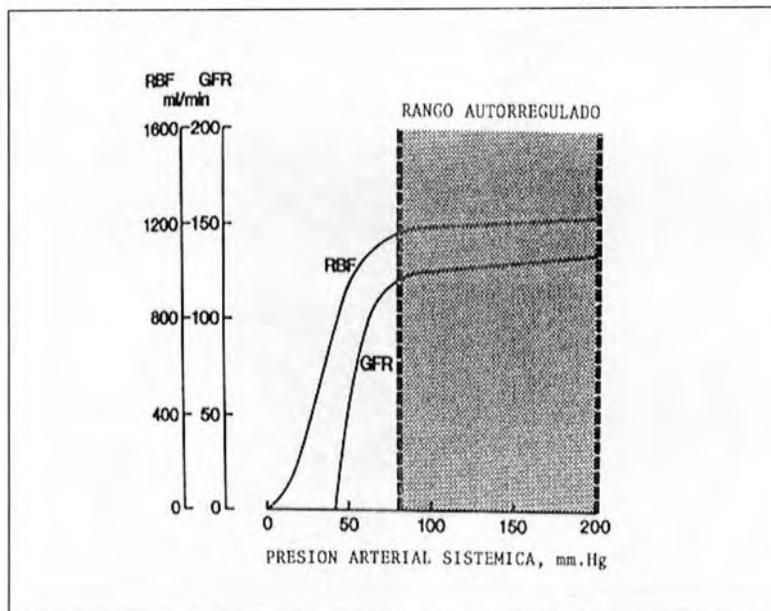


Figura N°2. Efecto de los cambios de presión arterial sistémica sobre el flujo sanguíneo renal (RBF) y la tasa de filtración glomerular (GFR). En ausencia de regulación extrínseca, el mismo riñón mantiene relativamente constantes la GFR y el RBF dentro de un rango de presión que va de 80 a 200 mm Hg (72).

Esta respuesta autorregulatoria del riñón ha sido clara y ampliamente documentada, pero el o los mecanismos responsables de tal función, aún eluden nuestro entendimiento. Como los cambios en el FSR tienen un profundo efecto sobre la TFG, es homeostáticamente benéfico prevenir cambios grandes en la TFG y por lo tanto en la excreción de agua y sales secundaria a cambios en la presión de perfusión renal. Es por esto, que es probable que la regulación del FSR sea una consecuencia de la autorregulación de la TFG. Esto puede ser alcanzado principalmente por tres mecanismo: el sistema miogénico, el sistema de retroalimentación túbulo – glomerular (RTG) y el sistema renina - angiotensina local (67).

El mecanismo miogénico comprende el control de la contracción del músculo liso a nivel de la vasculatura preglomerular renal en respuesta a cambios en la presión de perfusión renal. En otras palabras, este mecanismo actúa amortiguando cambios en el FSR y la TFG en respuesta a cambios abruptos en la presión arterial sistémica. Este mecanismo aparece como el más efectivo cuando la presión arterial media excede el umbral normal de presión de 90 mm Hg.

El mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular (RTG) comprende el control selectivo de la resistencia de las arteriolas pre- y post-glomerulares en respuesta a cambios en el flujo tubular distal. Este mecanismo actúa para estabilizar la TFG dentro del rango normal de presión arterial sistemática entre 80 y 120 mm Hg. Bajo condiciones normales y presión arterial normal el mecanismo de RTG constituye cerca del 50% de compensación autorregulatoria en respuesta a cambios en la presión sanguínea en el intervalo alto de presión (90 a 120 mm Hg) y cerca de 30% en el intervalo bajo de presión (90 a 80 mm Hg). La RTG sirve para estabilizar la tasa de flujo tubular distal, un factor que puede contribuir a la preservación del gradiente longitudinal vertical medular y por lo tanto regular osmolaridad final de la orina. Los mecanismos miogénico y de RTG, trabajan en serie, actuando como mecanismos de control grosero y fino, respectivamente, que estabilizan la TFG y regulan el volumen y la composición de los líquidos corporales.

Finalmente el mecanismo renina-angiotensina, es activado cuando la presión arterial sistémica cae por debajo de 80 mm Hg. Este mecanismo sirve para proteger al individuo de hipotensiones que comprometen su vida y contribuye aproximadamente al 20% de la compensación autorregulatoria en el límite inferior del rango de presión autorregulatoria.

En la figura N°3, se hace un intento para integrar evidencia experimental existente hasta el momento, dentro de un concepto de autorregulación multifactorial de la TFG (73).

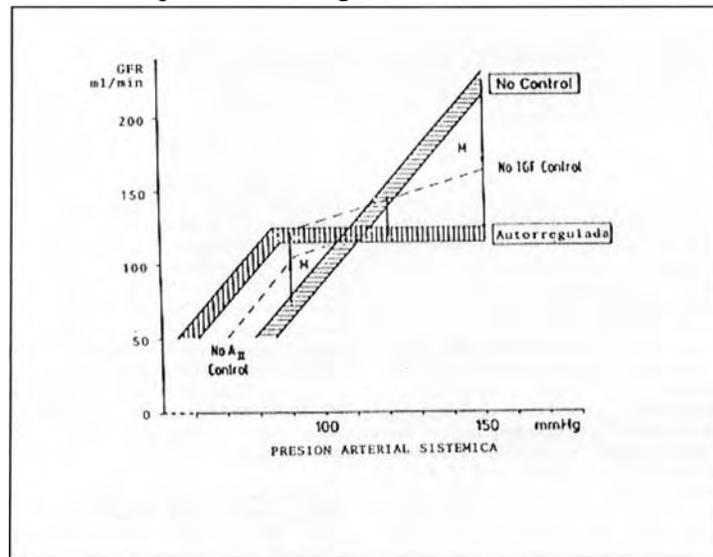


Figura N°3. Representación esquemática de las posibles interacciones entre los mecanismos que contribuyen a la autorregulación. La barra rayada verticalmente representa la relación entre la tasa de filtración glomerular (GFR) y la presión arterial cuando hay autorregulación completa y la barra rayada horizontalmente representa esta misma relación sin autorregulación. La línea punteada marcada "No TGF Control" muestra la relación GFR-presión con el sistema de retroalimentación túbulo-glomerular (TGF) interrumpido y la línea punteada marcada "No All Control" es la observada cuando se bloquea a la angiotensina II. Un mecanismo adicional, presumiblemente el miogénico (M) contribuye produciendo vasoconstricción arteriolar aferente a presiones arteriales elevadas y vasodilatación arteriolar aferente a presiones arteriales bajas (73).

Como acabamos de mencionar, parece que hay al menos tres mecanismos importantes que contribuyen a la autorregulación de la TFG: el mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular (RTG), alteraciones en la resistencia vascular glomerular las mediadas por angiotensina II (sistema renina-angiotensina local) y el componente miogénico propuesto inicialmente por (74). El RTG parece jugar papel importante a presiones arteriales entre 80 y 100 mm Hg y tener un rol crecientemente importante a medida que se eleva la presión arterial. La angiotensina II producida secundariamente a la secreción de renina dentro de la sangre produce cambios en la resistencia, particularmente de la arteriola eferente, que se hacen muy importantes a presiones arteriales por debajo de 100 mm Hg. El mecanismo miogénico probablemente opera sobre todo el rango de presión, produciendo vasoconstricción arteriolar aferente a presiones arteriales altas y vasodilatación arteriolar aferente a bajas presiones arteriales. Estas contribuciones de los tres mecanismos implicados, se muestran esquemáticamente en la figura N°3. La barra rayada horizontalmente muestra la relación TFG- Presión Arterial que ocurriría sin ningún control de resistencia (No Control). La barra rayada verticalmente indica autorregulación completa (Autorregulada). Suponemos que a una presión arterial de 150 mm Hg, el desplazamiento de la TFG desde el valor de No Control al valor Autorregulado requiere ambos componentes miogénico (M) y RTG. A presión sanguínea normal, que coincide con el supuesto punto de trabajo del componente miogénico, el pequeño desplazamiento de la RTG hacia el valor autorregulado se alcanza solamente gracias al funcionamiento del RTG. A una presión de cerca de 80 mm Hg, el RTG no contribuye a la autorregulación; a esta presión la TFG es controlada por una vasodilatación miogénica aferente (M) y una vasoconstricción eferente dependiente de angiotensina II.

Los demás sistemas de control humorales y nerviosos arriba mencionados no contribuyen a la autorregulación del FSR y la TFG; en todo caso constituyen los mecanismos extrínsecos que controlan la circulación renal y la reabsorción del agua y las sales. De todos los mecanismos mencionados el sistema de RTG parece ser el de mayor importancia fisiológica en el rango de presión normal y es un mecanismo adaptativo que sirve para mantener un balance entre la TFG y la reabsorción tubular adecuada que logra mantener el volumen de líquido extracelular del individuo.

Retroalimentación túbulo - glomerular:

Es conocido que la cantidad de agua y solutos que llegan a los túbulos contorneados distales y los conductos colectores (el así llamado “nefrón distal”) está determinada por dos mecanismos interrelacionados que estabilizan el balance entre la TFG y la tasa de reabsorción de filtrado en el túbulo proximal y en el asa de Henle (el así llamado “nefrón proximal”). El primero es el mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular (RTG), que disminuye la TFG en respuesta a un aumento en la concentración de NaCl a nivel de la macula densa (MD) por encima de su valor normal, causado por una disminución en la reabsorción de agua y NaCl en el nefrón proximal, o causado por un aumento primario en la TFG. El segundo es un aumento adaptativo en la reabsorción proximal de agua y NaCl en respuesta a un aumento espontáneo en la carga filtrada, un fenómeno conocido como balance glomérulo-túbular (BGT). En términos de regulación neuronal, el RTG actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa, que ajusta la TFG para compensar una

inadecuada reabsorción de filtrado en el nefrón distal, mientras que BGT actúa como un mecanismo de prealimentación positiva para aumentar la reabsorción en el nefrón proximal en respuesta a un incremento en la TFG. Ambos mecanismos son reajustados con maniobras que reducen el volumen extracelular. Así, en una hemorragia aguda se espera que aumente la eficiencia de la respuesta del RTG. Existe una gran cantidad de evidencia acumulada que indica que el mecanismo de RTG opera a través del aparato yuxtaglomerular (69).

El concepto de regulación de RTG de la TFG, fue inicialmente propuesto por Thureau (40). Este mecanismo ajusta la TFG en respuesta a la capacidad reabsortiva del nefrón. La constancia de la TFG a pesar de los aumentos de la presión arterial sistémica, parecen ser una consecuencia de una constante capacidad reabsortiva del epitelio tubular. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de evidencia acumulada en los últimos 30 años, probablemente no es una exageración decir que mucha de ella es circunstancial o inferencial, debido a la inaccesibilidad del AYG, (asiento anatómico de este mecanismo de RTG) para una investigación más directa; por lo tanto las respuestas finales a los aspectos que aún no están claros - la naturaleza precisa de la señal tubular y su detección por la macula densa, la naturaleza detallada de su transducción dentro del AYG, y la mediación de la respuesta vasoactiva - tienen que ser evaluadas por nuevos impulsos teóricos y metodológicos, como los que vamos a describir aquí (38,39,68,69,75,76).

Mecanismo de retroalimentación túbulo - glomerular:

La información obtenida hasta el presente concerniente al mecanismo por el cual cambios en la composición del líquido tubular resultan en cambios en la TFG proviene de estudios de micropunción (69). Como el AYG está situado debajo de la superficie de la corteza renal, es inaccesible a la micropunción y a cualquier otro estudio directo de estas células *in situ*.

Este aparato parece funcionar como una unidad regulatoria que, a través de las células de la MD, es capaz de detectar la concentración de NaCl en el líquido tubular distal. El sistema es activado cuando concentración de electrolitos aumenta, llevando a reducción en la presión capilar glomerular y en la TFG a través de la activación del mecanismo de RTG. La manera cómo las células de la MD pueden participar detectando y transmitiendo información a las estructuras vasculares y glomerulares, es aún una incógnita. Por tanto es deseable aislar y perfundir *in vitro* el segmento tubular renal que contiene a la MD con su glomérulo adherido.

Transporte celular de agua y iones en el aparato yuxtaglomerular: Regulación de volumen celular en la macula densa.

Para eliminar estas limitaciones de una aproximación experimental *in situ*, hemos desarrollado una preparación *in vitro*, usando para ello el segmento aislado de la cTAL, que contiene una placa de MD con su glomérulo adherido (75,77,78). Con esta técnica hemos evaluado comportamiento general de las células de la MD en medios iso- y anisomóticos, así como parámetros electrofisiológicos (79,80,81). Nuestros resultados concuerdan con la idea de que las células de la MD tienen una relativamente baja permeabilidad al agua y tienen la propiedad de absorber NaCl a través de un mecanismo sensible a furosemida y

localizado en la membrana apical. Las células de la MD tienen también mecanismos regulatorios muy rápidos que mantienen el volumen celular durante reducciones en la osmolaridad extracelular. Este transporte de sustancias no es afectado por vasopresina. En resumen, estas células, usando propiedades básicas de transporte que normalmente ocurren a este nivel distal del nefrón, provocan cambios en la concentración de NaCl y en la tonicidad intersticio yuxtglomerular que posteriormente son detectados por las células mesangiales extraglomerulares para ulteriormente producirse una regulación de la TFG(80,81).

Está bien establecido que el mecanismo de RTG, que opera en cada nefrón, entre un segmento tubular nefrón distal y su propio glómulo, es muy importante para la autorregulación renal de la tasa de filtración glomerular así como para la homeostasis de los líquidos y electrolitos corporales. Como acabamos de decir, se ha sugerido que el AYG es el sitio anatómico del mecanismo de control del mecanismo de RTG, ya que allí se observa una íntima relación anatómica entre las células epiteliales tubulares altamente especializadas de la MD, las células mesangiales extraglomerulares del intersticio yuxtglomerular y las células musculares de las arteriolas aferente y eferente glomerulares (66). Sin embargo, a pesar de los muchos intentos que se han realizado para obtener evidencia directa de este mecanismo de control, éstos han sido infructuosos debido a la inaccesibilidad anatómica del AYG. Todos estos intentos se han realizado utilizando técnicas micropunción in vivo y observación microscópica AYG (69).

El uso de la técnica de perfusión in vitro de segmentos tubulares aislados del nefrón ha sido exitosa en el estudio de las diversas funciones que tiene cada segmento nefrón. Más aún, las características funcionales de las células de los túbulos renales pueden ahora ser directamente evaluadas usando técnicas cuantitativas de microscopía de luz [microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC o nomarski) y microscopía de fluorescencia]. Paralelamente a estas técnicas, también se han desarrollado las técnicas de microscopía de imágenes intensificadas de video y procesamiento digital de imágenes, que finalmente han provisto al fisiólogo de una herramienta poderosa para cuantificar las concentraciones iónicas intracelulares en un determinado segmento tubular o en un grupo celular específico, como por ejemplo las células de la MD, del mesangio extraglomerular o las células musculares endoteliales de las paredes arteriolas (75,77,78,80,81).

Preparación in vitro del aparato yuxtglomerular:

Con el fin de evitar las limitaciones de la preparación in vivo para evaluar la operación del mecanismo de RTG, es necesario obtener una preparación in vitro adecuada. La experiencia lograda de nuestros estudios en túbulos proximales y con técnicas similares a las usadas en esos segmentos (57,59,60,61,64,82) fue posible diseñar métodos de microdisección para aislar en forma individual un aparato yuxtglomerular a partir de una rebanada de riñón de conejo. El espécimen disecado consiste de un segmento de cTAL que incluye a la MD unida a una pequeña porción de túbulo contorneado distal, el glómulo adherente y dos segmentos de arteriolas aferente y eferente. Con esta aproximación experimental es posible microperfundir tanto el polo vascular como el polo tubular y nos permite estudiar directamente el AYG sin influencia de factores sistémicos hemodinámicos y/o humorales.

Más aún, imágenes de las arteriolas aferente y eferente pueden ser continuamente monitoreadas y almacenadas para ser posteriormente evaluadas (75,77,78,80,81,83).

Nuestro principal interés con esta preparación es evaluar directamente la cadena de eventos que están ocurriendo cuando el mecanismo de RTG es activado. Para estimular el mecanismo de RTG, es necesario que las células de la macula densa detecten la concentración de NaCl del líquido tubular. Luego esta información pasa a las células mesangiales extraglomerulares y de allí a las células de la musculatura lisa en la pared de la arteriola aferente. La arteriola aferente reacciona produciendo vasoconstricción (cuando la concentración de NaCl aumenta en el líquido tubular) o liberación de renina (cuando disminuye la concentración de NaCl). Nuestros hallazgos previos apoyan la idea de la existencia de un mecanismo de cotransporte que puede ser postulado como el paso inicial de detección de NaCl que usa el mecanismo de RTG (75,77,78,80,81).

Nuestros resultados también indican que no hay grandes cambios en la concentración celular de calcio en la macula densa cuando se realizan maniobras que se conoce afectan el mecanismo autorregulatorio de la tasa de filtración glomerular en cada nefrón (76,80,81,84,85,86).

Posiblemente otros mecanismos, tales como el propio transporte de electrolitos, cambios en la concentración de cloro en el intersticio yuxtaglomerular, producción de adenosina libre o cambios en los niveles yuxtaglomerulares de angiotensina II u otros mediadores vasoactivos, pueden constituir la señal que permita proceder con el resto de eventos desarrollados por el aparato yuxtaglomerular para controlar la tasa de filtración glomerular (69,80,81,84,85,86,87).

Por lo tanto, procedimos a obtener una preparación in vitro que emule el mecanismo de RTG (83) y con la ayuda de la microscopía de imágenes intensificadas de video pudimos visualizar y cuantificar las concentraciones iónicas intracelulares (cloro y calcio) en la macula densa, mesangio extraglomerular y células musculares de las arteriolas aferente y eferente con visualización simultánea de la concomitante contracción muscular. Con esta aproximación se tiene una visualización directa del mecanismo TGF y se pueden analizar los posibles mecanismos de transducción que ocurren entre la MD, las células mesangiales extraglomerulares y las células efectoras de las arteriolas aferente y eferente del aparato yuxtaglomerular (76,80,81,84,85,86,87,88,89,90).

Concentración citosólica de calcio y cloro en las células de la macula densa y del asa cortical gruesa ascendente del asa de Henle.

Se han desarrollado técnicas fluorescentes que nos permiten medir las variaciones de las concentraciones iónicas de calcio y de cloro ante diversas situaciones experimentales (76,84,85,86,87,89,90).

Se ha sugerido que la activación de las células de la MD puede tener que ver con cambios en la concentración citosólica de calcio, como un eslabón en la cadena de eventos que llevan a la activación de mecanismo RTG y a la liberación de renina. Se investigó la concentración de calcio con Fura-2, usando un sistema digital de imágenes midiéndolo en

la MD y en las células vecinas de la cTAL. Consideramos que los pequeños cambios observados bajo diferentes maniobras experimentales no pueden ser responsables de la liberación de renina o de la completa inactivación del mecanismo RTG (76,85,86).

Se cree que el transporte de cloro a través de las células de la macula densa es un factor importante dentro del mecanismo de RTG y en la liberación de renina mediada por estas células. En este estudio segmentos de asas corticales gruesas ascendentes de Henle conteniendo a la macula densa y su glomérulo adherente fueron cargados con el fluoróforo SPQ, sensible a cloro. Las concentraciones intracelulares de cloro de estos dos tipos celulares se determinaron usando microscopía de imágenes intensificadas de video y procesamiento digital de imágenes que miden la intensidad de la fluorescencia emitida por el SPQ.

En presencia de alta concentración de NaCl en la luz tubular y el baño la concentración de cloro en las células de la MD y de la cTAL fue de 59 mM y 69 mM, respectivamente. Cuando el supuesto cotransportador Na-2Cl-K luminalmente localizado era bloqueado por adición de furosemida, el cloro citosólico se redujo en ambos grupos celulares a 29 mM y a 13 mM, respectivamente. Una reducción en el NaCl luminal a 30 mM también disminuyó el cloro en ambos grupos celulares. La adición basolateral del bloqueador NPPB de los canales de cloro aumentó el cloro en las células de la MD y en las células de la cTAL. También se encontró que a pesar de estar bloqueados los canales basolaterales de cloro por acción del NPPB, se mantenía parcialmente el transporte de él a través de esta membrana, dando así otra evidencia más de un segundo mecanismo de expulsión de cloro de estas células, probablemente a través de un cotransporte de KCl.

Estos resultados en conjunto apoyan la noción de que existe una estrecha interrelación entre el cotransportador luminal de Na-2Cl-K y la conductancia basolateral de cloro que regula la concentración citosólica de cloro en estos dos grupos celulares y por lo tanto el transporte de NaCl a través de ellas. Estos resultados también indican que la detección luminal del NaCl por las células de la macula densa puede ser muy importante en el mecanismo de RTG y la liberación de renina (86,89,90).

Acción diferente de la angiotensina II y la noradrenalina sobre la concentración de calcio citosólico en arteriolas aferentes perfundidas. Acción sobre la arteriola eferente.

Las propiedades contráctiles de la arteriola aferente tienen una importante función en la regulación del flujo sanguíneo renal y la TFG. Las distintas partes de la arteriola aferente muestran una gran heterogeneidad con respecto tanto a su función como a su morfología. La concentración arteriolar intracelular de calcio es probablemente uno de los principales factores que disparan la contracción de las arteriolas y la liberación de renina. En este estudio arteriolas aferentes aisladas y perfundidas se cargaron con el fluoróforo Fura-2 sensible a calcio. La concentración citosólica de calcio en las células musculares lisas se determinó usando microscopía de imágenes intensificadas de video y procesamiento digital de imágenes para medir las relaciones 340/380 nm de intensidades de la fluorescencia emitida por el Fura-2. De forma similar se usó el mismo diseño experimental al empleado para la porción tubular de esta preparación, pero ahora haciendo las determinaciones en la arteriola aferente (76,83,85,86,91).

En cada experimento se hicieron medidas en condiciones control cada 15 s durante 150 s. Luego, el baño se cambió rápidamente por otro que contenía la sustancia vasoactiva que iba a ser probada y se repetían las medidas en los siguientes 150 s. Se esperaba un periodo de 5-10 min para la aplicación de una segunda droga. Durante la adición de cada droga se evaluó la concentración de calcio celular tanto proximal como distalmente (en los últimos 50 μm junto al glomérulo) en la arteriola aferente y también en el mesangio extraglomerular que rodea esta parte terminal de la arteriola. Durante el período inicial control con alta concentración de NaCl en el lumen y en el baño la concentración citosólica de calcio fue distinta en cada una de las tres áreas evaluadas. Hubo menor concentración de calcio en el segmento proximal que en el distal. La mayor concentración de calcio se encontró en el mesangio sugiriendo que estas células, que tienen origen muscular, tienen siempre un estado activado o mayor tono en comparación con aquellas otras células musculares localizadas en la arteriola aferente.

Cuando se añade noradrenalina al baño, se produce una contracción a todo lo largo del segmento arteriolar proximal y un concomitante pico de aumento en el calcio celular (en los primeros 15 s) seguido por un nuevo nivel de meseta alcanzado después de 90 a 150 s. En el segmento arteriolar distal no hubo contracción y sólo se observó un significativo pico de aumento regresando rápidamente al valor control inicial. Cuando se añade al baño angiotensina II se observa una contracción arteriolar localizada distalmente y concomitantemente un significativo pico de aumento en el calcio. Después de este pico, el calcio regresa inmediatamente a su valor control. Nunca observamos contracción arteriolar proximal cuando se aplicó angiotensina II. Ni la noradrenalina ni la angiotensina produjeron aumentos en la concentración de calcio celular mesangial. Los resultados presentes indican que tanto noradrenalina como angiotensina II pueden contraer y aumentar el calcio celular arteriolar pero que hay diferencias en el curso temporal y en el sitio de acción dentro del aparato yuxtaglomerular (84).

Estas observaciones en la arteriola aferente se completaron con las medidas realizadas en estas mismas condiciones experimentales en la arteriola eferente. La aplicación tanto de noradrenalina como de angiotensina llevaron a un aumento en la concentración citosólica de calcio y a una contracción de las células musculares arteriulares en toda su longitud. Estos experimentos indican que ambas sustancias vasoactivas actúan en una forma similar a todo lo largo de la arteriola eferente, mientras que en la arteriola aferente estas acciones no están igualmente distribuidas (88).

Activación del mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular en una preparación in vitro del aparato yuxtaglomerular:

En esta parte se investigó la contracción de la arteriola aferente y los cambios concomitantes en el calcio celular arteriolar cuando las células de la macula densa eran sometidas a una estimulación del mecanismo de RTG (variaciones en el transporte de NaCl a través de las células de la MD). Al inicio de cada experimento se bañaba a la preparación con una solución de alta concentración de NaCl con furosemida, haciéndose medidas de control por lo menos durante 5 min. Luego esta solución era cambiada instantáneamente por otra conteniendo alto NaCl sin furosemida y se medían el diámetro arteriolar y la

concentración celular de calcio durante los siguientes 10 min. De la misma forma que en el trabajo anterior se evaluó proximal y distalmente en la arteriola así como en el mesangio extraglomerular. Como la solución del baño tiene libre acceso al área de la MD, se puede inferir que inicialmente la furosemida bloquea el mecanismo de RTG y su posterior remoción permite una activación del mismo. Bajo estas condiciones de estimulación fisiológica del mecanismo de RTG, cuando se remueve la furosemida del baño, se observa un pico de aumento significativo de la concentración de calcio celular en la porción distal de la arteriola aferente y en el mesangio. Al mismo tiempo hay una contracción visible de esta misma región distal mientras que no se observa contracción ni cambio en el calcio celular en la porción proximal de la arteriola. Cuando se añade angiotensina II a la solución que contiene furosemida, se observa contracción de la porción distal, mientras que el calcio celular tiende a ser mayor que sin angiotensina II (83).

Los resultados presentes muestran que la estimulación del mecanismo de RTG producen un pequeño aumento del calcio celular con una contracción visible del terminal distal de la arteriola aferente. Esta respuesta contráctil de la arteriola aferente en una preparación in vitro doblemente perfundida (vía del lumen tubular y del lumen arteriolar) ha sido previamente descrita por Ito y Carretero (92). El método presente representa una nueva y más simple aproximación para estudiar la respuesta del mecanismo de RTG en una arteriola aferente aislada e in vitro con su glomérulo adherido a través de la placa de la MD. Esta parte del trabajo también la hemos completado con las medidas realizadas en estas mismas condiciones experimentales en la arteriola eferente, donde no se observa contracción ni aumento del calcio arteriolar bajo estas condiciones (83).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Eustachio B. *Opuscula anatomica*. Venezia: V. Luchinus; 1564.
2. Bellini L. *Exercitatio anatomica de strutura et usu renum*. Firenze: Stellae; 1662.
3. Gottschalk C.W. Introduction a history of renal physiology to 1950. En: Seldin, D.W. & Giebisch, G.(eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd. ed., pp. 1-30, Raven Press, New York. 1992.
4. Malpighi M. *De viscerum structura exercitatio anatomica*. Bologna: J. Montij; 1666.
5. Fontana F. *Traité sur le vénin de la vipere, sur les poisons americains, sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons végetaux. On Y A Joint des observations sur la structure primitive du corps animal. Différentes experiences sur la reproduction des nerfs et la description d'un nouveau canal de l'oeil*: Tomo II. Nyor líAiné, Paris. Emsley, Londres. 1781.
6. Bowman W. On the structure and use of the malpighian bodies of the kidney with observations on the circulation through that gland. *Philos Trans R Soc Lond* 1842; Part I: 57-80.
7. Henle J. Theodor Schwann. *Arch F Mikr Anat* 1882; 21: 1-49.
8. Henle J. "Zur Anatomie der Niere. Abhandlungen der Königlichen Gessellschaft der Wissenschaften". *Göttingen Math Physik Kl* 1862; 10: 223-254.
9. Schweigger-Seidel F. *Die Nieren des Menschen und der Säudethiere in ihrem Feineren Baue Geschildert*. Verlag der Buchhandlung des Waisenhauses, Halle. 1865.

10. Golgi C. Annotazioni intorno all'Istologia dei reni degli uomini e di altri mammiferi e sull'Istogenesi dei canalicoli uriniferi". *Atti R Acad Naz Lincei Rendiconti* 1889; 5: 334-342.
11. Peter K. "Über die Nierenkanälchen des Menschen und einiger Säugetiere". *Anat Anz* 1907; 30: 114-124.
12. Taugner R, Hackenthal E. *The Juxtaglomerular Apparatus. Structure and Function*. Berlin: Springer-Verlag; 1989.
13. Ludwig C. Beiträge zur Lehre vom Mechanismus der Harnsecretion. N.G. Elwert, Marburg. *Kidney Int* 1994: 46.
14. Metzner R. Die Absonderung und Herausbeförderung des Harnes". En: Nagel W. (ed.), *Handbuch der Physiologie des Menschen*. Vieweg, Braunschweig, Germany: 1906; 2: 207-225.
15. Cushny AT. *The Secretion of Urine*. Longmans, Green, London 1917.
16. Wearn JT, Richards AN. Observations on the composition of glomerular urine, with particular reference to the problem of reabsorption in the renal tubule. *Am J Physiol* 1924 ; 71: 209-227.
17. Gréhant N. Physiologie des reins par le dosage de l'urée dans le sang et dans l'urine. *J Physiol Pathol Gen (Paris)* 1904; 6: 1-8.
18. Levinsky N.G. & Levy M. Clearance techniques. En: Orloff J, Berliner RW, Geiger SR. (eds.), *Handbook of Physiology*, Washington, D.C: American Physiological Society; 1973; 8: 103-118.
19. Schuster VL, Seldin DW. Renal Clearance. En: Seldin DW, Giebisch G. (eds.), *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd. ed.. New York. : Raven Press; 1992.: 943-978.
20. Smith HW. *The Kidney. Structure and Function Health and Disease*. New York: Oxford Univ. Press, 1951.
21. Chinard F.P. "Comparative renal excretions of glomerular substances following "instantaneous" injection into renal artery". *Am J Physiol* 1955; 180: 617-619.
22. González F, Leal-Pinto E, Pérez-González M, Whittombury G. Abnormal transtubular permeability raffinose during intravenous infusion of urea and mannitol in the intact dog kidney. *Pflügers Arch* 1980; 38: 165- 176.
23. Malvin RI, Wilde WS. Stop flow technique. En: Orloff J, Berliner RW, Geiger SR. (eds.), *Handbook of Physiology*, Cap. 8, pp. 119-128, American Physiological Society, Washington, D.C. 1973.
24. Malvin RI, Wilde WS, Sullivan IP. Localization of nephron transport by stop flow analysis. *Am J Physiol* 1958; 194: 135-142.
25. Richards A.N. & Walker AM. "Methods of collecting fluid from known regions of the renal tubules of amphibian and of perfusing the lumen of a single tubule". *Am J Physiol* 1937; 118: 111-120.
26. Walker AM, Oliver J Methods for the collection fluid from single glomeruli and tubules of the mammalian kidney. *Am J Physiol* 1941; 134: 562-579.
27. Fowler N, González E, Rawlins FA, Giebisch G, Whittombury G. Effect of hypertonic urea and mannitol on distal nephron permeability. *Pflügers Arch* 1977; 368: 3-11.
28. Gottschalk CW, Lassiter WE. Micropuncture methodology. En: Orloff J, Berliner RW Geiger SR. (eds.), *Handbook of Physiology*, Cap. 8, American Physiological Society, Washington, D.C. 1973: 129-144.

29. Burg M.B. & Orloff J. "Effect of strophantidin on fluxes of potassium in rabbit kidney slices". *Am J Physiol* 1963; 205: 139-146.
30. González E. Propiedades de permeabilidad de la vía paracelular de un epitelio con alta resistencia eléctrica (Piel aislada de *Bufo marinus*). Tesis Ph. Sc. Centro de Estudio Avanzados, IVIC. 1976.
31. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951; 23: 110-127.
32. Ussing HH. The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies. *Acta Physiol Scand* 1949; 17: 1-37.
33. Ussing HH. The distribution by means of tracers between active transport and diffusion. *Acta Physiol Scand* 1949; 19: 43-56.
34. Chambers R, Kempton RT. Indications of function of the chick mesonephros in tissue culture with phenol red *J Cell Comp Physiol* 1933; 3: 131-167.
35. Burg MB, Orloff J. Oxygen consumption and active transport in separated renal tubules. *Am J Physiol* 1962; 203: 327-330.
36. Morel F, Doucet A. Functional segmentation of the nephron. En: Seldin DW, Giebisch G. (eds.), *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd. ed., pp. 1049-1086, Raven Press, New York. 1992.
37. Burg MB, Grantham JJ, Abramow M, Orloff J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol* 1966; 210: 1293-1298.
38. González E. "Nuevos aportes sobre el funcionamiento del aparato yuxtaglomerular: La macula densa como receptor del mecanismo autorregulatorio de retroalimentación túbulo-glomerular". Trabajo de Ascenso a Profesor Asociado. Escuela José María Vargas. Facultad de Medicina, UCV. 1989.
39. González E. "Vías de paso para el agua y los solutos través del epitelio renal: Caracterización del transporte de agua en túbulos proximales y del transporte celular en el aparato yuxtaglomerular". Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Escuela José María Vargas, Facultad de Medicina UCV. 1995.
40. Thurau K. "Fundamentals of renal circulation". En: *Pro 2nd. Int. Congr. Nephrol.*, Praga, Excerpta Medica Amsterdam, pp. 51-61. 1963.
41. Peter K. "Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere". Jena: Fischer. 1909 y 1927.
42. Kaissling B. & Kriz W. "Structural analysis of the rabbit kidney". *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1979; 56: 1-123.
43. Kaissling B., Peter St. & Kriz W. "The transition of the thick ascending limb of Henle's loop into the distal convoluted tubule in the nephron of the rat kidney". *Cell Tissue Res* 1977; 182: 111-118.
44. Ruyter J.C. "Über einen Merkwürdigen Abschnitt der vasa Afferentia in der Mäuseniere". *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1925; 2: 242-248.
45. Okkels H. & Peterfi T. "Beobachtungen über die Glomerulus-gefäße der Froschniere". *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1929; 9: 327-331.
46. Zimmermann K.W. "Über den Bau des Glomerulus der Säugerniere. Weitere Mitteilungen". *Ztschr f mikrosk. anat Forsch* 1933; 32: 176-28.
47. Goormaghtigh N. "Les segments neuro-myo-artériels juxtaglomérulaires du rein". *Arch Biol* 1932; 43: 575-59

48. Goormaghtigh N. "L'appareil neuro-myo-artériel juxtaglomérulaire du rein; ses réactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinaire". *Compt Rend Soc Biol* 1937; 124: 293-296.
49. Mc Manus J.F.A. "The juxtaglomerular complex". *The Lancet* 1942; II: 394-396.
50. Goormaghtigh N. & Grimson K.S. "Vascular changes in renal ischemia cell mitosis in the media of the renal arterioles". *Proc Soc Exp Biol Med* 1939; 42: 227-228.
51. Goormaghtigh N. "Existence of an endocrine gland the media of the renal arterioles". *Proc Soc Exp Biol Med* 1939; 42: 688-689.
- Goormaghtigh N. "Facts in favor of an endocrine function of the renal arterioles". *J Pathol Bacteriol* 1945; 57 392-393.
53. Goormaghtigh N. "Vascular and circulatory changes in renal cortex in anuric crush syndrome". *Proc Soc Exp Biol Med* 1945; 59: 303-305.
54. Edelman R. & Hartroft P.M. "Localization of renin in juxtaglomerular cells of rabbit and dog through the use of the fluorescent-antibody technique". *Circ Res* 1961; 9: 1069-1077.
55. Hartroft W.S. & Hartroft P.M. "New approaches in the study of cardiovascular disease: aldosterone, renin, hypertension and juxtaglomerular cells". *Fed Proc* 1961; 20: 845-854.
56. Burg MB. & Orloff J. "Perfusion of isolated renal tubules". En: Orloff, J., Berliner R.W. & Geiger SR. (eds.), *Handbook of Physiology, Cap. 8*, pp. 145-160, American Physiological Society, Washington, D.C. 1973.
57. Carpi-Medina P, Lindemann B., González E, Whitttembury G. The continuous measurement of tubular volume changes in response to step changes in contraluminal osmolality. *Pflügers Archiv* 1984; 400: 343-348.
58. Chonko A.M., Irish J.M. & Welling D.J. "Microperfusion of isolated tubules". En: Martínez-Maldonado, M. (ed), *Methods in Pharmacology: Renal Pharmacology, Cap. 9*. pp. 221-258, Plenum Press, New York. 1978.
59. González E, Carpi-Medina P, Whitttembury G. Cell osmotic water permeability of isolated rabbit proximal straight tubules. *Am J Physiol* 1982; 242: F321-F330.
60. González E, Carpi-Medina P, Linares H, Whitttembury G. Osmotic water permeability of the apical membrane of proximal straight tubular (PST) cells. *Pflügers Archiv* 1984; 402: 337-339.
61. González E, Carpi-Medina P, Linares H., Whitttembury G. Rutas para el transporte transepitelial de agua: El túbulo renal aislado como modelo experimental. *Arch Venez Farmacol Terap* 1985; 4: 371-380.
62. Jacobson MR, Kokko JP. (Eds.) *Isolated Perfused Tubule Symposium*. *Kidney Int* 1982; 22: 415-570.
63. Palmer LG, Sackin H. Electrophysiological analysis of transepithelial transport. En: Seldin DW, Giebisch G. (eds.), *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd. ed. New York: Raven Press; 1992: 361-406
64. Whitttembury G, Lindemann B, Carpi-Medina P, González E, Linares H. Continuous measurements of cell volume changes in single kidney tubules. *Kidney Int* 1986; 30: 187-191.
65. Schafer J.A. "Transport studies in isolated perfused renal tubules" *Fed Proc* 1981; 40: 2450-2459.
66. Kriz W, Kaissling B. Structural organization of the mammalian kidney. En: Seldin, DW, Giebisch G. (eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd. ed. New York: Raven Press, 1992: 707-778

67. Koushanpour E, Kriz W. Renal physiology: Principles, structure and function. 2nd. Edition, New York: Springer-Verlag; 1986.
68. González E. Elementos de Fisiología Renal. Un Manual para Estudiantes de Medicina. 3ra. Ed. Monografía. Cátedra de Fisiología Normal, Escuela José María Vargas, Facultad de Medicina, UCV. 1991.
69. Schnermann J, Briggs JP. Function of the juxtaglomerular apparatus: Control of glomerular hemodynamics and renin secretion. En: Seldin DW, Giebisch G. (eds.), The Kidney: Physiology and Pathophysiology, 2nd. ed., New York: Raven Press; 1992: 1249-1290
70. Johnson PC. Review of the previous studies and current theories of autoregulation. Circ Res 1964; 14:2-9.
71. Cohen H.J., Marsh D.J. & Kayser B. "Autoregulation in vasa recta of the rat kidney". Am J Physiol 1983; 245: F32-F40.
72. Sullivan L.P. & Grantham J.J. Physiology of the Kidney. 2nd. Edition, Philadelphia : Lea & Febiger; 1982.
73. Schnermann J. Localization, mediation and function of the glomerular vascular response to alterations of distal fluid delivery. Federation Proc 1981; 40: 109-115.
74. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. J Physiol. 1902; 28: 220- 231.
75. González E, Salomonsson M., Müller-Suur C, Persson AEG. NaCl transport and osmotic water permeability of macula densa cells contained in isolated and perfused rabbit kidney tubules". En: Persson AEG; Boberg U. (eds.), The Juxtaglomerular Apparatus, Elsevier, Amsterdam :1988; 11: 97-120,..
76. González E, Salomonsson M, Westerlund P, Persson AEG. Optical studies on the action of furosemide on macula densa and cortical thick ascending limb cells, intracellular calcium fluorescence measurements. Kidney Int 1991; 39: S55-S58.
77. González E, Salomonsson M, Müller-Suur C, Persson AEG. Measurements of macula densa cell volume changes in isolated and perfused rabbit cortical thick ascending limb. I. Isosmotic and anisosmotic cell volume changes. Acta Physiol Scand 1988; 133: 149-157.
78. González E, Salomonsson M, Müller-Suur C, Persson AEG. Measurements of macula densa cell volume changes in isolated and perfused rabbit cortical thick ascending limb. II. Apical and basolateral cell osmotic water permeabilities. Acta Physiol Scand 1988; 133: 159-166.
79. González E, Persson AEG, Salomonsson M. "The tubuloglomerular feedback mechanism: Effect of furosemide on the macula densa cells". En: Velasco M., Israel A., Romero E. & Silva H. (Eds.), Recent Advances in Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Science Publishers, Excerpta Medica, Amsterdam, 1989; 839: 129-133.
80. Persson A.E.G., Salomonsson M., Westerlund P. & González E. Cell volume regulation and transport characteristics of macula densa cells. En: Hatano M. (Ed.), Nephrology, Springer-Verlag, Tokyo, 1991; I: 314-322.
81. Persson AEG, Salomonsson M, Westerlund P, Greger R, Schlatter E, González E. Macula densa cell function. Kidney Int 1991; 39: S39-S44.
82. González E. Efectos de capas no agitadas sobre las medidas de permeabilidad osmótica al agua túbulos renales. Trabajo de Ascenso a Profesor Agregado. Escuela José María Vargas, Facultad Medicina, UCV. 1985.

83. Persson AEG, Salomonsson M, Kornfeld M., Gutiérrez AM, Gonzalez E. Activation of tubuloglomerular feedback mechanism in an in vi preparation of the juxtaglomerular apparatus. *Acta Physiol Scand* 1992; 146: 289-290.
84. González E, Salomonsson M, Westerlund P, Persson AEG. Medida simultánea de concentración intracelular de Cl⁻ en células de la macula densa y del segmento cortical grueso ascendente del asa de Henle”. En: Proverbio F, Benaím G. (editores), *Investigaciones Recientes sobre Mecanismos de Transporte de Iones en Membranas Biológicas*. Caracas, Venezuela: Ediciones del Centro de Estudios Avanzados, IVIC y del Fondo Editorial A Científica Venezolana, Cromotip, 1992. P:101-109.
85. Salomonsson M, Gonzalez E, Sjölin L, Persson AEG. Simultaneous measurement of cytosolic free Ca²⁺ in macula densa cells and in cortical thick ascending limb cells using fluorescence digital imaging microscopy. *Acta Physiol Scand* 1990; 138: 425-426.
86. Salomonsson M, Gonzalez E, Westerlund P, Persson AEG. Intracellular calcium concentration in macula densa and in ascending limb cells at different luminal sodium chloride concentrations in the presence of luminal furosemide. *Acta Physiol Scand* 1991; 142: 283-290.
87. Salomonsson M, Gonzalez E, Kornfeld M, Persson AEG. The cytosolic chloride concentration in macula densa and cortical thick ascending limb cells. *Acta Physiol Scand* 1993; 147: 305-3
88. Kornfeld M., Gutiérrez AM., González Salomonsson M, Persson AEG. Cell calcium concentration in glomerular afferent and efferent arterioles under the action of noradrenaline and angiotensin II. *Acta Physiol Scand* 1994; 151: 105.
89. Salomonsson M., Gonzalez E., Westerlund P. & Persson A.E.G. (1990) ‘The effect of furosemide on chloride concentration in macula densa and cortical thick ascending limb cells. *Acta Phys Scand* 1990; 139: 387-388.
90. Salomonsson M., Gonzalez E., Westerlund P, Persson AEG. Chloride concentration in macula densa and cortical thick ascending limb cells. *Kidney Int* 1991; 39: S51-S54.
91. González E, Salomonsson M, Gutiérrez AM., Kornfeld M, Morsing P, Persson AEG. Different action of angiotensin II and noradrenaline cytosolic calcium concentration in isolated and perfused afferent arterioles. *Acta Physiol Scand* 1992; 145: 299-300.
92. Ito S, Carretero OA. An in vitro approach to the study of macula densa-mediated glomerular hemodynamics. *Kidney Int.* 1990;38: 1206-1210