

Glomerulopatía Colapsante

Las uniones estrechas (UE) son estructuras proteicas localizadas en el extremo apical de la región basolateral en células epiteliales, regulan el transporte paracelular y preservan la polaridad celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la localización de las claudinas 2 y 5 en la glomerulopatía colapsante experimental (GCE).

Métodos. Se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley (200 – 210 g p.c.). Se formaron dos grupos: control (solución salina) y experimental (tratado con suero de pacientes clínica y patológicamente portadores de glomerulopatía colapsante), provocándoles proteinuria. Se midieron proteinuria, depuraciones: de creatinina, de agua libre, osmolar, y flujo urinario, así como las excreciones fraccionales y cargas filtradas de: sodio, glucosa y potasio. El análisis histopatológico se realizó por microscopía de luz y claudinas 2 y 5 por inmunohistoquímica.

Resultados. Las ratas con GCE desarrollaron proteinuria severa de 137 mg/24 horas en el día 6 ($P<0.001$), disminución de la depuración de creatinina y de agua libre ($P<0.05$), aumento en la excreción fraccional de sodio, glucosa y potasio ($P<0.05$), disminución de las cargas filtradas de potasio y glucosa ($P<0.05$). Las alteraciones funcionales fueron asociadas a cambios morfológicos como retracción del penacho glomerular y daño en los podocitos. Así mismo, se observó sobreexpresión de claudina 2 en los túbulos proximales y en la cápsula de Bowman, y de claudina 5 en la región glomerular.

Conclusión. Algunas alteraciones funcionales observadas en la GCE pueden estar asociadas a cambios en la expresión de claudinas 2 (excreción fraccional de sodio y glucosa) y claudina 5 (proteinuria).

ABSTRACT

EXPRESSION of Claudin 2 AND 5 in an EXPERIMENTAL MODEL OF collapsing glomerulopathy

The tight junction (TJ) of the epithelial cells, are located at the apical extreme of the basolateral region, are constituted of structural proteins which have the function of regulate the paracellular transport and preserve the cell polarity. The aim of this study was to assess the location of 2 and 5 claudins in the experimental collapsing glomerulopathy (CG).

Methods. We used female Sprague Dawley rats (200 - 210 g bw). Two groups were formed: control (saline) and experimental (group with proteinuria induced by treatment with serum from patients clinically and pathologically carriers of collapsing glomerulopathy). Proteinuria, urinary flux, free water and creatinine clearance were measured. Paraffin included tissue was stained by hematoxylin and eosin for damage detection and claudins 2 and 5 were detected by immunohistochemistry.

Results. On day 6, rats of the experimental group had developed a clear proteinuria with 137 mg/24 hours ($P < 0.001$) with a decreasing of creatinine clearance and urinary flux ($P < 0.05$), increased fractional excretion of sodium, potassium and glucose ($P < 0.05$) and a decreasing filter charge load of potassium and glucose ($P < 0.05$). The functional alterations were associated with morphological changes such as damage of the glomerular tuft and in podocytes. Likewise, overexpression of claudin 2 was observed on the proximal tubules and in the Bowman capsule and the claudin 5 was observed on the glomerular region.

Conclusion. Some functional changes observed in the CG may be associated with changes in the expression of claudin 2 (fractional excretion of sodium and glucose) and claudin 5 (proteinuria).

I INTRODUCCIÓN

1 EL RIÑÓN

1.1 Anatomía

Los riñones son órganos retroperitoneales situados en la parte posterior del abdomen, uno a cada lado de la columna vertebral. En los humanos adultos, el riñón mide entre 11 a 12 cm de largo, 5.0 a 7.5 cm de ancho y 2.5 a 3 cm de profundidad, en tanto el peso de cada riñón varía entre 125 a 170 gramos para el hombre y 115 a 155 gramos para la mujer. Dos regiones se identifican cuando se hace un corte sagital del riñón, pudiéndose observar una región externa, pálida, denominada corteza, y una región interna, más oscura, llamada médula (Figura 1).

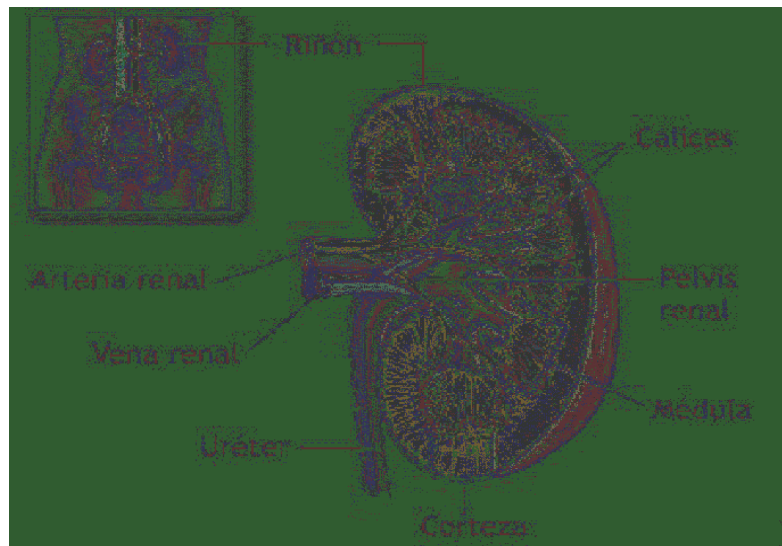


Figura 1.- Estructura anatómica del riñón.- En esta figura se observan: corteza, medula, pelvis, arteria y vena renal.

En la parte media de la superficie cóncava de cada riñón se localiza una hendidura, llamada Hilio, a través de la cual la pelvis renal, la arteria y la vena renal, los linfáticos y el plexo nervioso, pasan al seno del riñón. El órgano está rodeado por una cápsula fibrosa, lisa y fácilmente removible en condiciones normales.

La unidad morfofuncional del riñón es la nefrona. En el hombre adulto existen de 1.5 a 2 millones de nefronas, repartidas en toda la corteza renal. En ellas se pueden distinguir dos estructuras principales, la glomerular y el sistema tubular córtico-medular, los que a su vez definen y permiten el funcionamiento de los otros

componentes de la nefrona: el túbulo proximal (TP), el asa de Henle (segmento delgado y grueso), el túbulo distal, el segmento conector y el túbulo colector (TC), así como el mismo glomérulo (G). (Figura 2)

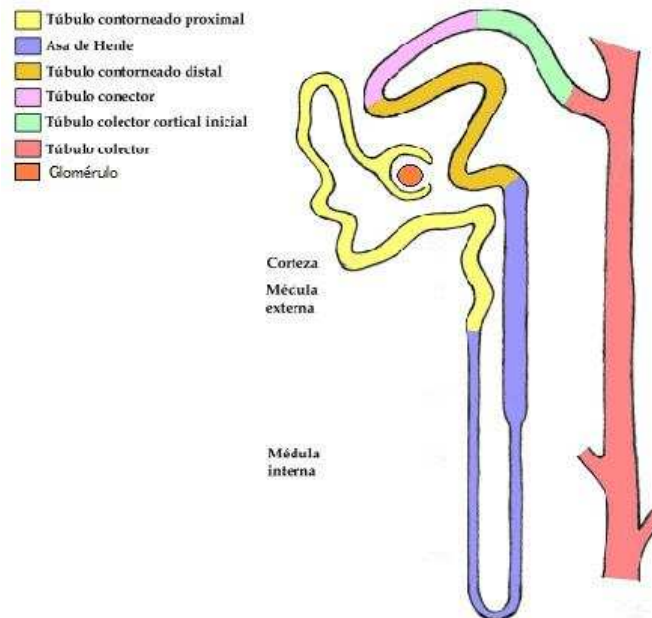


Figura 2.- Componentes principales que integran la neurona.- En esta figura se observan: glomérulo, túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal, túbulo colector cortical inicial y túbulo colector medular.

Las nefronas se encuentran en la corteza y en la médula renal siguiendo un patrón establecido que se repite periódicamente, el que se denomina lobulillo renal. Dos poblaciones de nefronas se identifican en el riñón: aquellas que poseen un asa de Henle corta y las que tienen un asa larga. A su vez, el asa de Henle está compuesta por las porciones descendente delgada, ascendente delgada y una ascendente gruesa.

Pocas especies, incluyendo la humana, poseen nefronas corticales con asas de Henle extremadamente cortas, las que nunca entran a la médula sino que vienen del interior de la corteza. En el riñón humano, las nefronas con asas de Henle cortas superan en aproximadamente siete veces a las nefronas con asas de Henle largas.

La división del riñón en zonas corticales y medulares, junto con la posterior

subdivisión de la médula en zonas internas y externas, es de considerable importancia en relación con la estructura renal y la capacidad de esta estructura para alcanzar una máxima formación de orina.

En los humanos, la médula se divide de 8 a 18 masas cónicas estriadas, denominadas pirámides renales. La base de cada pirámide se sitúa sobre el límite córticomedular, en tanto el ápice se extiende hacia la pelvis renal, para formar la papila renal.

En la punta de cada papila hay de 20 a 25 aperturas, las que representan el final de los túbulos colectores de Bellini. Estas aperturas forman el área cribosa. En contraste con el riñón humano, el riñón de la rata tiene una sola pirámide, por lo que se le ha denominado unipapilar.

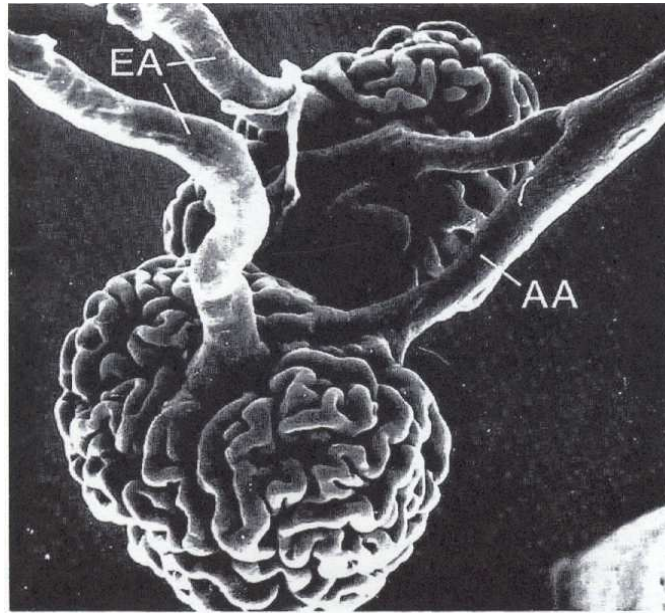
El lobulillo renal está constituido por una subunidad de la corteza, la que, comprendida entre dos arterias interlobulillares contiguas, está centrada por una parte medular que, a modo de eje, aparece surcado por un conducto colector que desciende verticalmente hacia las pirámides, recibiendo la orina concentrada en las nefronas situadas a ambos lados de la parte medular.

El extremo ciego de la porción proximal del sistema tubular aparece dilatado e invaginado, formando una estructura hueca de finas paredes epiteliales, denominada cápsula de Bowman. La concavidad de esta cápsula está ocupada por un ovillo de capilares contorneados, conocido como glomérulo. El glomérulo y su cápsula epitelial, de doble pared, constituyen juntos el corpúsculo renal; estructura que, junto al sistema tubular, completan la nefrona.

El corpúsculo renal posee una forma esférica de un diámetro entre 100-150 μm . Está formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman, la cual se encuentra revestida interiormente por un epitelio aplanado, que posee dos aberturas: el polo vascular, por donde penetra la arteria aferente (AAF) y sale la arteria eferente; (AE) y el polo urinario, que se comunica con el túbulo renal proximal.

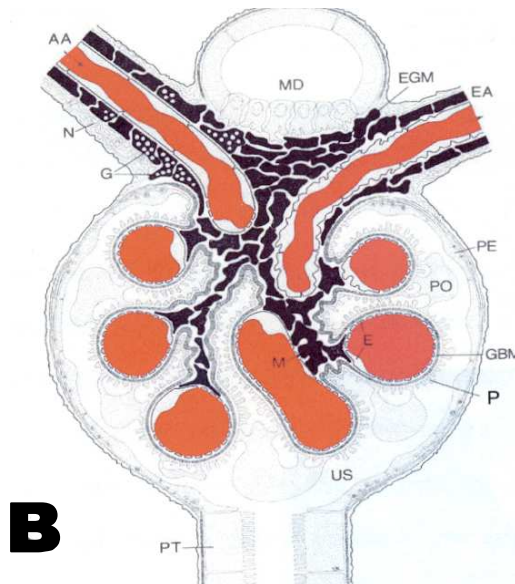
El glomérulo procede de la ramificación de la arteriola aferente, la cual se subdivide a su vez del polo vascular formando unas redes de capilares independientes, denominadas lóbulos glomerular es. Cada lóbulo está formado por varios capilares, dispuestos alrededor de una región de soporte llamado mesangio capilar. Éste está constituido por células mesangiales y escasos monocitos o macrófagos infiltrados, incluidos dentro de un material de estructura fibrilar llamado matriz mesangial (MM).

Las Figuras 3A, 3B y 3C, que se muestran en la página siguiente, ilustran gráficamente lo descrito. En ellas, se pueden apreciar los diferentes componentes de los glomérulos.



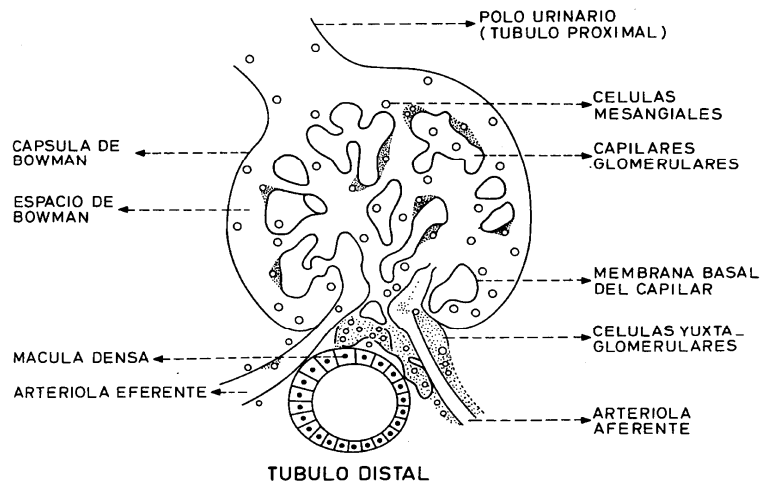
A

Figura 3 A.- Microfotografía electrónica de barrido de un glomérulo, en donde se puede observar la arteria aferente (AA) que surge de una arteria interlobular. También se observa que la arteria eferente (EA) se ramifica, para formar el plexo capilar peritubular (aumento de 300x).



B

Figura 3 B.- En esta figura se observa el corte longitudinal de un glomérulo dejando ver la mácula densa (MD), las arterias eferentes y aferentes (AA, EA), los podocitos (P), la membrana basal glomerular (GBM) y el túbulo proximal (PT).



C

Figura 3 C.- Esquema ilustrativo de un glomérulo, donde se observa el túbulo distal (TD), la mácula densa (MD), las células yuxtaglomerulares (CY), la membrana basal capilar, la cápsula de Bowman (CB), las células mesangiales (CM), los capilares glomerulares y el túbulo proximal.

La pared de los capilares glomerulares está formada por la membrana basal glomerular (MBG), revestida internamente por el endotelio fenestrado y, externamente, por las células epiteliales, llamadas podocitos. La importancia de la membrana basal glomerular, en la filtración, ha sido comprobada por las mutaciones de los genes que codifican a los componentes de dicha membrana. Esta membrana rodea al epitelio, al endotelio, a los nervios periféricos, a las células musculares y a las células grasas.

Tanto en humanos, como en perros y ratones, el resultado de las mutaciones en los genes que codifican la cadena de colágeno tipo IV (alfa 3, alfa 4 y alfa 5), presentes en la MBG, produce una glomérulonefritis hereditaria, conocida como Síndrome de Alport, reportada en algunos casos como enfermedad de la membrana basal glomerular (Rao, V. H. et al. 2003).

Los principales componentes de la MBG son: laminina, colágena tipo IV y sulfatos de heparán, estos últimos formando una cadena de proteoglicanos (Miner, J. H. 1999) (Raats, C. J. et al. 2000) (Jalanko, H. 2003). La MBG no rodea por completo la pared de los capilares glomerulares sino que, después de un recorrido más o menos circular, se refleja sobre sí misma formando parte del capilar adyacente (Miner, J. H. 2003). Esta disposición contribuye a delimitar un espacio central, ocupado por el mesangio glomerular, en donde las células mesangiales están separadas de la luz capilar únicamente por el endotelio fenestrado, mientras que del espacio urinario lo están por la membrana basal glomerular. Esto hace que el mesangio esté constantemente perfundido de macromoléculas y partículas procedentes de la circulación, las que pueden modificar la función glomerular.

En el polo vascular del glomérulo se encuentra el aparato yuxtaglomerular, concretamente en el área de contacto entre la arteria aferente, la arteria eferente y la mácula densa (una porción del túbulo distal, con células diferenciadas). El aparato yuxtaglomerular es rico en terminaciones adrenérgicas y juega un papel muy importante tanto en la conservación del sodio, como en el control de la presión arterial (mediante la secreción de renina) y la regulación del filtrado glomerular (retroalimentación túbulo-glomerular).

Las células epiteliales glomerulares que recubren los capilares se llaman podocitos. Estas poseen varias prolongaciones primarias radiales, las que, dispuestas en forma paralela a los capilares adyacentes, dan lugar a numerosas ramificaciones secundarias, denominadas pedicelos. Estos pedicelos se interdigitan con los pedicelos de los podocitos adyacentes, dejando una separación entre ellos de unos 25 nm de anchura, lo que permite la salida del filtrado plasmático de los capilares glomerulares y su entrada en el espacio capsular.

Se considera que las enfermedades glomerulares son consecuencia del daño primario a los tres tipos de células existentes en el glomérulo; esto es, las células mesangiales, las células epiteliales y las células endoteliales. Dependiendo del tipo de célula glomerular afectada, se expresará la variación en el tipo de glomerulonefritis.

1.1.1 Las células epiteliales

Los podocitos son células epiteliales altamente especializadas que muestran una citoarquitectura compleja, conformando así el lado capsular de la MBG. La función de estos podocitos es el establecimiento de la permeabilidad selectiva de la barrera de filtración glomerular, lo que, junto con mantener la integridad de los capilares glomerulares y una oposición a la presión hidrostática intracapilar, permite la síntesis de la membrana basal glomerular. El daño a los podocitos origina un filtrado de proteínas en la orina conocido como proteinuria (Pavenstadt, H. et al. 2003).

Los podocitos son células únicas, con una organización compleja. Presentan una arquitectura celular dividida en tres segmentos: cuerpo celular; prolongaciones primarias y prolongaciones secundarias (pedicelos). En general, el cuerpo celular y las prolongaciones primarias no están directamente conectadas a la MBG, sino que se hallan flotando libremente en el espacio urinario. Así, el podocito se halla fijado a los capilares subyacentes únicamente gracias a los pedicelos. Como consecuencia, existe un espacio entre éstos y el cuerpo celular.

Las prolongaciones primarias nacen en el cuerpo celular, el cual, directamente o después de bifurcarse, se divide en pedicelos, cubriendo éstos la cara externa de la MBG y estableciendo entonces un patrón típico de interdigitaciones con los pedicelos de los podocitos vecinos, dejando entre ellos espacios denominados

hendiduras de filtración, en donde se encuentra el diafragma de la hendidura. Los pedicelos de un mismo podocito no se encuentran en posiciones contiguas, sino que siempre se disponen de manera alternada con los pedicelos de otros podocitos.

Los podocitos están organizados de una manera polarizada, mostrando los dominios apical y basolateral. El dominio basolateral incluye a los pedicelos que están en contacto con la MBG, los que a su vez presentan numerosas vesículas, las que reflejan la alta tasa de endocitosis característica de estas células. La superficie del dominio de la membrana apical, por su parte, se encuentra por encima del diafragma de la hendidura y contiene una capa muy desarrollada de glicoproteínas cargadas negativamente, que es la causa principal de la repulsión a las proteínas que atraviesan el capilar glomerular al reducir con ello la tasa de filtración glomerular.

La capa de glicoproteínas le confiere carga negativa a la barrera de filtración glomerular, siendo esencial para la estructura del mantenimiento de los pedicelos. La carga global negativa se debe principalmente al ácido siálico y a los residuos de sulfato de heparán que contienen las proteínas localizadas en la MBG y los podocitos. Ya se han identificado, en los podocitos y en las células endoteliales renales, las proteínas denominadas podocendina y podocalyxina (Huang, T. W. et al. 1985) (Sawada, H. et al. 1986).

En los procesos de maduración de los riñones, la hendidura diafragmática es sólo un sitio de contacto, de célula a célula, entre los podocitos adyacentes, lo que representa una membrana pequeña de 30-40 nm en la hendidura de filtración (Reiser, J. et al. 2002). Los lípidos, por otra parte, son elementos importantes en la organización funcional de la hendidura diafragmática, ya que forman membranas especializadas ricas en colesterol, glicoesfingolípidos y glicosil-fosfatidilinositol (GPI), ancladas a las proteínas (Simons, K. et al. 1997). También se ha encontrado a la nefrina asociada a estos lípidos (Simons, M. et al. 2001).

Se ha postulado, como estructura del diafragma de hendidura, un modelo semejante al de unas varillas conectadas perpendicularmente a una barra central, formando un patrón en forma de cremallera. Los poros rectangulares de este modelo tienen un tamaño aproximado de 4 x 14 nm, parecido al radio molecular de la albúmina. Además, están relacionados y unidos por la presencia de la proteína *zona occludens* (ZO-1) y por la asociación de esta proteína con el tipo de unión estrecha (UE), asumiéndose, por tanto, que el diafragma de la hendidura representa una modificación de este tipo de unión celular (Rodewald, R. et al. 1974).

Se ha demostrado, sin embargo, que proteínas con otras características a las de la UE, como la simplequina y la occludina, no se encuentran en los podocitos. Además, la ZO-1, que inicialmente se creyó específica de la UE, ha sido visto en otros tipos de uniones como unión adherente (UA). Se ha observado, asimismo, que el diafragma de hendidura presenta algunas características morfológicas

típicas del tipo de la UA, caracterizadas por un amplio hueco intercelular y la presencia de una línea densa central, tal como se puede apreciar en la Figura 4 (Pavenstadt, H. et al. 2003).

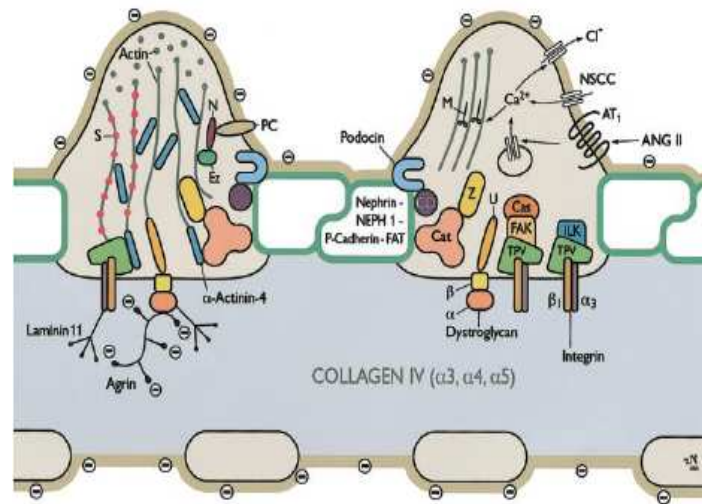


Figura 4.- Estructura molecular de la barrera de filtración glomerular. La Figura muestra dos podocitos y las partes adyacentes que lo integran: Colágena IV, Podocin y Nepfrin. (Pavenstadt, H. et al. 2003).

Además de las células mesangiales, los podocitos son cruciales para el soporte del ovillo glomerular. La segmentación de los podocitos en el cuerpo celular, posee prolongaciones primarias y pedicelos, que pueden observarse en el citoesqueleto.

En las prolongaciones primarias, el citoesqueleto está compuesto principalmente por microtúbulos. En contraste con las proteínas del citoesqueleto, del cuerpo celular y de las prolongaciones primarias, los pedicelos presentan una estructura contráctil, compuesta por actina, miosina II, α-actinina y vinculina. Esta maquinaria se encuentra anclada a la membrana basal mediante el complejo de integrina.

1.1.2 Las células endoteliales

Los capilares glomerulares están formados por un endotelio de 40 nm, compuesto por células planas que presentan aberturas o fenestraciones de 40 a 100 nm, en su pared celular. A diferencia de otros endotelios fenestrados, éste no presenta diafragma que lo aisle del exterior.

Se ha puesto de manifiesto que las células endoteliales no proliferan en presencia de otras células glomerulares, ya sean éstas mesangiales o epiteliales. Por otra

parte, la situación intermedia entre la sangre y los tejidos es un reflejo de una variedad de funciones del endotelio vascular, entre las que se encuentran:

- Construcción de la barrera de filtración glomerular;
- Regulación del tono vasomotor, a través de la secreción de endotelina y del factor derivado de las plaquetas, las cuales estimulan la constricción de las células musculares lisas a través del óxido nítrico y de la prostaciclina, favoreciendo así la relajación de las mismas;
- Mantenimiento de la fluidez sanguínea;
- Iniciación de focos inflamatorios, a través de la secreción de sustancias vasoactivas que modifican la hemodinámica vascular y favorecen el reclutamiento de leucocitos. Las moléculas que facilitan la adhesión de los leucocitos al endotelio son las selectinas, las integrinas y las inmunoglobulinas (ICAM, VCAM);
- Activación de la respuesta inmunitaria, al dirigir la recirculación de leucocitos y actuar como células presentadoras de antígenos; y
- Participación en la formación de vasos sanguíneos.

Las diferentes funciones de las células endoteliales sugieren que éstas pueden afectar a algunos procesos patológicos, contribuyendo de este modo a la lesión glomerular. Estos procesos incluyen estados de hiperfiltración, hipercoagulación dentro del capilar glomerular, y aumento de interacciones con los leucocitos.

La presencia de leucocitos dentro del glomérulo, en algunas enfermedades inflamatorias o inmunes, aumenta la susceptibilidad de las células endoteliales a ser activadas por citocinas u otros mediadores inflamatorios expresados en la membrana, moléculas de adhesión, facilitando de este modo la interacción de leucocitos, neutrófilos y macrófagos con el endotelio glomerular.

En condiciones de isquemia, los neutrófilos normalmente son activados estimulando la secreción de radicales libres de oxígeno, citocinas y sustancias vasoactivas, las que, al activar a las células endoteliales y sustancias quimiotácticas, facilitan con ello la infiltración continua de moléculas en el glomérulo.

Se ha observado, también, que en numerosas enfermedades de origen inmunológico, como en lupus eritematoso sistémico y esclerodermia, el daño endotelial glomerular es mediado a través de la activación del sistema del complemento.

1.1.3. Las células mesangiales

El mesangio glomerular ocupa una posición intracapilar en el glomérulo. Está compuesto por células mesangiales y por un material fibrilar amorfo, la matriz mesangial, situada en los espacios existentes entre las células que forman los canales mesangiales. Anatómicamente, el mesangio está separado del lumen capilar únicamente por el endotelio y no por la membrana basal glomerular (MBG). Debido a su contacto directo con el endotelio fenestrado entre la luz del capilar glomerular y el mesangio, éste se encuentra constantemente perfundido por las macromoléculas y los residuos de filtración que se acumulan en el mesangio. Lo anterior es de gran importancia cuando involucra a complejos inmunológicos, citocinas y factores de crecimiento, ya que estas sustancias son capaces de modificar las respuestas fisiológicas y la biología de las células glomerulares.

La matriz mesangial está compuesta principalmente por colágena tipo IV y V, además de glicoproteínas como la laminina, la fibronectina y los proteoglicanos, especialmente sulfato de heparán y sulfatos de coidritin. Estos componentes de la matriz son sintetizados especialmente por las células mesangiales.

Siendo células de naturaleza mioepitelial, las células mesangiales forman parte del componente vascular del glomérulo, lo cual queda demostrado por el hecho de que, a nivel del polo vascular glomerular, se continúan con las células musculares lisas de la arteriola aferente y, además, por la presencia, en el citoplasma, de filamentos de actina-miosina, lo que se ha denominado mesangio extraglomerular. Generalmente, estas células se caracterizan por un citoesqueleto intracelular de fibrillas de actina, miosina (propia de células contráctiles), desmina y vimentina.

Las células mesangiales presentan una forma irregular, con numerosos pseudópodos de diferentes longitudes. En el interior de estas células es frecuente el hallazgo de vacuolas fagocíticas dilatadas por el material ingerido, lo que sugiere propiedades fagocíticas, habiéndose encontrado también una pequeña población de células residentes, del tipo macrófagos /monocitos.

Algunas de las atribuciones del mesangio, en la función glomerular, son:

- 1) Servir de soporte estructural del glomérulo;
- 2) Generación y recambio de la matriz mesangial mediante la secreción de tromboxano (aumento de producción de matriz) y prostaglandinas, así como una disminución del tamaño de la membrana extracelular (mem. ext.);
- 3) Servir como punto central de diferentes agentes vasoactivos, tales como:

- ❖ *Vasoconstrictores*, como la angiotensina II, la endotelina, la vasopresina y la norepinefrina; y
 - ❖ *Vasodilatadores*, como la péptido auricular, el óxido nítrico, las prostaglandinas PGE₂ y PGI₁ y la dopamina, así como mediadores inflamatorios, factores de crecimiento, y citocinas, con efectos sobre la hemodinámica local, proliferación celular y recambio de la matriz; y
- 4) Producción de mediadores vasoactivos y agentes de crecimiento, como las prostaglandinas y tromboxanos generadores de activadores e inhibidores del plasminógeno.

Junto con los macrófagos glomerulares, las células mesangiales eliminan macromoléculas e inmunocomplejos del glomérulo debido a su actividad fagocítica. Se ha encontrado también que las células mesangiales expresan el receptor clásico para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

1.2 Fisiología del riñón

La función esencial del riñón es la de preservar, mediante la remoción de agua y de los metabolitos finales que dañan al organismo, como el ácido úrico, fosfatos, sulfatos, urea, creatinina, electrolitos y el fluido corporal, la regularización de la presión sanguínea y de los solutos esenciales (sodio, cloro, bicarbonato, glucosa y aminoácidos). Por su parte, la función de los glomérulos renales es la de formar, ante la presión de la pared capilar glomerular semipermeable, una barrera física para impedir el fluido de moléculas del plasma hacia el espacio urinario (Miner, J. H. 2003).

Los componentes del plasma pasan libremente por el endotelio fenestrado y llegan sin resistencia hasta la MBG, a través de la cual las moléculas pequeñas pasan extracelularmente, haciéndolo en forma continua hacia los poros de la hendidura de los podocitos. El paso de albúmina y de otras proteínas plasmáticas, de cualquier tipo, están restringidas por la MBG, la que, mediante cargas selectivas, sirve como barrera para macromoléculas (D'Amico, G. et al. 2003).

Los epitelios tubulares, por otra parte, tienen la capacidad única de transportar solutos y agua desde una superficie a otra. El transporte vectorial es consecuencia directa de la polarización de la membrana celular del epitelio en dos dominios distintos, la apical y la basolateral. Las células epiteliales correspondientes se encuentran unidas entre sí por complejos de unión intercelulares, ubicados entre la membrana apical y lateral.

Como consecuencia de la anatomía del epitelio, dos distintas vías de transporte transepitelial están arregladas en paralelo, yendo una a través de la célula

denominada transcelular y, la otra, llamada ruta paracelular, entre las células vecinas, lo que implica pasar a través de los complejos de la unión intracelular.

1. 2.1 Filtración glomerular

La creatinina se sintetiza en el hígado y es el producto final del metabolismo de proteínas del músculo. Su filtración ocurre a nivel glomerular y no es absorbida a nivel tubular, pero se excreta como catión endógeno de tal manera que es un buen indicador de filtración glomerular. Por ello, la depuración de creatinina (Dcr) es un parámetro confiable de funcionalidad renal, específicamente a nivel glomerular, empleándosele frecuentemente para evaluar la velocidad de filtración glomerular (VFG).

En condiciones normales, la carga filtrada de sodio (Na) es absorbida casi en su totalidad, lo que es indicativo de que en la orina sólo se encuentran pequeñas cantidades variables de esta sustancia, debido a que son reabsorbidas en el túbulo proximal (Aronson, P. S. 1996).

A su vez, la homeostasis de potasio (K) depende de dos operaciones de transporte, siendo una de ellas la responsable de una distribución desigual entre los compartimentos intra y extracelulares y, la otra, de una excreción renal efectiva. La regulación de la excreción de K es una operación compleja, que se efectúa prácticamente a lo largo de casi toda la nefrona, donde se realizan tres procesos importantes: 1) la filtración glomerular; 2) la absorción, que se lleva a cabo en el túbulo proximal (65%) y asa de Henle (25%); y 3) el transporte bidireccional, en los sitios distales y colectores (túbulo distal y colector) (Giebisch, G. 1998) (Giebisch, G. H. 2002).

La circulación de las sustancias en el riñón se realiza en base a tres procesos fundamentales como son: filtración glomerular, reabsorción tubular o secreción tubular, en donde muchos solutos pasan la permeabilidad capilar libre bajo filtración, seguido por la reabsorción tubular o secreción tubular de varios segmentos de la nefrona.

En 1924 se demostró (Wean JT et al. 1924) que el paso inicial en el proceso de formación de la orina es la filtración de un líquido casi sin proteínas, a través de las paredes de los capilares glomerulares. Aunque las proteínas quedan excluidas del ultrafiltrado, la barrera de filtración permite que, casi sin ningún impedimento, pasen por ella electrolitos, aminoácidos, glucosa, creatinina y moléculas exógenas de dimensiones al menos tan grandes como la inulina (5.000 kDa, radio molecular ~14) (Brenner, B. M. et al. 1971), así como macromoléculas de dimensiones conocidas, como dextranos o ficoll .

El balance neto entre el gradiente de presión hidrostática transcapilar (ΔP) y el gradiente de presión osmótica transcapilar ($\Delta \pi$), junto con la permeabilidad hidrostática de la barrera de filtración (K), determinan la tasa de movimiento de líquido (Jv) a través de cualquier punto de la pared del capilar (K). En cualquier

localización del capilar glomerular, la ecuación de Starling se expresa según la siguiente formulación:

$$\begin{aligned} J_v &= K (\Delta P - \Delta \pi) \\ &= K [(P_{CG} - P_T) - (\pi_{CG} - \pi_T)], \end{aligned}$$

en donde las presiones hidrostáticas de los capilares glomerulares y del espacio de Bowman se designan, respectivamente, como P_{CG} y P_T , mientras que π_{CG} y π_T son las correspondientes presiones osmóticas coloidales. Dado que la concentración de proteínas del líquido, en el espacio de Bowman, es básicamente igual a cero, π_T es también cero. La tasa de filtración total, para la nefrona intacta (FGNI), se determina por el producto del área de superficie de filtración (S) y el gradiente de la longitud de los capilares glomerulares, mediante la fórmula:

$$\begin{aligned} \text{FGNI} &= KS \times (\Delta P - \Delta \pi) \\ &= K_f P_{UF}, \end{aligned}$$

donde K_f es el coeficiente de ultrafiltración glomerular correspondiente al producto de S y K y P_{UF} el valor medio de la presión de ultrafiltración neta, mientras que ΔP y $\Delta \pi$ son las diferencias de las presiones medias transcápilar, osmótica y coloidal, respectivamente.

En las enfermedades renales, las alteraciones anatómicas de los diversos componentes de la barrera de filtración glomerular desempeñan un papel decisivo en la determinación de la conductividad hidrostática glomerular y, por consiguiente, de la filtración glomerular. En la nefropatía de cambios mínimos y en la glomerulopatía membranosa, la reducción de la frecuencia de las hendiduras de filtración se convierte en un factor mucho más significativo que el espesor de la MBG, para la determinación de la resistencia al flujo hídrico (Drumond, M. C. et al. 1994).

El FGNI, es el producto del coeficiente de ultrafiltración K_f y la fuerza de impulsa neta para la ultrafiltración (P_{uf}), promediada en toda la longitud de los capilares glomerulares. En experimentos con ratas Munich-Wistar hidropénicas, en donde se emplearon solamente machos o combinación de machos y hembras, el valor de la ultrafiltración se situó en valores promedios de 3.5 ± 0.2 nl/(min/mmHg), en tanto que en pruebas que utilizaron sólo ratas hembras se encontraron valores promedios de 2.5 ± 0.3 nl/(min/mmHg) (Conger, J. D. et al. 1981) (Oken, D. E. et al. 1985). Las diferencias relacionadas con el sexo, sin embargo, en los valores del coeficiente de ultrafiltración, parecen estar en gran medida mayormente asociadas a las propias diferencias en el tamaño de los animales, mientras que, cuando se analizan en función del peso corporal, la mayoría de las diferencias entre machos y hembras desaparece.

En la medida en que se alcanza el equilibrio de la presión de filtración, se prevé que los cambios se darán proporcionalmente al FGNI. Esto se debería a que, en

ausencia de alteraciones en cualquiera de las otras magnitudes determinantes del FGNI, el aumento de los nl/min (QA) reduciría la velocidad en que se incrementa la concentración de las proteínas plasmáticas y, por consiguiente, de la presión osmótica coloidal transcápilar, en la red capilar glomerular. Habría que deducir, por tanto, que el punto en que se alcanza el equilibrio de filtración se desplazaría hacia el extremo aferente de la red capilar glomerular (Deen, W. M. et al. 1972).

En una amplia diversidad de enfermedades renales, como la glomérulonefritis experimental (Kon, V. et al. 1983) (Maddox, D. A. et al. 1975) (Ichikawa, I. et al. 1988) y la insuficiencia renal aguda (Blantz, R. C. 1975) (Daugharty, T. M. et al. 1974), el coeficiente de ultrafiltración glomerular se halla reducido, al mismo tiempo que, en la nefrosis inducida por aminoglucósidos (Bohrer, M. P. et al. 1977) y la mal nutrición proteica crónica pueden afectar al K_f . Además, la permeabilidad hidrostática de la MBG está en relación inversa con AP, lo que sugiere que el K_f puede verse afectado directamente por el ΔP , al igual que la conductividad hidrostática de la MBG y del K_f puede verse también afectados por la concentración de proteínas plasmáticas (Daniels, B. S. et al. 1992).

En la ultrafiltración glomerular influyen diversas hormonas y sustancias vasoactivas que afectan a las arterias arciformes, interlobulillares, aferentes y eferentes, con lo que se regula el tono de los vasos de resistencia pre y posglomerular que controlan el flujo sanguíneo renal (FSR), la presión hidrostática capilar glomerular y el gradiente de la presión hidrostática transcápilar glomerular, siendo el mesangio del glomérulo el punto de acción y producción de muchas de estas sustancias.

Varios factores de crecimiento pueden afectar la filtración glomerular, al favorecer la proliferación de las células mesangiales y la expansión de la matriz mesangial, con la consiguiente obstrucción de las asas capilares y la reducción del coeficiente de ultrafiltración. (Ichikawa, I. 1982) (Osswald, H. et al. 1979) (Becker, C. G. 1972) (Haley, D. P. et al. 1987) (Zimmerhackl, B. et al. 1985). Además, la contracción de las células epiteliales glomerulares (podocitos) que contienen moléculas de actina filamentosa (F-actina) pueden disminuir el número o tamaño de las hendiduras de filtración, lo que naturalmente altera la conductividad hidráulica de las vías de filtración y reduce el coeficiente de ultrafiltración (Andrews, P. M. et al. 1983).

La compleja barrera de filtración que implica la filtración glomerular, es un marcador de daño glomerular. En ella intervienen tres componentes distintos: 1), el endotelio glomerular; 2), la membrana basal glomerular (MBG); y 3), las hendiduras de filtración, existentes entre los pedicelos de las células epiteliales glomerulares. Dichas hendiduras contienen una barrera adicional para la filtración, conocida como diafragma de hendidura de filtración.

Los modelos matemáticos que utilizan detalles ultraestructurales conocidos y las propiedades hidrodinámicas de cada uno de los componentes de la barrera ultraestructural, sugieren que el endotelio capilar fenestrado ejerce sólo alrededor

del 2% de la resistencia hidrostática total mientras, que la membrana basal alcanza el 50%, localizándose el resto en las hendiduras de filtración situadas entre los pedicelos epiteliales del glomérulo. (Deen, W. M. et al. 2001).

Las alteraciones anatómicas de los diversos componentes de la barrera de filtración glomerular, desempeñan un papel decisivo en la determinación de la conductividad hidrostática glomerular y, por consiguiente, de la filtración glomerular en las enfermedades renales. Es importante mencionar que existen otros factores que influyen en la filtración glomerular, como son las familias de canales de cloro abierto, por voltajes, que se encuentran en la membrana plasmática renal y juegan un rol importante en el transporte transepitelial. Algunos de estos canales de cloro se encuentran ampliamente expresados en el riñón, principalmente en el asa de Henle y en los túbulos colectores (Takeuchi, Y. et al. 1995). Los podocitos, por su parte, son dañados de muchas formas por las enfermedades glomerulares humanas y experimentales, incluyendo Glomerulosclerosis Focal Segmentaria, Glomerulopatía Colapsante, Nefropatía Diabética, Glomerulopatía Membranosa, Nefritis lúpica y la Enfermedad de Cambios Mínimos (Somlo, S. et al. 2000), (Endlich, K. et al. 2001), (Eddy, A. A. et al. 1998).

1.2.2 Regulación de sodio y agua

El volumen urinario mínimo depende de la cantidad de materiales de desecho que deben ser eliminados y de la capacidad de concentración del riñón. La osmolaridad es uno de los aspectos del medio interno que se mantienen con variación mínima, entre 286 y 292 mmol/L, gracias al control de la sed, de la hormona antidiurética (HAD) o vasopresina (AVP) y de la función renal. Antes de la caracterización bioquímica de la AVP, los estudios iniciales sobre la antidiuresis emplearon el término hormona antidiurética para describir esta sustancia (Schwartz, W. B. et al. 2001). La sed se regula principalmente por estímulos osmóticos y aparece cuando la osmolaridad excede los 290 mmol, liberando simultáneamente AVP, para así concentrar la orina al máximo y conservar el balance hídrico durante la privación de agua.

El sodio (Na^+) es el catión determinante del volumen del líquido extracelular (LEC). El volumen circulante arterial efectivo (VAE) se refiere a la porción del LEC que perfunde adecuadamente los tejidos. En general, el VAE varía directamente con el volumen del LEC y ambos aumentan con las cargas y disminuyen con las pérdidas de Na^+ , por lo cual el control del balance de Na^+ y del VAE son funciones íntimamente relacionadas.

El riñón es el regulador más importante del balance de Na^+ , respondiendo de modo característico a cambios en el VAE. Cuando se produce un aumento en el volumen del LEC, tal como ocurre, por ejemplo, después de una carga de Na^+ , la excreción de sal aumenta, para regresar posteriormente al volumen normal. Por el contrario, en presencia de la depleción de volumen, como se puede apreciar en la

restricción de Na^+ , el riñón retiene sodio para restablecer después el volumen circulatorio efectivo. La excreción de Na^+ , por su parte, está determinada por diversos factores, en donde habría que citar principalmente la carga filtrada de Na^+ , la actividad mineralocorticoide y los cambios en la reabsorción tubular proximal y distal (factores físicos peritubulares, factores natriuréticos hormonales, factor natriurético auricular, etc.), demostrándose además la participación del sistema nervioso simpático y factores vasodilatadores, como cininas y prostaglandinas.

La depleción del volumen intravascular depende del llenado vascular y de la acción de los vasos comunicantes que afectan al resto de los territorios del espacio extracelular, incluyendo el intersticio de los órganos, fundamentalmente del riñón. Cuando cae la presión intersticial, baja la presión de perfusión y se estimulan, a lo largo de la nefrona, los mecanismos retenedores de Na^+ .

Los sujetos normales mantienen en equilibrio el metabolismo del sodio, el que básicamente depende de un balance entre la ingestión y excreción del mismo. En ambas situaciones y a pesar de que el cuerpo redistribuye los líquidos hacia los espacios más necesitados, son los mecanismos intrarrenales los encargados de corregir el déficit o el exceso de volumen y de eliminar su exceso en situaciones de expansión, o de retener líquidos en un afán por evitar la hipotensión y el choque hipovolémico en situaciones de depleción.

1.2.3 Regulación de la osmolaridad plasmática

La osmolaridad plasmática se define como la concentración de todos los solutos en un volumen de agua y se mide en miliosmoles (mOsm). La osmolaridad plasmática no siempre equivale a la osmolaridad total, denominada a veces tonicidad del plasma, porque ésta depende de las propiedades de permeabilidad relativa a los solutos de las membranas que separan los dos compartimentos que ocupan los líquidos intra y extracelular.

Los solutos impermeables a las membranas celulares (Na^+ , manitol) están restringidos al compartimento del LEC, siendo solutos eficaces porque forman gradientes de presión osmótica a través de las membranas plasmáticas, lo que produce el movimiento osmótico del agua desde el LIC al LEC.

La osmolaridad plasmática permanece constante gracias a la ingestión de agua, cuyo balance se mantiene gracias a dos mecanismos fundamentales de regulación cerebral, integrados en el hipotálamo anterior, la sed y la liberación de AVP, regulando así la excreción de agua urinaria y la de agua libre.

La ingestión de agua está mediada por ajustes en los mecanismos de la sed y de la excreción gracias a una respuesta normal del sistema hipotalamohipofisiario, el cual libera la AVP y regulan la respuesta renal de esta hormona a través de mecanismos de concentración y dilución de la orina, aunque en casos de

deshidratación la ingestión de agua bloquea o frena la hiperosmolaridad plasmática. Los pacientes con diabetes insípida que cursan con ausencia de la AVP, mantienen la osmolaridad y la concentración de Na^+ sérico dentro de límites normales, a pesar de una diuresis de 10 o más litros por día. Esto nos explicaría el que un individuo con acceso irrestricto e ilimitado al agua difícilmente presenta hipernatremia o hiperosmolaridad sintomática. Por el contrario, una carga aguda de agua reduce la osmolaridad plasmática y produce una orina diluida y una excreción de agua libre, pero en ciertas enfermedades renales, como en la insuficiencia renal crónica, ocurre la reducción de la capacidad renal de excretar orina.

La AVP constituye una de las principales líneas de defensa que tiene el organismo para ahorrar agua en caso necesario o para deshacerse de ella, cuando existe un exceso. Cuando la orina alcanza la porción terminal de la nefrona (túbulo distal y túbulo colector), se produce una reabsorción final del agua si existe AVP, permitiendo con ello que se elimine orina en forma hipertónica, mediante la estimulación de los receptores tubulares renales. Es así cómo, en unos cuantos minutos, la AVP permite que el funcionamiento renal pase a convertirse en un órgano excretor de agua en vez de uno retenedor, dejando de excretar cuando la osmolaridad se encuentra por debajo de 280 mOsm/L.

En los glomérulos se filtran alrededor de 100 litros de agua por metro cuadrado en un día, reabsorbiéndose en los túbulos proximales el 99% de este volumen, en un estado de salud normal. Esta primera reabsorción se hace en forma isosmótica con el plasma, en proporciones iguales agua y sodio, además de bicarbonato y cloro. A su vez, en la parte final de la porción gruesa de la rama descendente del asa de Henle se absorbe el 80% del líquido filtrado, el que, absorbido por el intersticio, es finalmente recuperado en los capilares corticales.

En la porción descendente delgada del asa de Henle, en tanto, continúa reabsorbiéndose agua y entrada de sodio desde el espacio intersticial hacia el líquido tubular, lo cual hace que el líquido intratubular aumente progresivamente su concentración de solutos, hasta alcanzar un máximo de 1200 miliosmoles al llegar a la papila renal. La porción ascendente del asa de Henle, por su parte, tiene la particularidad de ser permeable al agua y de extraer sodio del líquido tubular, con lo cual la concentración de solutos disminuye hasta llegar a ser hiposmótico al inicio del túbulo contorneado distal. A este proceso se le llama mecanismo contracorriente. La acción de este mecanismo depende de que haya una hipertonicidad adecuada en la médula renal, lo que está dado por la concentración de sodio y urea.

1.2.4 Mecanismos intrarrenales de retención de sodio

Durante la depleción de volumen, la reducción en la filtración glomerular se asocia con aumento en la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, disminuyendo la cantidad de líquido que deja el túbulo proximal al llegar a la porción gruesa de la

rama ascendente del asa de Henle; lugar en donde la reabsorción de cloruro de sodio (NaCl) se lleva a cabo gracias a la acción del cotransportador: dos clorosodio potasio ($2\text{Cl}^-/\text{Na}^+\text{K}^+$).

Los mecanismos que participan en el aumento de la reabsorción de sodio, en esta porción del asa, reducen drásticamente la llegada de este elemento a los sitios más distales de la nefrona. Algunos de estos segmentos distales tienen baja capacidad de transporte, siendo capaces, sin embargo, de absorber sodio en contra de gradientes muy grandes y determinar, finalmente, una excreción de orina prácticamente libre de sodio, ya que la porción apical de la membrana tubular reduce la reabsorción de sodio en virtud de que en esa zona disminuye el número de canales de sodio.

1.2.5 Excreción y reabsorción renal de agua

En términos de conservación de agua, lograr una máxima concentración urinaria no es tan importante como lo es conservar la orina isotónica. Un adulto promedio excreta alrededor de 600 mml/día. Con orina diluida a un máximo de 60 mml/Kg se requieren alrededor de 10 litros para excretar la carga de solutos ($600/60=10$), pero si la orina se excreta en forma isotónica (300 mml/kg) sólo se requerirán 2 litros ($600/300=2$), en tanto que si se concentra al máximo se requerirán unos 500 ml ($600/1200=0.5$).

El riñón contribuye a mantener una osmolaridad plasmática estable al excretar y reabsorber agua sin solutos (agua libre). La osmolaridad plasmática y el volumen intravascular efectivo controlan la secreción de AVP y, por medio de esta hormona, la osmolaridad urinaria. El aumento de la osmolaridad plasmática o la depleción del volumen extracelular producen un incremento en la secreción de AVP y en la osmolaridad urinaria, pero cuando cae la osmolaridad plasmática o la expansión del volumen extracelular, se reduce asimismo la secreción de la AVP y la osmolaridad de la orina.

La depuración osmolar, por otra parte, es la porción de orina que se excreta en forma isotónica, mientras que la depuración de agua libre (DH_2O) es el volumen de orina que puede ser excretado libre de solutos. Para calcular la depuración osmolar se utiliza la misma fórmula que para cualquier otra depuración: UV/P , en donde U es la osmolaridad urinaria, V el volumen urinario por minuto y P la osmolaridad plasmática. La depuración de agua libre, a su vez, se expresa como V —depuración osmolar.

II GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE

En 1986, Weiss y cols. describieron a 6 pacientes negros con Síndrome Nefrótico severo, los que exhibían una clinicopatología inusual compleja y formas agresivas de daño glomerular, caracterizadas por datos histológicos de colapso global o segmental de los capilares glomerulares, retracción de la membrana basal glomerular y marcada hipertrofia e hiperplasia de los podocitos, así como lesión de las células epiteliales viscerales y daño túbulo intersticial. Los pacientes presentaban además proteinuria de más de 10 g en orina de 24 horas, derivando rápida y progresivamente, debido a complicaciones del síndrome nefrótico, a una insuficiencia renal terminal o a la muerte, a pesar de cualquier forma de tratamiento (Weiss, M. A. et al. 1986).

La Glomerulopatía Colapsante (GC) se presenta en forma primaria (idiopáticas) y secundaria (sistémica) (Daha, M. R. 2000), siendo esta última reconocida primeramente en asociación con el abuso de drogas intravenosas o inhaladas (Gupta, K. et al. 2006) o por infección del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (D'Agati, V. 1994). También se ha reportado esta enfermedad en no portadores de HIV (Detwiler, R. K. et al. 1994), (Laurinavicius, A. et al. 1999), (Grcevaska, L. et al. 1999) (Lu, T. C. et al. 2005).

La GC idiopática se ha encontrado asociada con la infección del parvovirus B19, en donde se especula que el daño renal depende de la severidad del virus y de la susceptibilidad individual (Wong, T. Y. et al. 1999), (Moudgil, A. et al. 2001). Esta infección por parvovirus B19 esta mayormente implicada y con mas frecuencia en pacientes con glomerulopatía focal segmentaria, idiopática y colapsante, que en enfermos con otros diagnósticos (Tanawattanacharoen, S. et al. 2000).

También se ha asociado la GC idiopática a infección aguda por citomegalovirus (Presne, C. et al. 2000), (Tomlinson, L. et al. 2003) y asimismo atañida al trasplante renal, con infección de parvovirus B19 (Moudgil, A. et al. 1997), (Barsoum, N. R. et al. 2002) y sin asociación infecciosa (Meehan, S. M. et al. 1998), (Korbet, S. M. et al. 1988), (Clarkson, M. R. et al. 1998), (Toth, C. M. et al. 1998), (Nadasdy, T. et al. 2002) encontrándose también en infecciones como tuberculosis, leishmaniasis visceral y en el edema agudo pulmonar no cardiogénico (Coventry, S. et al. 2004), (Leblond, V. et al. 1994), (Wiederkehr, M. R. et al. 2002). Por otra parte, se han descrito pacientes con algún tratamiento prolongado, con pamidronato e interferón, en este tipo de glomerulopatía (Markowitz, G. S. et al. 2001), (Stein, D. F. et al. 2001), (Kunin, M. et al. 2004), (Barri, Y. M. et al. 2004), (Dijkman, H. B. et al. 2006).

Además, se ha encontrado la GC relacionada a desórdenes que perturban la homeostasis inmune, de tal modo que esto sugiere cierto papel de la activación inmune en el desarrollo de esta enfermedad, como en la enfermedad de Still (Bennett, A. N. et al. 2004), (Kumar, S. et al. 2004) y de lupus eritematoso sistémico (Wei, R. G. et al. 2004), (Arbel, O. et al. 2005), (Marques, L. P. et al.

2005), (Amoura, Z. et al. 2006). Una relación positiva se ha observado también en la expresión de moléculas de adhesión de las superfamilias de las inmunoglobulinas y (ICAMs), un marcador de regulación de los podocitos en la GC de HIV experimental en ratones (Hayashi, K. et al. 2005), (Kaufman, L. et al. 2007).

Los mecanismos de desregulación son claramente diferentes en las enfermedades renales; sin embargo, el único patrón nuevo más frecuentemente encontrado en pacientes con el virus HIV es el de la GC (Laurinavicius, A. et al. 2002), en donde los eventos intracelulares son aún desconocidos, aunque se conoce que causan defectos regulatorios en las células glomerulares y epiteliales tubulares. Un estudio retrospectivo realizado en México, en riñones de pacientes con HIV, indicó que el 63% tenían enfermedad renal y, de éstos, el 48% colapso glomerular y sólo el 32% glomeruloesclerosis focal segmentaria (Soriano-Rosas, J. et al. 1998). Estudios en biopsias renales han reportado que del 5 al 11% padecían GC (Thomas, D. B. et al. 2006), (Deegens, J. K. et al. 2008).

En los glomérulos existe desregulación de los podocitos, observándose, como consecuencia de una severa lesión túbulointersticial, (proliferación y apoptosis en las células epiteliales tubulares, (Schwartz, E. J. et al. 2001) (Yang, Y. et al. 2002). Otros estudios indican que las células epiteliales parietales sólo pueden ser acopiadas dentro de la lesión proliferativa localizada visceralmente (Dijkman, H. et al. 2005) (Dijkman, H. B. et al. 2006). Esto sugiere que distintos mecanismos patogénicos pueden inducir el patrón de daño glomerular en la GC mediante decrecimiento en el número de podocitos, asociado a otras formas estructurales de glomeruloesclerosis, focal y segmentaria (D'Agati, V. 2003).

La GC afecta a personas de cualquier sexo, aunque con predominio del sexo femenino y personas jóvenes. En el injerto renal se puede presentar como recidiva o de *novo*. En algunos países predomina en la raza negra, tal como generalmente sucede frecuentemente con otras enfermedades renales.

La GC comparte algunos datos clínicos e histológicos con la esclerosis focal segmentaria recidivante, por lo que ha habido cierta controversia de que se trate de una variante de esta enfermedad (Avila-Casado, M. C. 1999). Sin embargo, se le ha clasificado como una variante celular de esclerosis focal y segmentaria, caracterizada por una podocitopatía con colapso capilar y fibrosis. Un estudio realizado en México concluye que la GC puede estar asociada a desórdenes genéticos, al igual de lo que sucede con el síndrome nefrótico congénito o con la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (Avila-Casado, M. C. et al. 2003) (Scaglia, F. et al. 2003) (Badhwar, A. et al. 2004) (Nasr, S. H. et al. 2006), sospechándose también que en el síndrome nefrótico ciertas proteínas circulantes incrementan la permeabilidad glomerular (Dantal, J. et al. 1994).

La patogénesis de la GC ha motivado intensas investigaciones, de corte experimental, las cuales han utilizado durante los últimos 15 años varios modelos murinos, de preferencia a la rata Sprague-Dawley, desarrollándoles la enfermedad

mediante la administración de suero de pacientes con GC (Avila-Casado, Mdel C. et al. 2004). La rata Zucker fa/fa, por otra parte, desarrolla en forma natural gloméruloesclerosis focal segmentaria, con colapso glomerular (Gassler, N. et al. 2001). Asimismo, el ratón transgénico ha sido diseñado para reproducir esta enfermedad (Dickie, P. et al. 1991), (Kimura, T. et al. 2003), (Dickie, P. et al. 2004), (Zhong, J. et al. 2005), (Matsusaka, T. et al. 2005), (Powell, D. R. et al. 2005). Se ha utilizado este modelo con el anticuerpo anti-thy 1.1, lográndosele inducir la gloméruloesclerosis focal y segmentaria (Smeets, B. et al. 2004).

También se ha desarrollado la glomeruloesclerosis focal y segmentaria en la rata transgénica (Ray, P. E. et al. 2003), a la vez que el ratón kd-kd ha presentado lesiones similares a la GC humana. Los resultados indican que éste puede ser un modelo con posibilidades de equivalencia a la GC humana, siendo susceptible de tener un gen común con los pacientes afectados por GC (Barisoni, L. et al. 2005). En ratas tratadas con aminoglucósidos, del tipo de la puromicina, se ha encontrado también desarrollada este tipo de glomerulopatía (Kim, Y. H. et al. 2001), en tanto que en los modelos animales que presentaron GC idiopática no se han encontrado diferencias anatomopatológicas, en relación a la infección por HIV, a excepción de que esta última presenta inclusiones túbuloreticulares endoteliales.

La GC es una forma severa de glomeruloesclerosis focal y segmentaria, caracterizada por colapso glomerulocapilar y adherencias de la membrana basal glomerular, junto con hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales viscerales adyacentes, retracción del penacho glomerular y cambios en la morfología de los podocitos. (Bariety, J. et al. 1998). Además de fibrosis y atrofia, en la GC ocurre una marcada hipertrofia, hiperplasia y proliferación de las células viscerales epiteliales, con colapso glomerular. Al inicio, los cambios observados son hipertrofia de las células epiteliales y colapso capilar, seguido de la pérdida de las células endoteliales y mesangiales, presentando al final lesión glomerular de glomerulopatía colapsante y adhesiones de gotas grandes hialinas, a la cápsula de Bowman's y a las células epiteliales. Los cambios tubulares (atrofia) y los cambios intersticiales (edema, fibrosis e infiltración de células mononucleares) son también frecuentes. (Nagata, M. et al. 1998), (Grcevska, L. et al. 1999).

En la glomerulopatía colapsante se ha estudiado la participación de algunas proteínas en el ciclo celular regulatorio, lo que se describe a continuación en la siguiente Tabla.

Glomerulopatía Colapsante

	Tipo de célula	Ciclina	CDK	Inhibidor de CDK
Proliferación	Podocito	↑A ↓D1	↓CDK5	↓p27, ↓p57, ↓p21

↑incremento medio ↓decrece medio
Sinasa ciclín dependiente (CDK).
(Marshall, C. B. et al. 2006)

Un tratamiento óptimo para la GC es aun desconocido. Los tratamientos pueden incluir esteroides o ciclosporina A, en adición de hipotensores del tipo de los inhibidores de la enzima convertidora angiotensina y/o bloqueadores de los receptores de angiotensina II, así como agentes antilipémicos (Schwimmer, J. A. et al. 2003), (Berggren, R. et al. 2005) e inhibidores de CDK/GSK- y glycogen synthase kinase -3 (Soos, T. J. et al. 2006). Se ha buscado, asimismo, bloquear los receptores de los opiodes que provocan la GC (Gupta, K. et al. 2006).

III UNIÓN ESTRECHA

Varios mecanismos de reabsorción tubular de iones y agua suceden a través de dos vías de transporte: la transcelular y la paracelular. La ruta transcelular opera por medio de transportadores de origen proteico localizados en la membrana celular, utilizando para ello proteínas especializadas que forman canales iónicos para potasio, calcio, glucosa y aminoácidos, así como agua. Esta vía utiliza también transportadores que son proteínas, encargados de la translocación selectiva de iones orgánicos e inorgánicos.

El transporte paracelular sucede en el espacio de las moléculas de adhesión de la unión entre célula-célula, en especial de las (UEs) localizadas en los epitelios y endotelios de los diferentes segmentos que forman la nefrona. Esto sucede en grado variable a lo largo de la nefrona y depende de las funciones de las proteínas de la unión estrecha. Estas proteínas incluyen la ocludina, las claudinas y las moléculas de adhesión de las superfamilias de las inmunoglobulinas (JAM, por sus siglas en inglés; *Junctional adhesión molecules*). Se localiza en la misma unión estrecha de las células, en tanto que la zona ocludens (ZO) ZO1, ZO2, ZO3 y la Cingulina son proteínas citoplasmáticas asociadas a las UE, aunque no formando parte de la misma. Estas uniones las podemos observar en las figuras 5A y 5B.

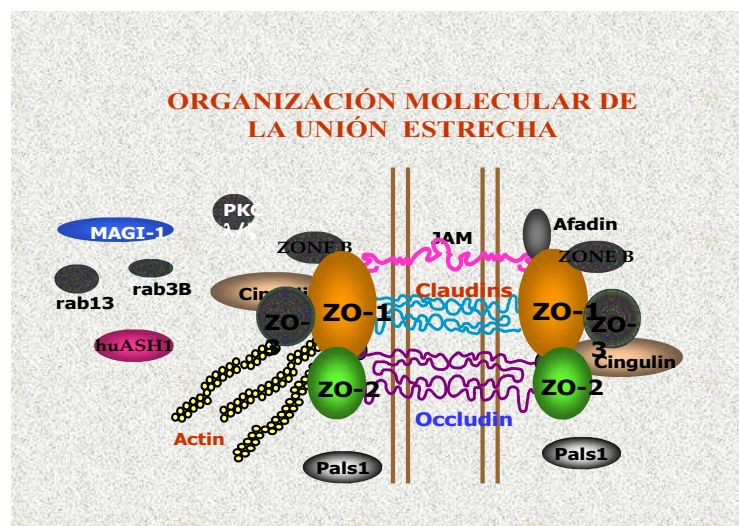
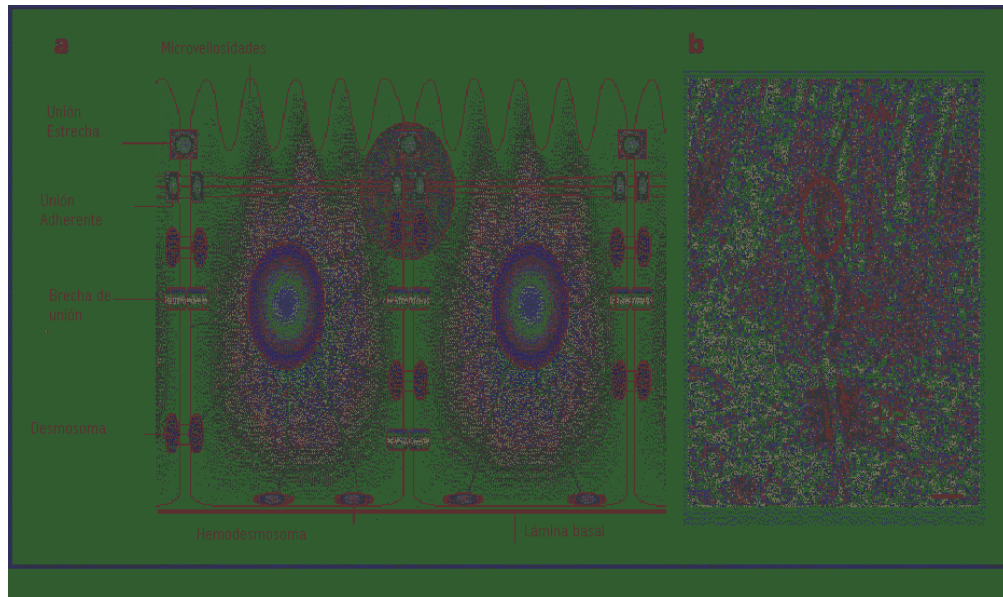


Figura 5A.- Estructura molecular de la UE, donde se observan la ocludina, claudina, ZO-1, ZO-2 y cingulina, así como actina.

COMPLEJO DE UNION CELULAR



(Tsukita, S. et al. 2001)

Figura 5B. – Localización de las UEs en las células epiteliales (ruta paracelular): (a) esquema de localización de las UEs en epitelio plano simple, y la asociación con la ruta paracelular; (b) micrografía (fotografía de microscopio electrónico) que ilustran las UEs (TJ) cerca del polo apical de la membrana basolateral (MV= microvellosidades, AJ= uniones adherentes, DS= hemidesmosomas).

Por otra parte, el extremo apical de la cara basolateral, las Ues regulan el paso de iones y moléculas a través de la vía paracelular, manteniendo la distribución polarizada de los lípidos y de las proteínas en la membrana plasmática. El tejido epitelial de los diferentes segmentos de la nefrona expresa occludina y varias isoformas de claudinas. Las proteínas que se encuentran en la membrana se unen al citoesqueleto de actina a través de proteínas de anclaje, como la ZO-1, ZO-2, ZO-3 y la Cingulina.

En los organismos multicelulares, el ambiente interno está separado del ambiente externo y se encuentra dividido en varios compartimentos, con una composición y concentración diferente de sus fluidos. La separación o compartimentalización se establece por la presencia de los epitelios, endotelios y mesotelios que recubren las superficies corporales y las cavidades. Estos tejidos se encuentran clasificados en *simples*, que son monocapas de células polarizadas, y *estratificados*, constituidos éstos por varias capas de células menos polarizadas.

Las células del epitelio simples polarizadas presentan un dominio apical y un dominio basolateral, encontrándose adheridas unas a otras a través de complejos de uniones entre las células, como GAP, desmosomas, uniones adherentes y uniones estrechas. (Matter, K. et al. 2003). Las uniones Ues, por otra parte, rodean la porción apical de la membrana basolateral.

En la parte superior de este complejo celular, entre la membrana apical y lateral, se localiza la unión estrecha (UE). Las UEs regulan el paso de iones y moléculas a través de la vía paracelular y mantienen la distribución polarizada de los lípidos y de las proteínas, en la membrana plasmática.

Las UEs están organizadas en dos dominios: el transmembranal y el submembranal. Existe además una región extracelular, en la cual los contactos se establecen homotípicamente entre las proteínas transmembranales ocludina, claudinas y JAM; y una zona citoplasmática, donde una plataforma de proteínas se une a moléculas transmembranales con el citoesqueleto de actina.

Los complejos proteicos epiteliales están formados por proteínas transmembranales y por un conjunto de proteínas citoplasmáticas, en las que se incluyen proteínas adaptadoras como ZO-1, ZO-2 y ZO-3, además de proteínas con dominio PDZ (sitios de unión a otras proteínas) y otros componentes de regulación de señalización.

Las proteínas transmembranales que se encuentran en la hendidura diafragmática glomerular son: Nefrina (*HPHS1*), Podocina (*NPHS2*), NEPH1 (*NPH1*), FAT, y P-cadherina (Lee, D. B. et al. 2006). Las proteínas adaptadoras transmembranales tienen también componentes citosólicos, tales como proteinasas, GTPasas y factores de transcripción. Varias de estas proteínas están unidas al citoesqueleto mediante la interacción de los filamentos de actina (Prozialeck, W. C. et al. 1991).

Del grupo de proteínas transmembranales que integran las Ues, se han identificado al menos tres tipos: ocludina, claudinas, y las proteínas de adhesión de las súper familias de las inmunoglobulinas JAM. Tanto la ocludina como las claudinas son proteínas integrales de membrana, capaces de interactuar adhesivamente con moléculas complementarias y células adyacentes y de copolimerizar lateralmente. En fotografías de cortes ultradelgados, obtenidos por microscopía electrónica, se observa a las UEs como sitios de aproximación entre las membranas de células adyacentes.

3.1 Función de las uniones estrechas en endotelios y epitelios

Una de las funciones de las UEs es controlar tanto la difusión de agua, iones y moléculas a través de la ruta paracelular, así como el desplazamiento de proteínas y lípidos entre la membrana apical y basolateral, de la membrana plasmática, característica esta última referida como propiedad de compuerta. Las UEs están localizadas en la porción más alta de la membrana basolateral bloqueando la difusión libre de proteínas y lípidos entre la membrana apical y los dominios basolaterales, actuando además como barrera selectiva, que establece una polaridad celular (Mitic, L. L. et al. 2000), (Tsukita, S. et al. 2001).

La permeabilidad de las UEs se determina a partir de la resistencia eléctrica transepitelial (TER), en donde mientras más baja es la resistencia mayor es la

permeabilidad, como sucede en el túbulo proximal ($5-10 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Esto es debido a que el paso de iones, por vía paracelular, implica un flujo de cargas eléctricas en donde entre mayor flujo iónico mayor es la carga eléctrica que atraviesa el epitelio y, en consecuencia, la resistencia eléctrica del epitelio es menor.

La TER aumenta progresivamente hasta ser máxima en el túbulo colector ($200-400 \Omega \cdot \text{cm}^2$), que es el segmento de la nefrona con mayor permeabilidad paracelular. Las diferencias que exhiben estas características funcionales son dependientes de la edad. Por ejemplo, la TER en el túbulo colector es mayor en el adulto que en el neonato, lo que se traduce en una mayor permeabilidad al sodio en el túbulo colector del recién nacido que en el adulto (Reyes, J. L. et al. 1987). De manera similar, los túbulos renales proximales de la rata recién nacida son permeables al iantano coloidal y a la peroxidasa de rábano, en tanto que los túbulos de la rata adulta no lo son. Estas diferencias funcionales reflejan un manejo de sodio y de otros iones distintos en el individuo adulto que en el neonato, de la misma especie (Larsson, L. 1975).

La TER es un parámetro que depende del grado de sello de las Ues. Como regla general, el número de hebras encontrado a lo largo del eje apical-basal, en el túbulo proximal, es proporcional a la TER.

3.2 Occludina

El nombre de esta proteína integral de la UE deriva de la palabra latina *occludere*, que significa *cerrar*, con peso molecular de 62 a 82 KDa. Dos líneas cruciales de evidencias han demostrado que la occludina es un constituyente de los filamentos de las UE:

- a) La occludina tiene la capacidad de formar filamentos, como los de las UEs, cuando se transfectan las células que carecen de ellas (por ejemplo, los L-fibroblastos); y
- b) La microscopía electrónica de criofractura ha revelado la presencia de occludina en fibras de la UE.

La occludina presenta cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares de tamaño similar, y tres dominios citoplasmáticos: uno, de corto intracelular; otro, de dominio amino terminal pequeño; y una región carboxilo terminal larga. Ambas asas extracelulares están enriquecidas con residuos de tirosinas y, en la primera, más de la mitad de los residuos son tirosina y glicina (Cordenonsi, M. et al. 1997), (Furuse, M. et al. 1993) .

Esta proteína se encuentra en las UEs y también en el citosol, dependiendo su localización celular es el estado de fosforilización. Se ha visto que cuando es integral de las UEs se encuentra fosforilada y, cuando se localiza en el citoplasma,

no lo está (Clarke, H. et al. 2000). En el proceso de fosforilación de la occludina se encuentra también involucrada la proteína cinasa C (PKC), que juega un papel importante en la regulación de la localización y función de la occludina.

La occludina es un componente funcional de las UEs y su sobreexpresión en las células epiteliales y endoteliales aumenta la resistencia eléctrica transepitelial TER. (Balda, M. S. et al. 1996) (McCarthy, K. M. et al. 1996). También se ha visto que los niveles de expresión de la occludina difieren considerablemente en los tejidos endoteliales (dependiendo esto del tipo de endotelio) y que la regulación de la expresión puede ser crucial en la permeabilidad endotelial de diferentes tejidos (Hirase, T. et al. 1997). Y lo mismo sucede en las células epiteliales del intestino, en lo relativo a la absorción de drogas (Ando-Akatsuka, Y. et al. 1996).

En los geles de acrilamida, la occludina migra como un grupo unido de bandas de 62-82 kDa, debido a la fosforilación de los residuos de serina y treonina (Sakakibara, A. et al. 1997), en donde los últimos 150 aminoácidos del carboxilo terminal de la occludina interactúan directamente con la F-actina. Esto constituye una propiedad no compartida con las otras proteínas de la unión estrecha, las que requieren mediación de proteínas de plataforma para la asociación con actina (Wittchen, E. S. et al. 1999). A través de su segmento carboxilo, la occludina es también capaz de unirse directamente a las proteínas MAGUK, ZO-1, ZO-2 Y ZO-3 (Furuse, M. et al. 1994), (Haskins, J. et al. 1998).

Aunque la occludina es un claro componente de los filamentos de la UE y su abundancia está relacionada con el grado de sellado del epitelio, siendo mayor en los segmentos distales que en los proximales de la nefrona. Su participación más precisa en la UE está aun por establecerse, especialmente después de observar que los ratones “knock out”, en relación a la occludina, se muestra la UE bien desarrollada. Hay que hacer notar, por último, que la porción extracelular de la occludina está directamente involucrada en la adhesión célula-célula (Van Itallie, C. M. et al. 1997).

La occludina humana es regulada por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y por el interferón. Esta regulación es positiva e interesante, pues en aquellas enfermedades gastrointestinales en donde un proceso inflamatorio severo aumenta la presencia de estos factores en el intestino, se observan fallas en la barrera intestinal (Sakaguchi, T. et al. 2002).

3.3 Claudina

El nombre claudina deriva de la palabra latina *claudere*, que quiere decir *cerrado*. Son proteínas de 20 a 27 kDa, con cuatro dominios transmembranales y dos asas extracelulares, la primera más grande que la segunda, además de un carboxilo terminal corto intracelular. Los últimos aminoácidos de este carboxilo terminal se encuentran conservados en los dominios de la unión PDZ.

Existe un interés creciente en el estudio de las proteínas de la UE, tanto en

condiciones de salud como en las de enfermedad. La presencia de estas proteínas está relacionada con la selectividad de la permeabilidad iónica de un epitelio. La transfección de la claudina 2, a células MDCK 1 que tienen TER alta, disminuye esta resistencia y aumenta la permeabilidad al sodio. En contraste, la claudina 4 disminuye la permeabilidad al sodio de las células MDCK II y aumenta su TER (Van Itallie, C. et al. 2001).

En condiciones patológicas, como inflamación, isquemia/reperfusión y diversos xenobióticos, las claudinas inducen estrés oxidativo. El estrés oxidativo causó alteración de las UEs en una línea de riñón canino y en su permeabilidad, aumentándola de manera irreversible cuando cesó el estímulo que indujo el estrés (Meyer, T. N. et al. 2001).

En un modelo de insuficiencia renal aguda, inducida por dicromato de potasio, se observó que el número de células vivas que aparecen en el sedimento urinario aumentó de manera muy significativa después de la inducción de la insuficiencia, lo que sugiere que el estrés oxidativo que induce el dicromato alteró los mecanismos de unión celular y de anclaje, a la membrana basal del epitelio tubular, ocasionando con ello desprendimiento de células viables. Este efecto es indeseable, ya que durante el proceso de recuperación el riñón deberá reemplazar a las células muertas y a las células que se desprendieron, aun cuando estuvieran vivas. De manera notable, la administración de vitamina A, en forma de ácido retinoico, disminuyó la pérdida de las células muertas y de las células vivas en este modelo, lo que favoreció la recuperación de los parámetros funcionales, lo cual sugiere aprovechar su utilidad clínica en insuficiencia renal, con participación del estrés oxidativo (Perez, A. et al. 2004).

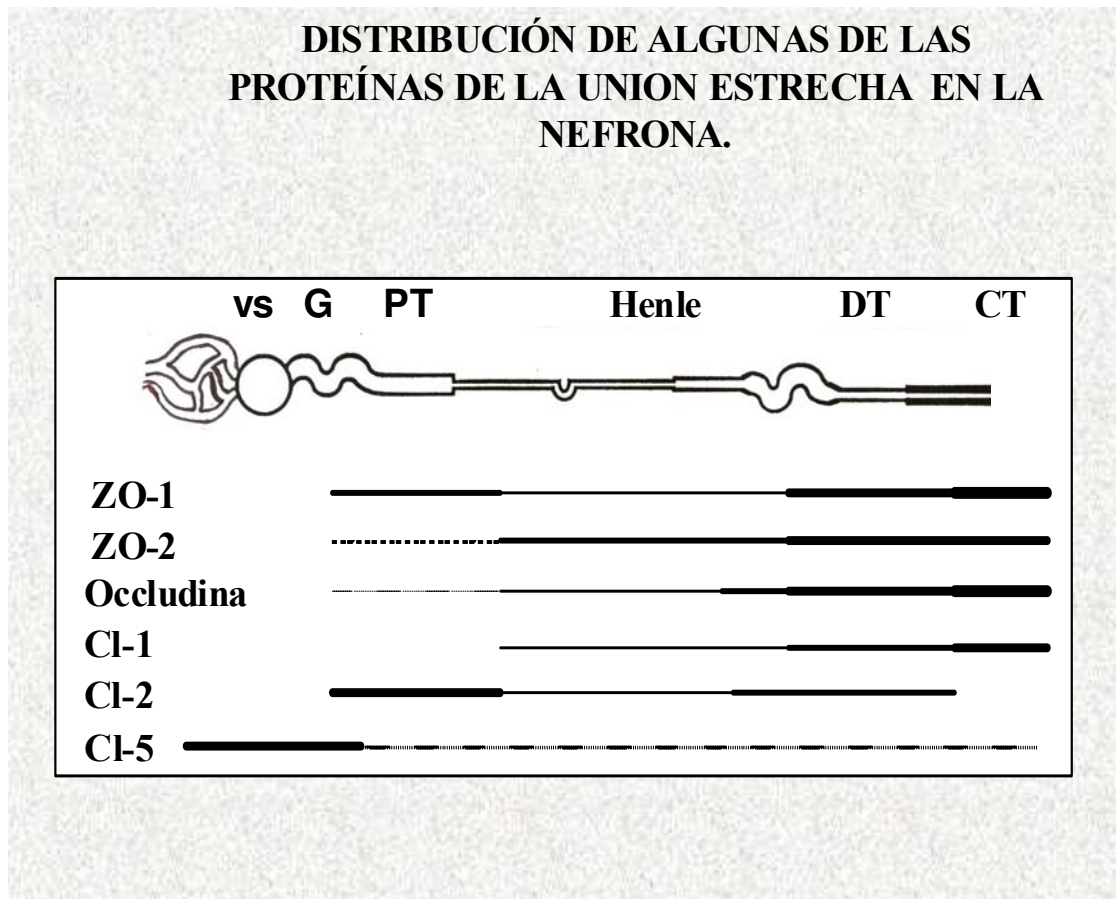
Las claudinas poseen diversas secuencias de aminoácidos, a través de las cuales se asocian a la UE. Es así como las claudinas 1 a 9 y la 17 poseen la secuencia S/TYV; las claudinas 10 y 15, la AYY; la claudina 11, la secuencia AHV; la claudina 12, la HTT; la claudina 13 la LDV; las claudinas 14, 18 y 20, la DYV; la claudina 16, la TRV; y, por último, la claudina 19 la secuencia DRV. A través de estas secuencias, las claudinas se unen a los dominios PDZ, de las proteínas ZO-1, ZO-2, y ZO-3 (Itoh, M. et al. 1999), (Hamazaki, Y. et al. 2002), (Roh, M. H. et al. 2002).

Cuando de manera individual las claudinas 1, 2, 3, 5 y 11 se transfectan en L-fibroblastos de ratón, generaron filamentos, que por criofractura se asemejan a las de las uniones estrechas. Esto sugiere que las claudinas constituyen el esqueleto de las UE (Furuse, M. et al. 1998), (Morita, K. et al. 1999).

Las claudinas muestran una distribución diferencial en diversos tejidos, sugiriendo que ellas participan en la amplia variación de las resistencias eléctricas y en la selectividad iónica paracelular de los epitelios y endotelios. La nefrona es un buen modelo para ejemplificar este punto, dado que está integrada por túbulos con alta y baja TER, de $6 \Omega \cdot \text{cm}^2$, en segmentos proximales a $870\text{-}2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, en el túbulo colector. De acuerdo con estas diferencias mostradas por la TER, las claudinas

siguen una distribución peculiar en estos segmentos (Piepenhagen, P. A. et al. 1995).

La claudina 1 exhibe una expresión generalizada en las uniones del epitelio (Brandner, J. M. et al. 2002), (Langbein, L. et al. 2002) y también, predominantemente, en la nefrona distal. El análisis de inmunotransferencia ha revelado que los túbulos proximales mostraban sólo a las claudinas 1, 2, 3, 4, 7 y 8 (Reyes, J. L. et al. 2002), (Enck, A. H. et al. 2001). Sin embargo, estudios de criosecciones del riñón y de los túbulos microdisecados han revelado la distribución diferencial de estas proteínas. Así, las claudinas 5 y 15 están presentes en el endotelio, aunque recientemente la claudina 5 ha sido encontrada en epitelio de células derivadas de colon humano (Amasheh, S. et al. 2005), mientras que las claudinas 2, 10 y 11 lo han sido en el segmento proximal, a la vez que las claudinas 1, 3 y 8 en el túbulo distal y las claudinas 1, 3, 4 y 8 en el túbulo colector (Kiuchi-Saishin, Y. et al. 2002). A continuación, en la siguiente figura se muestran algunas claudinas encontradas en la nefrona.



(Gonzalez-Mariscal, L. et al. 2000) ((Reyes, J. L. et al. 2002)

Figura 6.- Distribución de algunas de las proteínas de la UE en la nefrona, entre las que se observan la occludina y las claudinas 1, 2, 5 y ZO-1 y ZO-2.

La expresión de las diferentes claudinas cambia durante el desarrollo. Por ejemplo, la claudina 6 se presenta en el epitelio embrionario (Turksen, K. et al. 2001) y su sobreexpresión, en ratones transgénicos, genera una barrera defectuosa en la epidermis (Turksen, K. et al. 2002). Tal vez por ello se ha propuesto que la inestabilidad en el control de la temperatura y la deshidratación, frecuentemente observada en niños prematuros, podría relacionarse con la expresión de esta claudina en la epidermis.

La claudina 16, por otra parte, está mutada en pacientes con el síndrome de hipomagnesemia e hipercalciuria. Estos pacientes manifiestan un defecto selectivo de la reabsorción paracelular de magnesio y calcio, en la porción gruesa del asa de Henle, manteniendo en cambio una reabsorción intacta del cloruro de sodio. Se piensa, por tanto, que la claudina 16 funciona como un canal paracelular selectivo, para calcio y magnesio (Simon, D. B. et al. 1999).

Los cambios funcionales inducidos por la expresión de la claudina 2 son opuestos a los cambios asociados a la sobreexpresión de la claudina 4. Así, después de la sobreexpresión de la claudina 4, se encontró una disminución de la permeabilidad paracelular al sodio, en células MDCK (Van Itallie, C. et al. 2001). La claudina 2, en cambio, causa formación de canales selectivos a cationes, suficiente para convertir una unión no permeable en una unión permeable, en células epiteliales (Amasheh, S. et al. 2002). Así mismo se ha demostrado la expresión de la claudina 2 en las células epiteliales parietales que se encuentran en la membrana basal de la capsula de Bowman's (Ohse, T. et al. 2008).

La hipótesis de la formación de canales paracelulares, integrados por claudinas, se confirmó al observar que al revertir la carga de un solo aminoácido, en el primer dominio extracelular de la claudina 4, se genera un cambio dramático en la permeabilidad epitelial (Sonoda, N. et al. 1999), (Colegio, O. R. et al. 2002), lo que demuestra que el primer dominio extracelular de las claudinas es suficiente para determinar tanto la selectividad iónica paracelular, como la TER. Se observó también que las diferencias, en la morfología de las fibras, no está determinada por los dominios extracelulares de las claudinas (Colegio, O. R. et al. 2002).

Con frecuencia, más de dos especies de claudinas se coexpresan en una sola célula, lo que da origen a la pregunta de cómo estas especies heterogéneas se integran en filamentos de la UE. Se cree que las diferentes claudinas co-polimerizan como heteropolímeros para formar filamentos individuales de las Ues, y que, entre filamentos adyacentes de la UE, las moléculas de estas claudinas se adhieren unas a otras, tanto de manera homotípica como heterotípica (Furuse, M. et al. 1999).

IV DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Uno de los factores más importantes de la investigación médica ha sido el uso de animales en la experimentación científica. Para el estudio de diversas enfermedades, varias especies han participado como modelos experimentales, especialmente ratas, lográndose de esta forma un mejor conocimiento de los respectivos procesos patológicos, y, con ello, las propuestas de soluciones terapéuticas novedosas. En esta dirección, el uso de modelos que aporte bases para el estudio de los mecanismos del daño glomerular y túbulo intersticial es de particular importancia, pues está apuntando a develar las causas de la glomerulopatía colapsante.

La glomerulopatía colapsante es una entidad grave en el humano, ya que frecuentemente evoluciona a enfermedad renal crónica, que requiere la utilización de procedimientos de diálisis. Y aun cuando todavía se desconocen los mecanismos que ocasionan esta patología, su reproducción experimental en ratas a las que se les administró suero de pacientes humanos puede ayudarnos a lograr una orientación terapéutica favorable. Consecuencia de lo anterior, se pueden formular las siguientes preguntas:

¿Cómo se encuentra la unión estrecha glomerular, en la glomerulopatía colapsante?

¿Qué efecto tienen las alteraciones de la unión estrecha (UE) sobre la función glomerular y tubular, en la glomerulopatía colapsante?

V JUSTIFICACIÓN

1.- La glomerulopatía colapsante es una nefropatía idiopática causante de insuficiencia renal crónica, con necesidad de tratamiento sustitutivo con diálisis. De allí que las conclusiones que aporte este modelo animal van a permitir conocer mejor los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

2.- No se sabe aún cuál es la posible alteración de la expresión de las claudinas en la glomerulopatía colapsante. De aquí la importancia de estudiar su participación en este modelo murino de glomerulopatía, ya que, por contar con la infraestructura adecuada en nuestro medio, el modelo experimental es factible de realizarse.

VI HIPÓTESIS

La glomerulopatía colapsante experimental provoca alteraciones funcionales renales asociadas a alteraciones del patrón de ensamblaje de las proteínas de las uniones estrechas, del tipo de las claudinas 2 y 5.

VII OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Estudiar la expresión de las proteínas claudinas 2 y 5 en un modelo de glomerulopatía colapsante, con ratas de la cepa Sprague Dawley.

7.2 Objetivos particulares

1. Estandarizar el modelo animal de glomérulonefritis colapsante, para el estudio de las claudinas.
2. Comparar, por inmunofluorescencia, la expresión de las claudinas 2 y 5, en un modelo de glomerulopatía colapsante experimental.
3. Comparar, en los grupos control y con glomerulopatía colapsante, las funciones renales.

VIII MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Materiales

8.1.1 Equipo instrumental

Balanza analítica Mettler, modelo Ch-8606
Balanza analítica Sartorius modelo RC 2105
Balanza granataria, marca OHAUS
Baño de incubación, marca PRESISION
Centrífuga refrigerada marca Beckman modelo GS-6R
Centrífuga refrigerada marca Eppendorf modelo 5417 R
Criótomo Leica, modelo CM modelo 1100
Cuchillas para Criótomo marca Leica, modelo CM 1100
Cubreobjetos 24 x 50 mm, marca Corning
Discos muestra para osmómetro Wescor SS-033
Espátulas
Espectrofotómetro de absorción atómica, M-3100
marca Aanalyt 200, Perkin-Elmer
Jaulas metabólicas marca Nalgene, Cat. No. 650-0210
Jaula de acrílico para rata, Nalgene Cat. 10712-154
Jeringas de 5 y 30 ml, marca Plastipak
Lámpara de cátodo hueco de Na, marca Varian, No. 56-100053-00
Lámpara de cátodo hueco de K, marca Perkin Elmer, N°P/N N305- 0139
Matraces aforados, de 50,100, 200, 500, 1000, 2000 mL
Microscopio confocal marca Leica, modelo DMIRE-2 Alemania
Microscopio de epifluorescencia, marca Nikon, modelo DM 510
Osmómetro por presión de vapor marca Wescor, modelo 5500
Parrilla con agitador magnético marca Corning, modelo PC-420
Pipetas automáticas marca Eppendorf, de 2-20, 10-100 y 20-200 μ l
Pipetas Gilson, de 10,100, 200 y 1000 μ l
Potenciómetro marca Beckman, modelo 45
Probeta de 100 ml
Puntas estándar 50 - 1000 μ l Eppendorf Cat. No.0030 000.919
Tanque de nitrógeno líquido
Tubos eppendorf, de 1.8 ml
Tubos de poliestireno, de 14 ml
Ultracongelador, Forma Scientific
Vasos de precipitados, de 50, 100 y 250 ml
Vortex Thermoline, modelo Maxi-Mix 1

8.1.2 Reactivos

Agua desionizada y destilada	
Aceite mineral	
Ácido pícrico	Baker Cat. No 0-276
Alcohol etílico de 96° G.L. REEMPE	
Rabbit anticlaudina 2	Zymed Cat. No. 51-6100
Mouse anticlaudina 5	Zymed Cat. No. 35-2500
Vectashield	Vector
BSA (Albúmina sérica bovina)	Sigma cat. No. B-4287
Cloruro de calcio dihidratado	Baker cat. No. 1332
Cloruro de lantano	Sigma Cat. No. L-6640
Cloruro de potasio	J.T.Baker Cat. No. 3040-01
Cloruro de sodio	J.T.Baker Cat. No. 3624-01
Creatinina	Merck Cat. No. 5208
Estándar de osmolaridad (290 mmol/kg)	Optimole Wescor OA029
Estándar de sodio	NIST 3141a
Estándar de potasio	NIST 3141 a
Gas acetileno	INFRA
Gelatina de cerdo tipo II	Sigma Cat. No. G-2625
NaOH (Hidróxido de sodio)	Merck Cat. 1.06466.0050
Nitrógeno líquido	INFRA
Isofucianato de fluoresceína	Zymed Cat. No. 62.9511
PBS Phosphate Buffered Saline	GIBCO Cat. No. 21300-058
TCA (Ácido Tricloroacético)	J.T. Baker Cat. No. 0414-01
2-metil-butano 99.5%	Sigma-Aldrich Cat. No. 27,034-2

8.1.3 Soluciones

a) Soluciones para análisis de proteinuria:

El reactivo incluye sulfato de cobre, Hidróxido de sodio y tartrato de sodio y potasio, el cual se utiliza para estabilizar el ión cobre en la solución alcalina

b) Soluciones para análisis de depuración de creatinina (Dcr):

Se usaron los siguientes reactivos, en las proporciones que se indican a continuación:

- 1) NaOH, 0.75 (4 g disueltos en 100 ml de H₂O);
- 2) Ácido Pítrico 0.04 M (2.291 g, disueltos en 250 ml de H₂O);
- 3) Ácido Tricloroacético al 35% (35 g, disueltos en 100 ml de H₂O);
- 4) Solución estándar de creatinina (100 µl/ml) (1 mg, en 100 ml de H₂O).

c) Soluciones para inmunohistoquímica:

Se usaron los siguientes reactivos, en las proporciones que se indican a continuación:

- 1) Albúmina libre de IgG, al 0.5% (50 µg de albúmina sérica bovina, los que se aforan a 10 ml con H₂O);
- 2) PBS (9.55 g de PBS, los que se aforan a 1 000 ml con H₂O);
- 3) PBS con calcio (9.55 g de Buffer de fosfatos (PBS), a los que se les agregan 500 ml y se agitan, adicionándoseles lentamente, por la pared del tubo, 2 ml de CaCl₂, agitándose continuamente para evitar precipitaciones (aforar a 1 litro con H₂O);
- 4) PBS Triton, al 2% (a 498 ml de PBS con calcio se adicionan 2 ml de triton, agitando suavemente).

8.2 Métodos

En el presente estudio, inyectamos a ratas hembras Sprague Dawley suero de pacientes clínica y patológicamente portadores de glomerulopatía colapsante. La inyección les produjo proteinuria y daño histopatológico idéntico a la glomerulopatía humana. Como grupo control, se utilizó a un grupo al cual se le inoculó solución salina fisiológica.

Los pacientes que postularon para el estudio lo hicieron bajo el criterio de GC, siendo seleccionados 10 de ellos, quienes firmaron la carta de consentimiento informado. El protocolo fue registrado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación, del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez". Los pacientes fueron todos mexicanos seronegativos a VIH, sin contacto con drogas. A todos ellos se les realizó una historia clínica de antecedentes familiares de enfermedades renales.

Del grupo total de 10 pacientes, 6 fueron hombres y 4 mujeres, variando el rango de edad entre los 17 a 70 años. A 6 de ellos se les encontró la creatinina sérica elevada, registrando variaciones entre 0.8 a 7.0 mg/dl. Todos los pacientes presentaban proteinuria masiva, con excreción de proteína urinaria > de 10 g/24 horas, demostrándose la pérdida de podocitos por microscopía electrónica.

A todos los pacientes se les realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para parvovirus B19, resultando negativos, además de inmunofluorescencia directa para complejos inmunes, acusando asimismo resultados negativos. La biopsia de los pacientes, por otra parte, presentaba características de colapso glomerular, pérdida de células epiteliales y daño tubular.

8.2.1 Diseño experimental

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 200-210 g de peso corporal, las cuales fueron sorteadas y distribuidas en cajas metabólicas (Nalgene) con libre acceso a agua y alimento, manteniéndoselas a una temperatura entre 18°C a 23°C y una humedad relativa de 40 a 70%, dentro de un ciclo de luz / oscuridad de 12 h, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana "Especificaciones técnicas para la Producción Cuidado y Uso los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999 del 28 de junio de 2001).

Las ratas fueron divididas en dos grupos;

- 1) *Un grupo control*, al cual se le inyectó solución fisiológica
- 2) *Un grupo experimental*, al cual se le inyectó suero de pacientes con GC.

8.2.2 Determinación de parámetros funcionales renales.

A las ratas se les midió la proteinuria diariamente, tomándoseles muestra de sangre y orina para determinar su función renal. Además, asimismo diariamente se le aplicó a cada animal y por 6 días consecutivos un 1 ml de suero de pacientes al grupo experimental y 1 ml de solución fisiológica al grupo control. Al día 6 se sacrificaron todos los animales de cada grupo, tomándoseles muestras de sangre y orina, para posteriores estudios bioquímicos.

La proteinuria se determinó por el método de Biuret, mientras que el sodio y el potasio se determinaron por absorción atómica. La osmolaridad sérica y urinaria se estudiaron mediante osmometría, en tanto la creatinina sérica y la creatinina en orina de 24 hrs. se determinaron por el método de Jaffe, mientras que la glucosa se determinó por autoanalizador. Los estudios histopatológicos, a su vez, se realizaron mediante microscopía óptica e inmunohistoquímica.

a) Proteinuria

La proteinuria es un marcador de filtración de proteínas por la orina, que indica daño glomerular. Para la determinación de proteinuria se utilizó la técnica de Biuret (GORNALL, A. G. et al. 1949).

Principio.- En la orina, se forman complejos iones cúpricos con los enlaces peptídicos de las proteínas que producen un color violeta-morado bajo condiciones alcalinas. La intensidad del color (absorbancia) es proporcional al contenido de proteínas de la muestra y el color producido es leído a 540 nm.

Procedimiento.- El método de Biuret consiste en tratar a las muestras de orina con sulfato de cobre, NaOH y tartrato de sodio y potasio contra una curva estándar con albúmina sérica bovina, como vemos en la TABLA 1. La cantidad del complejo formado está en proporción a la cantidad de proteínas.

TABLA 1
Curva patrón de albúmina sérica bovina

BSA MG/ML	H ₂ O	Reactivo de Biuret
5 µl	100 µl	500 µl
10 µl	90 µl	500 µl
20 µl	80 µl	500 µl
25 µl	75 µl	500 µl
30 µl	70 µl	500 µl
40 µl	60 µl	500 µl
50 µl	50 µl	500 µl
Muestra 10 µl	90 µl	500 µl

Los pasos recomendados para la determinación de la proteinuria, en las muestras, son los siguientes:

- 1.- 5 ml del reactivo de Biuret se mezcla con 1 ml de solución proteica
- 2.- Agitar vigorosamente.
- 3.- Dejar reposar en la oscuridad, durante 30 min. Se lee la absorbancia contra un blanco con solo reactivo de biuret.
- 4.- Leer a 540 nm.

La lectura se realiza en celdas con el espectrofotómetro, mediante la densidad óptica. Para saber la cantidad de proteínas en ese volumen, el resultado se correlaciona con la curva estándar y se multiplica por el volumen total de orina en 24 horas.

c) Creatinina

La VFG es igual a la concentración de una sustancia en orina, multiplicada por el flujo urinario y la unidad de tiempo, dividida luego por la concentración plasmática de la misma sustancia. El valor resultante se denomina depuración.

La creatinina es una sustancia que cumple parcialmente estos requisitos, ya que una pequeña parte es secretada a nivel tubular (en los machos); por lo tanto, la evaluación de la depuración de creatinina es un buen parámetro para evaluar la VFG (Perrone, R. D. et al. 1992).

Principio. En solución alcalina (NaOH), la creatinina reacciona con el ácido pícrico formando el ácido picrámico, el cual es un complejo colorido que puede ser medido a 520 nm. La cantidad del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de la creatinina presente en la orina y en el suero sanguíneo

Procedimiento. Se realizó la precipitación de creatinina en plasma y en orina

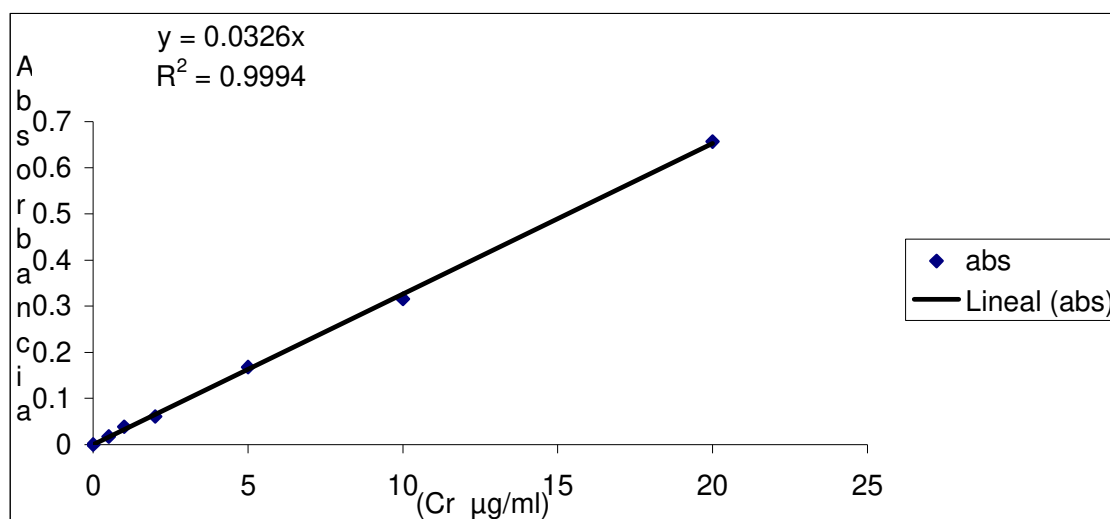
usando ácido tricloroacético, tal como se observa a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2
Procedimiento para la determinación de creatinina

Plasma (μ l)	H ₂ O (μ l)	Ácido tricloroacético (μ l)	Vol. Final (μ l)
100	2300	200	2600
Se dejó reposar durante 5 minutos y luego se centrifugó a 3 000 rpm, durante 10 min., a una temperatura de 4° C.			
Orina	H ₂ O (μ l)	Vol. Final. (μ l)	
20	1980	2000	
En estas condiciones, las muestras de plasma fueron diluidas 26 veces, mientras que las muestras de orina con agua lo fueron 100 veces.			
Muestras diluidas (orina o plasma) (ml)	Ácido pícrico (ml)	NaOH (ml)	Volumen final (ml)
1	0.4	0.4	1.8
Los componentes de la mezcla se dejaron reaccionar durante 20 min. Durante este tiempo, los tubos se protegieron de la luz.			
Se registró la absorbancia obtenida a 520 nm.			

Las muestras se determinaron conjuntamente con la gráfica de calibración para creatinina, la cual fue preparada bajo concentraciones de 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 μ g/ml, a partir de una solución de creatinina de 100 μ g/ml.

Las muestras se evaluaron por duplicado, obteniéndose coeficientes de variación menor al 6%. Durante el procedimiento se realizaron 4 gráficas de calibración, observándose entre ellas una variación menor al 5% (Ver grafica 1)



Gráfica 1.- Gráfica de calibración para la determinación de creatinina sérica y urinaria $R^2 = 0.9994$, I.C 95 %

A partir de las concentraciones de creatinina, en orina y suero, se efectuaron los cálculos de Dcr utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Dcr} = \frac{(\text{Creatinina orina} \times \text{Flujo urinario/min})}{(\text{Creatinina suero})}$$

La Dcr se corrigió por 100 g de peso corporal, debido a que este parámetro depende de la masa corporal.

La depuración de creatinina se expresa en $\mu\text{l/min}$.

c) Sodio y Potasio

Principio. Cuando un átomo se encuentra en estado basal, es capaz de absorber energía a una longitud de onda específica, entrando luego a un estado excitado. Y cuando el número de átomos excitados se incrementa con el paso de la luz, la cantidad de energía absorbida también se incrementa, proporcionalmente, por lo que la determinación va en relación a la cantidad de la energía absorbida.

Procedimiento.- Las determinaciones de sodio (Na) y potasio (K), tanto en orina como en suero, fueron realizados por espectrofotometría de absorción atómica usando una flama de aire-acetileno. La muestra en solución fue nebulizada automáticamente dentro de una cámara, en donde una mezcla de aire-acetileno produjo la disociación y atomización de la muestra.

Para controlar las posibles interferencias en la determinación de potasio, ocasionadas por el método de flama, fue necesario preparar una solución supresora de ionización, la que contenía 10 mg/ml de cloruro de lantano.

Los parámetros de medición, para K y Na, fueron los siguientes:

Elemento	Longitud de onda	Slit	Energía de lámpara
K	766 nm	0.7 alto	12 mA
Na	589 nm	0.7 alto	12 mA

Gráfica de calibración, para K y Na. A partir de las soluciones estándar de K y Na, de 1000 p.p.m, se prepararon soluciones estándar de 20 p.p.m, respectivamente, elaborándose las gráficas de calibración.

La determinación de la excreción fraccional de sodio y potasio se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$\text{Fe Na (\%)} = \frac{[\text{Na orina}] [\text{Creatinina suero}] \times 100}{[\text{Na suero}] [\text{Creatinina orina}]}$$

Para la determinación de la excreción fraccional de sodio, se sustituye el potasio por el sodio.

d) Osmolaridad

Principio.- Este método se basa en la determinación del número total de partículas osmóticamente activas de soluto, disueltas en un Kg. de solvente. Mediante el empleo de un osmómetro se realizó la medición, por presión de vapor, de la muestra en orina y suero.

Procedimiento.- Para efectuar el análisis de las muestras, inicialmente se calibró el osmómetro utilizando 8 µl de estándar de referencia, con una concentración de 290 mOsm/kg de H₂O.

Las muestras de orina y suero se analizaron por duplicado, colocando 8 µl de cada una de ellas sobre un disco de papel filtro en la platina del equipo, accionando inmediatamente después la palanca de inicio.

La referencia de esta prueba fue 290 mOsm/kg y las muestras que estuvieron por arriba de este valor se diluyeron al 50%, para su determinación. El resultado se multiplicó por 2, obteniéndose así el total de la osmolaridad.

Para evaluar con exactitud la determinación se empleó el estándar conocido de 290 mOsm/kg, obteniéndose así una exactitud de 98%. Las muestras fueron leídas por cuadruplicado, con un coeficiente de variación menor al 7 %.

A partir de las concentraciones osmolares en orina y suero, se efectuaron los cálculos de depuración osmolar empleando la siguiente formula:

$$\text{Depuración osmolar} = (\text{osmolaridad urinaria} / \text{osmolaridad en suero}) \times \text{flujo urinario}$$

e) Flujo urinario

Se obtiene midiendo el volumen de orina colectada en 24 horas, dividido entre 1440 minutos.

$$\text{Flujo urinario} = \frac{\text{Volumen de orina ml.}}{\text{Tiempo de colección en minutos}}$$

f) Inmunohistoquímica de cortes congelados de riñón de rata

Principio.- La inmunohistoquímica se basa en la localización de proteínas celulares por microscopía de inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos que reconocen específicamente a la proteína designada, llamado anticuerpo primario, contra el cual se dirige un anticuerpo con un compuesto fluorescente, llamado anticuerpo secundario. La fluorescencia indica la marca específica del anticuerpo primario.

Procedimiento.- Previamente profundido y colocado en nitrógeno líquido, los riñones de las ratas de los grupos fueron cortados en porciones de 8 μm con un Criótomo Leica, CM 1100, seguido del procedimiento descrito por González-Mariscal y cols. (2000) (verTabla 3).

TABLA 3

*Técnica de inmunohistoquímica para claudinas 2 y 5,
en cortes congelados de riñón de rata*

Los cortes se fijaron con acetona a -20°C , durante 3 minutos, secándose luego a temperatura ambiente (TA). Posteriormente fueron rehidratados y permeabilizados con PBS tritón al 0.2%, durante 10 minutos y a temperatura ambiente (TA).
Los cortes se lavaron 3 veces con PBS, enjuagando 5 minutos en cada ocasión.
Cada corte fue delineado con lápiz de cera, para delimitar el área de aplicación de los anticuerpos.
Se realizó un bloqueo de las uniones no específicas, aplicando a cada corte 30 μl de albúmina libre de IgGs, al 0.5% a TA, durante 30 minutos.
Después del bloqueo, se retiró la albúmina y se colocó el primer anticuerpo contra la claudina 2 y 5, según el caso. El anticuerpo policlonal empleado fue: conejo α claudina 2 y el anticuerpo monoclonal ratón α 5, diluidos 1:100, en albúmina libre de IgG. La incubación se realizó a 4°C , durante 12-24 h.
Los cortes fueron lavados 4 veces con PBS a temperatura ambiente, por un tiempo de 10 minutos cada vez. Una vez terminados los lavados, se adicionó el segundo anticuerpo acoplado a FITC, burro anti-conejo para claudina 2, y pollo anti-ratón para claudina 5, según el caso, ambos cabra α conejo, en una dilución 1:100 en albúmina libre de IgG al 0.5%, el cual fue incubado durante 2 h a TA
Se realizaron 4 lavados, de 5 a 10 min cada uno, con PBS+calcio a TA, decantándose el líquido excedente. Luego se agregó Vectashiel (conservador de fluorescencia) de 8-10 μl , por corte, el que se colocó en un cubreobjetos cuidando de no dejar burbujas entre el tejido y la laminilla. Finalmente se selló dicha laminilla con barniz de uñas. Los cortes fueron guardados a 8°C , hasta el día de su observación en un microscopio confocal.

Para descartar la posibilidad de un marcaje falso positivo (unión inespecífica del anticuerpo), en cada serie de inmunohistoquímica se emplearon dos cortes del grupo control, a los cuales sólo se les trató con el anticuerpo secundario y albúmina libre de IgG, al 0.5%.

Durante el proceso de inspección al microscopio, los cortes fueron revisados en su totalidad. Las laminillas preparadas con marca sencilla se observaron, a través del microscopio láser confocal, empleando lentes objetivos de 25X para ver el panorama de nuestros cortes y de 60X y 100X, y, por inmersión en aceite, para observaciones más finas. A lo largo de las estructuras visualizadas, se obtuvieron secciones ópticas empleando una combinación de filtros de excitación y de emisión para FITC de 490-520 nm, respectivamente. Las imágenes colectadas se procesaron con un programa software del microscopio confocal.

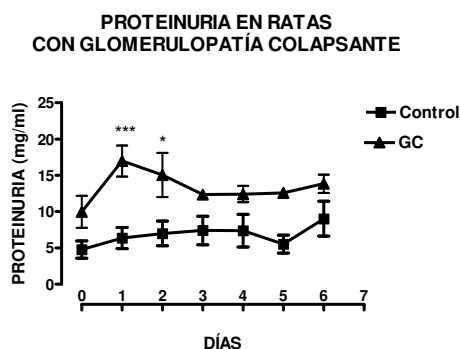
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para las pruebas funcionales se efectuó por medio de las técnicas de Bonferroni posttests y t no pareada para los análisis que lo requirieron mediante el programa GraphPad Prism versión 4.00 para windows.

IX RESULTADOS

9.1 El suero de los pacientes con Glomerulopatía Colapsante produjo proteinuria en las ratas Sprague Dawley.

Al aplicar 1 ml de suero de pacientes con GC durante 6 días a las ratas Sprague Dawley, se observó un aumento significativo de la proteinuria en mg/ml en los días 1 y 2, tal como se aprecia en la Figura 7.

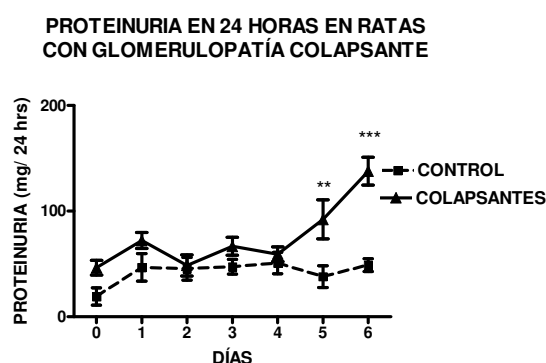


* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs grupo control

Figura 7.- Proteinuria, en ratas con CG, inducida por la inoculación de suero de pacientes con glomerulopatía colapsante. $n=5$, Media \pm EE.

9.2 Proteinuria en orina de 24 horas, en las ratas Sprague Dawley con GC

Al determinar la proteinuria en orina de 24 horas en ratas Sprague Dawley, inducida con inyección de suero de pacientes con GC, se encontraron diferencias significativas los días 5 y 6, en relación al grupo control.

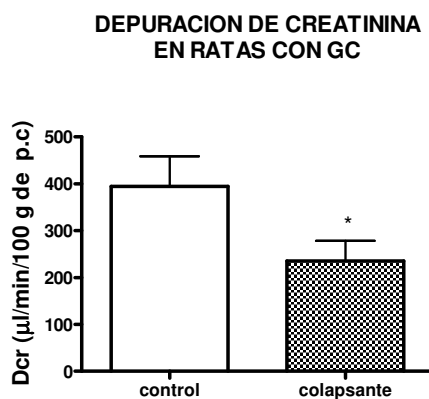


** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs grupo control

Figura 8.- Proteinuria, en orina de 24 h, en ratas inoculadas con suero de pacientes con GC. $n=5$, Media \pm EE.

9.3 Efecto de la inoculación del suero de pacientes con GC, en ratas Sprague Dawley, sobre la depuración de creatinina

En el grupo experimental se observó una disminución en la depuración de creatinina, en comparación con los controles, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa. ($P < 0.05$). Como se observa en la Figura 9, la depuración de creatinina se encuentra expresada en $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{ g de p.c.}$

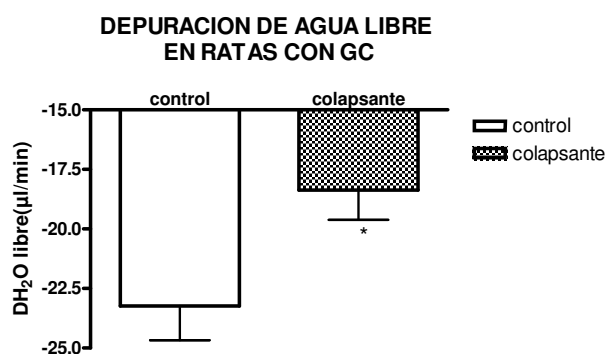


* $P < 0.05$ vs grupo control

Figura 9.- Depuración de creatinina, en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.4 - Efecto de la inoculación de suero de pacientes con GC, en ratas Sprague Dawley, sobre la depuración de agua libre

En la depuración de agua libre se observa una diferencia entre los dos grupos experimentales, siendo ésta significativa ($P < 0.05$). Su medición se encuentra expresada en $\mu\text{l}/\text{min}$.

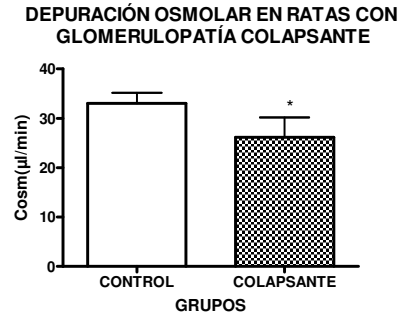


* $P < 0.05$ vs grupo control

Figura 10.- Depuración de agua libre, en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.5 Efecto de la inoculación de suero de pacientes con GC, sobre la depuración osmolar, en ratas Sprague Dawley

La depuración osmolar se encuentra expresada en $\mu\text{l}/\text{min}$ y, aunque existe diferencia entre ambos grupos, ésta no fue significativa ($P > 0.05$).

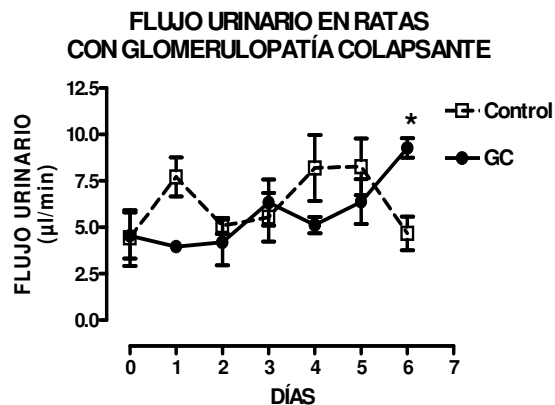


* $P > 0.05$ vs grupo control

Figura 11.- Depuración osmolar, en ratas con glomerulopatía colapsante. $n=5$. Media \pm EE.

9.6 Efecto del suero de pacientes con GC, sobre el flujo urinario, en ratas Sprague Dawley

A excepción del día 6, cuando se encontró una diferencia estadísticamente significativa, las ratas con GC mostraron un flujo urinario constante en relación a los controles. (Ver Fig. 12). El flujo urinario se expresó en microlitros por minutos.



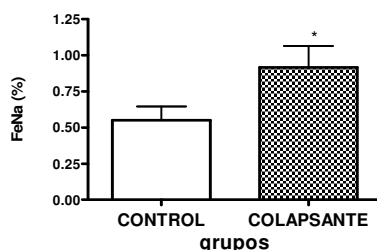
* $P < 0.05$ vs grupo control

Figura 12.- Flujo urinario en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.7- Efecto de la inoculación del suero de pacientes con GC, en ratas Sprague Dawley, sobre la excreción fraccionaria de sodio

La excreción fraccionaria de sodio se encuentra representada en porcentaje, en donde se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($P < 0.05$), lo cual indica mayor pérdida urinaria de sodio en los animales con GC que en los del grupo control, tal como se observa en la Figura 13.

EXCRECIÓN FRACCIONARIA DE SODIO
EN RATAS CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE



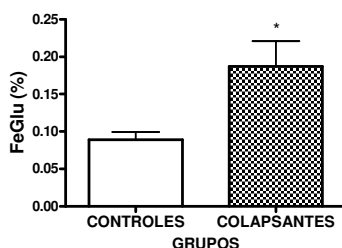
* $P < 0.05$ vs grupo control.

Figura 13.- Excreción fraccionaria de sodio, en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.8 Efecto de la inoculación del suero de pacientes con GC en ratas Sprague Dawley, sobre la excreción fraccionaria de glucosa.

La excreción fraccionaria de glucosa se expresa en porcentaje. Se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($*P < 0.05$).

EXCRECIÓN FRACCIONARIA DE GLUCOSA
EN RATAS CON GC



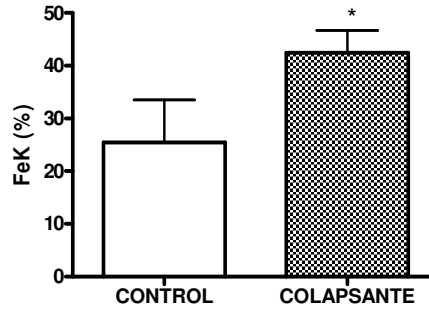
* $p < 0.05$ vs grupo control

Figura 14.- Excreción fraccionaria de glucosa, en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.9 Efecto de la inoculación del suero de pacientes con GC sobre la excreción fraccionaria de potasio, en ratas Sprague Dawley.

El grupo experimental con GC mostró una mayor excreción fraccionaria de potasio que el grupo control, encontrándose una diferencia significativa ($P < 0.05$), lo cual significa mayor pérdida urinaria de potasio, por daño tubular, que presentaron los animales con GC. La excreción fraccionaria de potasio se encuentra expresada en porcentaje.

EXCRECIÓN FRACCIONARIA DE POTASIO EN RATAS CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE



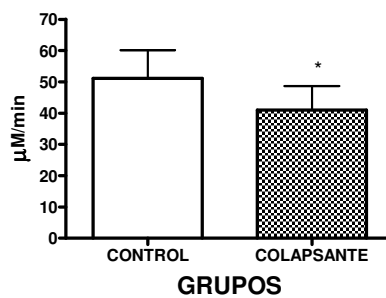
* $P < 0.05$ vs grupo control

Figura 15.- Excreción fraccionaria de potasio, en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.10 - Efecto de la inoculación de suero de pacientes con GC sobre la carga filtrada de sodio, en ratas Sprague Dawley

En los dos grupos experimentales, la carga filtrada de sodio se encuentra expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$, no acusando entre ellas diferencias significativas ($P > 0.05$)

CARGA FILTRADA DE SODIO EN RATAS CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE



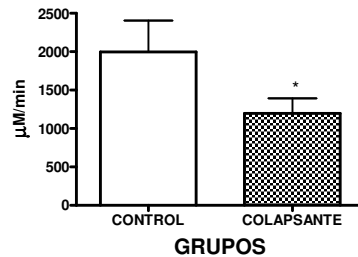
* $P > 0.05$ vs grupo control

Figura 16.- Carga filtrada de sodio, en ratas con GC. $n=5$. Media \pm EE.

9.11 Efecto de la inoculación de suero de pacientes con GC, en ratas Sprague Dawley, sobre la carga filtrada de potasio

La carga filtrada de potasio se encuentra expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$, en los dos grupos experimentales, en donde si existió diferencias significativas ($P < 0.05$)

CARGA FILTRADA DE POTASIO EN RATAS CON GLOMERULOPATÍA COLAPSANTE



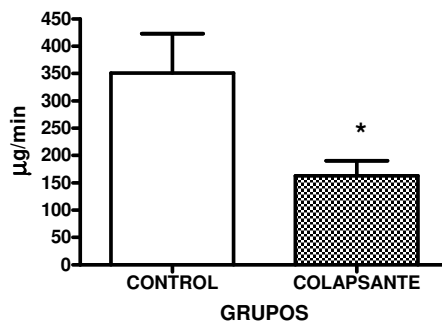
* $P > 0.05$ vs grupo control

Figura 17.- Carga filtrada de potasio, en ratas con glomerulopatía colapsante. n=5. Media \pm EE.

9.12 - Efecto de la aplicación de suero de pacientes con GC, en ratas Sprague Dawley, sobre la carga filtrada de glucosa

La carga filtrada de glucosa se encuentra expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en los dos grupos experimentales, en donde sí se registró una diferencia significativa ($P < 0.05$)

CARGA FILTRADA DE GLUCOSA EN RATAS CON GLOMERULOPATIA COLAPSANTE



* $P < 0.05$ vs grupo control

Figura 18.-Carga filtrada de glucosa, en ratas con GC. n=5. Media \pm EE.

9.13 Efecto de la GC sobre el patrón de localización de las proteínas de la unión estrecha (claudina 2 y 5), en cortes de riñón congelado de rata.

Las figuras siguientes muestran las expresiones de las claudinas 2 y 5 en cortes de riñón congelado de rata. En la figura 19 se aprecia la fluorescencia de la marca específica de la claudina 2, en los túbulos proximales del riñón de la rata control. La marca se encontró delimitando los bordes celulares, como era de esperarse en una proteína integral de la membrana localizada cerca del polo apical, y en el contraste mostrado en la Figura 20, en cambio, se aprecia la marca específica sobre la imagen de campo claro de dichos túbulos, éstos se aprecian íntegros y bien definidos. En cuanto al grupo de ratas colapsantes, en la Figura 21, a) y b), se observa una sobreexpresión de claudina 2 en el lado epitelial de la cápsula de Bowman y de los túbulos proximales, lo cual hace suponer lesión epitelial inmunológica, coincidiendo con lo que han descrito varios autores (D'Agati, V. D. 2008).

Tal como podemos apreciar en la Figura 22, la expresión de la proteína claudina 5, que marca los endotelios a nivel glomerular, no muestra ninguna alteración en el grupo control; sin embargo, en la glomerulopatía colapsante en la figura 23 esta proteína nos deja ver una modificación de los capilares glomerulares, lo cual sugiere desorganización de la unión estrecha, en el endotelio glomerular.



Figura19

Figura 20

Figura 21 a)

Figura 19. Claudina 2 en cortes de riñones congelados de rata control. Imagen de fluorescencia.

Figura 20. Claudina 2 en cortes de riñones congelados de rata control. Imagen de campo claro.

Figura 21 a). Claudina 2 en cortes de riñones congelados de ratas colapsantes. Imagen de fluorescencia.

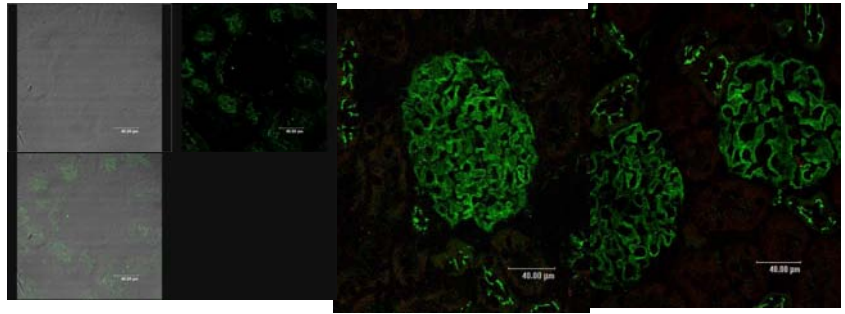


Figura 21 b)

Figura 22

Figura 23

Figura 21 b) Claudina 2 en cortes de riñones congelados de ratas colapsantes. Imagen de campo claro.

Figura 22. Claudina 5 en cortes de riñones congelados de ratas control. Imagen de fluorescencia.

Figura 23. Claudina 5 en cortes de riñones congelados de ratas colapsantes. Imagen de fluorescencia.

X DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 PROTEINURIA

La proteinuria es consecuencia de dos mecanismos: por una parte, el paso anormal transglomerular de proteínas, al espacio urinario, debido a un incremento en la permeabilidad de los capilares glomerulares; y, por otra, de una disminución en la absorción de dichas moléculas, por las células epiteliales, en el túbulo proximal. Estos dos mecanismos caracterizan la mayoría de las formas de lesión glomerular que contribuyen a causar las complicaciones del síndrome nefrótico, siendo, además un marcador de daño glomerular. Esta compleja barrera de filtración está formada por tres componentes distintos: el endotelio glomerular, la MBG y las hendiduras de filtración existentes entre los pedicelos de las células epiteliales glomerulares.

La orina normal contiene sólo pequeñas cantidades de albúmina, excretada por animales adultos sanos. En humanos adultos, se considera normal una excreción de menos de 30 mg de albúmina, en orina de 24 h; sin embargo, en pacientes con glomerulopatía colapsante se encontró una excreción urinaria de proteínas mayor a los 10 g/ 24 h., presentando además colapso glomerular, daño de células epiteliales viscerales y cambios túbulo intersticiales, (Avila-Casado, M. C. 1999)

Los podocitos son dañados en muchas formas de enfermedades glomerulares, humanas y experimentales, incluyendo la Enfermedad de Cambios Mínimos, Glomeruloesclerosis Focal Segmentaria, Glomerulopatía Colapsante, Nefropatía Diabética, Glomerulopatía Membranosa y Nefritis Lúpica.

Los resultados de nuestro estudio reportan en el grupo control una excreción urinaria de proteínas de 37 y 48 mg/24 h en los días 5 y 6, respectivamente, comparado con los 92 y 137 mg /24 h del grupo de ratas colapsantes en esos mismos días, lo cual representó una diferencia en el incremento de 248.64% y 285.48%, entre los grupos, como puede verse en la Fig. 8. Lo anterior se confirma con la excreción de proteínas por ml, lo que resultó también estadísticamente significativo (Figura 7). Estos datos ya han sido corroborados por otros autores (Avila-Casado, Mdel C. et al. 2004). Sin embargo nosotros encontramos en el grupo de ratas con GC en orina de 24 h, mayor proteinuria durante los días 5 y 6.

La hipótesis más aceptada, sobre la etiología de la GC, es la presencia de factores circulantes séricos provocados por diferentes padecimientos inflamatorios, como la infección por HIV y nefropatía del alonjerto, que afectan directamente las células epiteliales viscerales y producen una glomerulonefritis focal segmentaria (GFS) (Avila-Casado, Mdel C. et al. 2004). Se ha podido comprobar que la carencia de estos factores circulantes séricos puede evitar la GFS, demostrando así su efecto causal directo (D'Agati, V. D. 2008), (Albaqumi, M. et al. 2008) Hasta la fecha, sin embargo, no se ha podido identificar cuál o cuáles moléculas séricas dañan al

podocito en esta nefropatía, pero, al parecer, la inmunoglobulina G interviene, como lo demostraría el que cuando se aplica suero a un inmunoabsorbente, mediante la proteína A, en los animales se sigue produciendo la GC (Avila-Casado, Mdel C. et al. 2004).

10.2 Depuración de creatinina

La creatinina se sintetiza en el hígado, siendo el producto final del metabolismo de las proteínas del músculo. Se filtra a nivel glomerular y no es absorbida a nivel tubular. Aunque es un catión endógeno se excreta en túbulo proximal, existen evidencias de que la creatinina es un buen indicador de la tasa de filtración glomerular, por lo que su depuración (Dcr) es un parámetro confiable de funcionalidad renal, específicamente a nivel glomerular, siendo frecuentemente el método más usado en la práctica clínica para evaluar la VFG (Donadio, C. et al. 2004). Nuestros resultados mostraron una diferencia estadística significativa entre los dos grupos de ratas estudiadas, ya que en el grupo control encontramos una depuración de creatinina de 394 ± 69.02 μ l por min, contra 235μ l ± 43.43 por min en el grupo colapsante.

El daño a las células epiteliales viscerales que encontramos en el glomérulo puede explicar nuestros resultados, ya que el daño a los capilares provoca colapso de los mismos y una prominencia de las células epiteliales viscerales, produciendo así un decremento de la filtración glomerular. Estos resultados han sido confirmados por otros autores (Stokes, M. B. et al. 1999), (Barisoni, L. et al. 2007) (Albaqumi, M. et al. 2008).

10.3 Depuración de agua libre

Los resultados de nuestro estudio muestran una reducción en la DH₂O libre en el grupo de ratas con GC, mostrando una diferencia significativa en relación al grupo control. La depuración de agua libre es un parámetro que sirve para evaluar la función de la nefrona distal, en cuanto a su capacidad de reabsorción de agua. El resultado que arroja nuestro estudio hace evidente una alteración a nivel distal, inducida por el daño patológico ocasionado en la glomerulopatía colapsante. Esto indica que, además del daño ocasionado en el túbulo proximal, induce alteraciones en otros segmentos de la nefrona, aunque la magnitud en estos segmentos sea diferente.

10.4 Depuración osmolar

La depuración osmolar (D_{osm}) es definida como los mililitros por minuto de plasma, libre de solutos osmóticamente activos. También es dependiente de la ingestión de agua y la dieta. Los resultados del presente estudio muestran una diferencia entre el grupo control y el grupo con GC, aunque ésta no fue significativa. Estos

hallazgos indican que existió lesión a nivel del distal de la nefrona, pero este daño no mostró una diferencia significativa. Por otra parte, no existen antecedentes de que se haya realizado una evaluación de la función renal integral en la GC.

10.5 Flujo urinario

El filtrado glomerular, en el humano, es de aproximadamente 180 litros en 24 h., de los cuales más del 99% son reabsorbidos, siendo el resto (cerca al 1%) eliminado del organismo en forma de orina. En condiciones normales, el flujo urinario es un parámetro muy variable que depende, en gran medida, de la dieta y de la ingestión de agua. Nuestros resultados muestran una tendencia a la disminución del FU en el grupo experimental los días 2, 3, 4 y 5, en relación al grupo control, aunque este descenso no fue estadísticamente significativo. El día 6, sin embargo, sí se pudo constatar una diferencia significativa, al observar un incremento en el grupo experimental.

No existen antecedentes de que se haya realizado a nivel experimental una evaluación del flujo urinario en la GC, a pesar de que los datos sugieren que hubo alteración funcional del túbulo distal. Y respecto a las cargas filtradas de glucosa y potasio, sí se dio una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo colapsante, aunque los datos experimentales no reportan una diferencia similar para la carga filtrada de sodio. No se han encontrado datos experimentales de estas pruebas funcionales en la GC.

10.6 Resultados de la función tubular renal en GC

10.6.1 Excreción fraccional de sodio

En condiciones normales, la carga filtrada de Na es reabsorbida prácticamente en su totalidad; es decir, en la orina pueden encontrarse concentraciones variables de sodio, sustancia que es absorbida en el túbulo proximal (Aronson, P. S. 1996). En relación al FeNa, los resultados de los experimentos dejan clara evidencia de una alteración funcional a nivel de túbulo proximal, manifestado por una mayor pérdida de la absorción, lo que es indicativo de daño al epitelio tubular proximal, tal como sucede en la necrosis tubular aguda (Bednarski, D. et al. 2008), (Baliga, K. V. et al. 2008).

Los resultados que se obtuvieron en el grupo con glomerulopatía colapsante muestran que la FeNa alcanzó valores más elevados y estadísticamente significativos en el grupo experimental que en el grupo control. Hasta ahora no existen antecedentes, a nivel experimental, de evaluación de la función tubular empleando las excreciones fraccionales de sodio en la glomerulopatía colapsante. Sin embargo, un estudio que fue realizado en pacientes con GC encontró mediciones de FeNa de 0.71 y 1.33%, con significancia estadística. (Murakami, R.

et al. 2005). En otro estudio realizado experimentalmente se logró inducir una disfunción renal y una desregulación de los transportadores tubulares del sodio y, con esto, producir la elevación de la excreción fraccional del mismo, lo que sugiere una afectación de los transportadores tubulares del sodio (Schmidt, C. et al. 2007).

10.6.2 Excreción fraccional de Glucosa

La conservación de los nutrientes esenciales, tales como glucosa y aminoácidos, tiene lugar sobre toda la porción del túbulo proximal mediante su absorción, la que en esta porción de la nefrona se efectúa en dos etapas: 1) cotransporte de Na^+ /glucosa, mediado por transportador en la membrana apical; seguido de 2) transporte facilitado de glucosa y salida activa de Na^+ , través de la membrana basolateral.

En la membrana apical celular del túbulo proximal se han identificado dos transportadores específicos acoplados a sodio, los que se fijan al Na^+ y a la glucosa, en el líquido tubular. Existen reportes de que cuando existe disfunción tubular proximal se afecta la absorción de glucosa y se incrementa la excreción fraccional de la misma, (Amasheh, S. et al. 2005; Tsimihodimos, V. et al. 2007) lo cual coincide con los hallazgos que encontramos en los animales con GC, en donde existe una elevación mayor de la excreción fraccional de glucosa, mostrando una diferencia significativa, en comparación con el grupo control. Por otra parte, no se han encontrado datos de la función tubular a nivel experimental en cuanto a la excreción fraccional de glucosa, en la GC.

En un estudio experimental utilizando ratas, se demostró que la glucosa filtrada se debe a la expresión genética de los transportadores que se encuentran en las células epiteliales de los túbulos proximales renales, encontrándose una diferencia significativa en los que presentaron glucosuria. (Vestri, S. et al. 2001). Asimismo, se ha encontrado que el ratón knockout presenta una afectación de los transportadores de glucosa en los túbulos renales, afectando así la excreción fraccional de la misma (Souza-Menezes, J. et al. 2007).

10.6.3 Excreción fraccional de Potasio

El mantenimiento del equilibrio del potasio (K^+) resulta esencial, en muchos aspectos. Es imprescindible una concentración intracelular alta de potasio para el desarrollo óptimo de numerosas funciones celulares, tales como crecimiento, síntesis de ADN y proteínas, acción de varios sistemas enzimáticos, control de volumen celular y mantenimiento de un equilibrio acidobásico normal, entre otros. Se ha observado, además, la reabsorción neta constante de K^+ , tanto en la parte inicial del túbulo contorneado inicial, la que es accesible sólo en una cepa especial de ratas, (Le Grimellec, C. 1975) como en las últimas porciones del túbulo contorneado proximal a las que puede accederse, en las diferentes cepas de ratas (Malnic, G. et al. 1966) (Kaufman, J. S. et al. 1983).

Se ha reportado, asimismo, que la regulación de la excreción de potasio es compleja y se verifica a lo largo de casi toda la nefrona, interviniendo en ella tres procesos: 1) filtración glomerular, 2) la absorción que se lleva en el túbulo proximal (65%) y asa de henle (25%), 3) mientras que en los sitios dístales (túbulo distal y colector se lleva a cabo un transporte bidireccional (secreción y absorción) (Kleinman, L. I. et al. 1983), (Giebisch, G. 1998), (Giebisch, G. H. 2002). La homeostasis del K⁺, sin embargo, depende de dos operaciones de transporte, siendo una de ellas la responsable de una operación desigual entre los compartimentos intra y extracelulares y, la otra, de una excreción renal efectiva.

En este estudio, el grupo experimental mostró una mayor excreción fraccionaria de potasio en comparación con el grupo control, mostrando además una diferencia significativa ($P < 0.05$), lo cual significa un mayor pérdida urinaria de potasio por daño tubular que presentaron los animales con GC. Por otra parte, GC no se han encontrado datos de la excreción fraccional de K en la GC experimental.

Los resultados anteriores sobre las alteraciones tubulares en la GC, explican muchas de las alteraciones ya descritas a nivel tubular de la GC humana. Como es bien sabido, la formación de microquistes, en el intersticio renal se debe a una alteración en la reparación celular, lo cual se debe a la creación de un microambiente mitogénico y fibrogénico provocado por la moléculas antigénicas, lo cual genera una respuesta aberrante hiperplásica, que es el condicionante principal de la formación de estos microquistes. Es muy probable que nuestros hallazgos sobre la función tubular correspondan a un estado inicial de las lesiones intersticiales que se puedan encontrar a largo plazo en esta neuropatía. (Albaqumi, M. et al. 2006).

10.7 Claudinas 2 y 5

En el grupo con GC, se observaron zonas de mayor densidad de la fluorescencia de claudina 5, lo que indica desorganización de las UEs del endotelio glomerular y colapso capilar, lo cual fue corroborado con las pruebas funcionales renales como depuración de creatinina, proteinuria, y las cargas filtradas de potasio y glucosa al mostrar ellos una diferencia significativa, aunque no sucedió lo mismo con respecto al sodio. Además, se observaron asas capilares engrosadas y un patrón puntiforme de la fluorescencia, aunque no se observaron alteraciones en las UEs de los endotelios de otros vasos.

En cuanto a la claudina 2, se encontró algunas alteraciones en su morfología en los animales con GC, identificándose una sobreexpresión de esta proteína a nivel de los túbulos proximales y en la capsula de Bowman, tomando en consideración que esta sobreexpresión implica un sellado de los espacios intercelulares del epitelio tubular, con lo cual se ve afectada la absorción tubular proximal y distal, reflejándose esto en las diferencias halladas en las excreciones fraccionales de sodio, potasio, glucosa y en las depuraciones de agua libre y osmolar, así como el flujo urinario.

Asimismo, la correlación positiva encontrada en la expresión de las claudinas 2 y 5, entre los dos grupos experimentales y en relación con las pruebas funcionales, sugiere una participación clínica en esta patología al mostrar una mayor correlación entre los túbulos proximales y las excreciones fraccionales de sodio, potasio y glucosa, en las cuales sí existió significancia estadística, además de una sobreexpresión de claudina 2, en el grupo colapsante.

XI CONCLUSIONES

1.- La administración de suero de pacientes con GC aumentó la expresión de la claudina 2 y esto se acompañó de aumento en las excreciones fraccionales de sodio, potasio y glucosa.

2.-La administración de suero de pacientes con GC disminuyó significativamente la depuración de agua libre y la depuración osmolar, aun cuando ésta última la diferencia no fue significativa.

3.- La expresión de la claudina 5, encontrada en el grupo de ratas colapsantes, se acompañó de disminución en la filtración glomerular y de proteinuria.

4.- La glomerulopatía colapsante ocasiona disfunción de los diferentes segmentos de la nefrona, siendo ésta no sólo a nivel glomerular, sino también a nivel del túbulo proximal y distal.

5. – En la GC, existen alteraciones en la UEs que no se han descrito anteriormente y que es posible correlacionar con las alteraciones de las funciones glomerular y tubular. Estos resultados pueden dar origen a otra línea de investigación en el campo de la nefrología experimental, en donde se estudie la correlación entre la estructura de la UE y glomerulonefritis, estudios que podrían aportar alguna estrategia terapéutica para las glomerulonefritis clínicas.

XII PERSPECTIVAS

1. Estudiar la expresión de las proteínas de las UEs en la glomerulopatía colapsante, como asimismo la asociación entre la posible sobreexpresión de dichas proteínas y sus implicaciones funcionales.
2. Investigar el mecanismo de daño por el cual esta glomerulopatía causa alteración de la función glomerular, de los túbulos proximales y distales.
3. A la luz de estos resultados se sugiere, por último, continuar investigando las diferentes etapas que caracterizan el desarrollo de la Glomerulopatía Colapsante, a fin de conocerla de mejor manera y así poder prevenir, en algún grado la patología que envuelve a esta enfermedad.

XIII BIBLIOGRAFÍA

Reference List

1. Albaqumi,M. and Barisoni,L., 2008. Current Views on Collapsing Glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*
2. Albaqumi,M., Soos,T.J., Barisoni,L., and Nelson,P.J., 2006. Collapsing glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2854-2863.
3. Amasheh,S., Meiri,N., Gitter,A.H., Schoneberg,T., Mankertz,J., Schulzke,J.D., and Fromm,M., 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 4969-4976.
4. Amasheh,S., Schmidt,T., Mahn,M., Florian,P., Mankertz,J., Tavalali,S., Gitter,A.H., Schulzke,J.D., and Fromm,M., 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 321, 89-96.
5. Amoura,Z., Geogin-Lavialle,S., Haroche,J., Merrien,D., Brocheriou,I., Beaufils,H., and Piette,J.C., 2006. Collapsing glomerulopathy in systemic autoimmune disorders: a case occurring in the course of full blown systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 277-278.
6. Ando-Akatsuka,Y., Saitou,M., Hirase,T., Kishi,M., Sakakibara,A., Itoh,M., Yonemura,S., Furuse,M., and Tsukita,S., 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell Biol.* 133, 43-47.
7. Andrews,P.M. and Coffey,A.K., 1983. Cytoplasmic contractile elements in glomerular cells. *Fed. Proc.* 42, 3046-3052.
8. Arbel,O., Pizov,G., Ben Yehuda,A., Rubinow,A., Naparstek,Y., and Amital,H., 2005. Hyperacute renal failure as the initial presentation of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 14, 331-333.
9. Aronson,P.S., 1996. Role of ion exchangers in mediating NaCl transport in the proximal tubule. *Kidney Int.* 49, 1665-1670.
10. Avila-Casado,M.C., 1999. [Collapsing glomerulopathy: a new entity associated with nephrotic syndrome and end-stage renal failure]. *Rev. Invest Clin.* 51, 367-373.

11. Avila-Casado,M.C., Vargas-Alarcon,G., Soto,M.E., Hernandez,G., Reyes,P.A., and Herrera-Acosta,J., 2003. Familial collapsing glomerulopathy: clinical, pathological and immunogenetic features. *Kidney Int.* 63, 233-239.
12. Avila-Casado,M.C., Perez-Torres,I., Auron,A., Soto,V., Fortoul,T.I., and Herrera-Acosta,J., 2004. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 66, 133-143.
13. Badhwar,A., Berkovic,S.F., Dowling,J.P., Gonzales,M., Narayanan,S., Brodtmann,A., Berzen,L., Caviness,J., Trenkwalder,C., Winkelmann,J., Rivest,J., Lambert,M., Hernandez-Cossio,O., Carpenter,S., Andermann,F., and Andermann,E., 2004. Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder. *Brain* 127, 2173-2182.
14. Balda,M.S., Whitney,J.A., Flores,C., Gonzalez,S., Cerejido,M., and Matter,K., 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134, 1031-1049.
15. Baliga,K.V., Narula,A.S., Khanduja,R., Manrai,M., Sharma,P., and Mani,N.S., 2008. Acute cortical necrosis in Falciparum malaria: an unusual manifestation. *Ren Fail.* 30, 461-463.
16. Bariety,J., Nochy,D., Mandet,C., Jacquot,C., Glotz,D., and Meyrier,A., 1998. Podocytes undergo phenotypic changes and express macrophagic-associated markers in idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 53, 918-925.
17. Barisoni,L., Madaio,M.P., Eraso,M., Gasser,D.L., and Nelson,P.J., 2005. The kd/kd mouse is a model of collapsing glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2847-2851.
18. Barisoni,L. and Nelson,P.J., 2007. Collapsing glomerulopathy: an inflammatory podocytopathy? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16, 192-195.
19. Barri,Y.M., Munshi,N.C., Sukumalchantra,S., Abulezz,S.R., Bonsib,S.M., Wallach,J., and Walker,P.D., 2004. Podocyte injury associated glomerulopathies induced by pamidronate. *Kidney Int.* 65, 634-641.
20. Barsoum,N.R., Bunnapradist,S., Mougdil,A., Toyoda,M., Vo,A., and Jordan,S.C., 2002. Treatment of parvovirus B-19 (PV B-19) infection allows for successful kidney transplantation without disease recurrence. *Am. J. Transplant.* 2, 425-428.
21. Becker,C.G., 1972. Demonstration of actomyosin in mesangial cells of the renal glomerulus. *Am. J. Pathol.* 66, 97-110.

22. Bednarski,D., Castner,D., and Douglas,C., 2008. Managing acute tubular necrosis: Knowing how to respond to this type of renal failure can mean the difference between recovery and lifelong disability for your patient. *Nursing*. 38, 56hn1-56hn6.
23. Bennett,A.N., Peterson,P., Sangle,S., Hangartner,R., Abbs,I.C., Hughes,G.R., and D'Cruz,D.P., 2004. Adult onset Still's disease and collapsing glomerulopathy: successful treatment with intravenous immunoglobulins and mycophenolate mofetil. *Rheumatology*. (Oxford) 43, 795-799.
24. Berggren,R. and Batuman,V., 2005. HIV-associated renal disorders: recent insights into pathogenesis and treatment. *Curr. HIV. /AIDS Rep.* 2, 109-115.
25. Blantz,R.C., 1975. The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J. Clin. Invest* 55, 621-635.
26. Bohrer,M.P., Baylis,C., Robertson,C.R., Brenner,B.M., Troy,J.L., and Willis,W.T., 1977. Mechanisms of the puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J. Clin. Invest* 60, 152-161.
27. Brandner,J.M., Kief,S., Grund,C., Rendl,M., Houdek,P., Kuhn,C., Tschachler,E., Franke,W.W., and Moll,I., 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 253-263.
28. Brenner,B.M. and Troy,J.L., 1971. Postglomerular vascular protein concentration: evidence for a causal role in governing fluid reabsorption and glomerulotubular balance by the renal proximal tubule. *J. Clin. Invest* 50, 336-349.
29. Clarke,H., Soler,A.P., and Mullin,J.M., 2000. Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 18), 3187-3196.
30. Clarkson,M.R., O'Meara,Y.M., Murphy,B., Rennke,H.G., and Brady,H.R., 1998. Collapsing glomerulopathy--recurrence in a renal allograft. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 503-506.
31. Colegio,O.R., Van Itallie,C.M., McCrea,H.J., Rahner,C., and Anderson,J.M., 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283, C142-C147.
32. Conger,J.D., Falk,S.A., and Guggenheim,S.J., 1981. Glomerular dynamics and morphologic changes in the generalized Shwartzman reaction in postpartum rats. *J. Clin. Invest* 67, 1334-1346.

33. Cordenonsi,M., Mazzon,E., De Rigo,L., Baraldo,S., Meggio,F., and Citi,S., 1997. Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 24), 3131-3139.
34. Coventry,S. and Shoemaker,L.R., 2004. Collapsing glomerulopathy in a 16-year-old girl with pulmonary tuberculosis: the role of systemic inflammatory mediators. *Pediatr. Dev. Pathol.* 7, 166-170.
35. D'Agati,V., 1994. The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 46, 1223-1241.
36. D'Agati,V., 2003. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin. Nephrol.* 23, 117-134.
37. D'Agati,V.D., 2008. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17, 271-281.
38. D'Amico,G. and Bazzi,C., 2003. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* 63, 809-825.
39. Daha,M.R., 2000. Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases. *J. Nephrol.* 13 Suppl 3, S89-S95.
40. Daniels,B.S., Hauser,E.B., Deen,W.M., and Hostetter,T.H., 1992. Glomerular basement membrane: in vitro studies of water and protein permeability. *Am. J. Physiol* 262, F919-F926.
41. Dantal,J., Bigot,E., Bogers,W., Testa,A., Kriaa,F., Jacques,Y., Hurault,d.L., Niaudet,P., Charpentier,B., and Souillou,J.P., 1994. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 330, 7-14.
42. Daugharty,T.M., Ueki,I.F., Mercer,P.F., and Brenner,B.M., 1974. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. V. Response to ischemic injury. *J. Clin. Invest* 53, 105-116.
43. Deegens,J.K., Steenbergen,E.J., Borm,G.F., and Wetzels,J.F., 2008. Pathological variants of focal segmental glomerulosclerosis in an adult Dutch population-epidemiology and outcome. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 186-192.
44. Deen,W.M., Lazzara,M.J., and Myers,B.D., 2001. Structural determinants of glomerular permeability. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 281, F579-F596.
45. Deen,W.M., Robertson,C.R., and Brenner,B.M., 1972. A model of glomerular ultrafiltration in the rat. *Am. J. Physiol* 223, 1178-1183.

46. Detwiler,R.K., Falk,R.J., Hogan,S.L., and Jennette,J.C., 1994. Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 45, 1416-1424.
47. Dickie,P., Felser,J., Eckhaus,M., Bryant,J., Silver,J., Marinos,N., and Notkins,A.L., 1991. HIV-associated nephropathy in transgenic mice expressing HIV-1 genes. *Virology* 185, 109-119.
48. Dickie,P., Roberts,A., Uwiera,R., Witmer,J., Sharma,K., and Kopp,J.B., 2004. Focal glomerulosclerosis in proviral and c-fms transgenic mice links Vpr expression to HIV-associated nephropathy. *Virology* 322, 69-81.
49. Dijkman,H., Smeets,B., van der,L.J., Steenbergen,E., and Wetzels,J., 2005. The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 68, 1562-1572.
50. Dijkman,H.B., Weening,J.J., Smeets,B., Verrijp,K.C., van Kuppevelt,T.H., Assmann,K.K., Steenbergen,E.J., and Wetzels,J.F., 2006. Proliferating cells in HIV and pamidronate-associated collapsing focal segmental glomerulosclerosis are parietal epithelial cells. *Kidney Int.* 70, 338-344.
51. Donadio,C., Consani,C., Ardini,M., Caprio,F., Grassi,G., and Lucchesi,A., 2004. Prediction of glomerular filtration rate from body cell mass and plasma creatinine. *Curr. Drug Discov. Technol.* 1, 221-228.
52. Drumond,M.C., Kristal,B., Myers,B.D., and Deen,W.M., 1994. Structural basis for reduced glomerular filtration capacity in nephrotic humans. *J. Clin. Invest* 94, 1187-1195.
53. Eddy,A.A. and Schnaper,H.W., 1998. The nephrotic syndrome: from the simple to the complex. *Semin. Nephrol.* 18, 304-316.
54. Enck,A.H., Berger,U.V., and Yu,A.S., 2001. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 281, F966-F974.
55. Endlich,K., Kriz,W., and Witzgall,R., 2001. Update in podocyte biology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 331-340.
56. Furuse,M., Hirase,T., Itoh,M., Nagafuchi,A., Yonemura,S., Tsukita,S., and Tsukita,S., 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777-1788.
57. Furuse,M., Itoh,M., Hirase,T., Nagafuchi,A., Yonemura,S., Tsukita,S., and Tsukita,S., 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 127, 1617-1626.

58. Furuse,M., Sasaki,H., Fujimoto,K., and Tsukita,S., 1998. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143, 391-401.
59. Furuse,M., Sasaki,H., and Tsukita,S., 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147, 891-903.
60. Gassler,N., Elger,M., Kranzlin,B., Kriz,W., Gretz,N., Hahnel,B., Hosser,H., and Hartmann,I., 2001. Podocyte injury underlies the progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat. *Kidney Int.* 60, 106-116.
61. Giebisch,G., 1998. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am. J. Physiol* 274, F817-F833.
62. Giebisch,G.H., 2002. A trail of research on potassium. *Kidney Int.* 62, 1498-1512.
63. Gonzalez-Mariscal,L., Namorado,M.C., Martin,D., Luna,J., Alarcon,L., Islas,S., Valencia,L., Muriel,P., Ponce,L., and Reyes,J.L., 2000. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int.* 57, 2386-2402.
64. GORNALL,A.G., BARDAWILL,C.J., and DAVID,M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
65. Greevska,L. and Polenakovik,M., 1999. Collapsing glomerulopathy: clinical characteristics and follow-up. *Am. J. Kidney Dis.* 33, 652-657.
66. Gupta,K. and Weber,M.L., 2006. Renal effects of opioid exposure: considerations for therapeutic use. *J. Opioid. Manag.* 2, 236-240.
67. Haley,D.P., Sarrafian,M., Bulger,R.E., Dobyan,D.C., and Eknoyan,G., 1987. Structural and functional correlates of effects of angiotensin-induced changes in rat glomerulus. *Am. J. Physiol* 253, F111-F119.
68. Hamazaki,Y., Itoh,M., Sasaki,H., Furuse,M., and Tsukita,S., 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 277, 455-461.
69. Haskins,J., Gu,L., Wittchen,E.S., Hibbard,J., and Stevenson,B.R., 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* 141, 199-208.
70. Hayashi,K., Kaufman,L., Ross,M.D., and Klotman,P.E., 2005. Definition of the critical domains required for homophilic targeting of mouse sidekick molecules. *FASEB J.* 19, 614-616.

71. Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L.L., 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 14), 1603-1613.
72. Huang, T.W. and Langlois, J.C., 1985. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J. Exp. Med.* 162, 245-267.
73. Ichikawa, I., 1982. Direct analysis of the effector mechanism of the tubuloglomerular feedback system. *Am. J. Physiol* 243, F447-F455.
74. Ichikawa, I., Yoshida, Y., Fogo, A., Purkerson, M.L., and Klahr, S., 1988. Effect of heparin on the glomerular structure and function of remnant nephrons. *Kidney Int.* 34, 638-644.
75. Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S., 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147, 1351-1363.
76. Jalanko, H., 2003. Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin. *Pediatr. Nephrol.* 18, 487-491.
77. Kaufman, J.S. and Hamburger, R.J., 1983. Potassium transport in the isolated proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol* 244, F409-F417.
78. Kaufman, L., Yang, G., Hayashi, K., Ashby, J.R., Huang, L., Ross, M.J., Klotman, M.E., and Klotman, P.E., 2007. The homophilic adhesion molecule sidekick-1 contributes to augmented podocyte aggregation in HIV-associated nephropathy. *FASEB J.* 21, 1367-1375.
79. Kim, Y.H., Goyal, M., Kurnit, D., Wharram, B., Wiggins, J., Holzman, L., Kershaw, D., and Wiggins, R., 2001. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int.* 60, 957-968.
80. Kimura, T., Takeda, S., Sagiya, Y., Gotoh, M., Nakamura, Y., and Arakawa, H., 2003. Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat. Genet.* 34, 440-445.
81. Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., and Tsukita, S., 2002. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 875-886.
82. Kleinman, L.I. and Banks, R.O., 1983. Segmental nephron sodium and potassium reabsorption in newborn and adult dogs during saline expansion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 173, 231-237.

83. Kon,V., Hughes,M.L., and Ichikawa,I., 1983. Blood flow dependence of postglomerular fluid transfer and glomerulotubular balance. *J. Clin. Invest* 72, 1716-1728.
84. Korbet,S.M., Schwartz,M.M., and Lewis,E.J., 1988. Recurrent nephrotic syndrome in renal allografts. *Am. J. Kidney Dis.* 11, 270-276.
85. Kumar,S., Sheaff,M., and Yaqoob,M., 2004. Collapsing glomerulopathy in adult still's disease. *Am. J. Kidney Dis.* 43, e4-10.
86. Kunin,M., Kopolovic,J., Avigdor,A., and Holtzman,E.J., 2004. Collapsing glomerulopathy induced by long-term treatment with standard-dose pamidronate in a myeloma patient. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 723-726.
87. Langbein,L., Grund,C., Kuhn,C., Praetzel,S., Kartenbeck,J., Brandner,J.M., Moll,I., and Franke,W.W., 2002. Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 419-435.
88. Larsson,L., 1975. Ultrastructure and permeability of intercellular contacts of developing proximal tubule in rat kidney. *J. Ultrastruct. Res.* 52, 100-113.
89. Laurinavicius,A., Hurwitz,S., and Rennke,H.G., 1999. Collapsing glomerulopathy in HIV and non-HIV patients: a clinicopathological and follow-up study. *Kidney Int.* 56, 2203-2213.
90. Laurinavicius,A. and Rennke,H.G., 2002. Collapsing glomerulopathy--a new pattern of renal injury. *Semin. Diagn. Pathol.* 19, 106-115.
91. Le Grimellec,C., 1975. Micropuncture study along the proximal convoluted tubule. Electrolyte reabsorption in first convolutions. *Pflugers Arch.* 354, 133-150.
92. Leblond,V., Beaufils,H., Ginsburg,C., Bricaire,F., Danis,M., Deray,G., and Jacobs,C., 1994. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis associated with visceral leishmaniasis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 9, 1353.
93. Lee,D.B., Huang,E., and Ward,H.J., 2006. Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 290, F20-F34.
94. Lu,T.C. and Ross,M., 2005. HIV-associated nephropathy: a brief review. *Mt. Sinai J. Med.* 72, 193-199.
95. Maddox,D.A., Bennett,C.M., Deen,W.M., Glassock,R.J., Knutson,D., Daugharty,T.M., and Brenner,B.M., 1975. Determinants of glomerular filtration in experimental glomerulonephritis in the rat. *J. Clin. Invest* 55, 305-318.

96. Malnic,G., Klose,R.M., and Giebisch,G., 1966. Microperfusion study of distal tubular potassium and sodium transfer in rat kidney. *Am. J. Physiol* 211, 548-559.
97. Markowitz,G.S., Appel,G.B., Fine,P.L., Fenves,A.Z., Loon,N.R., Jagannath,S., Kuhn,J.A., Dratch,A.D., and D'Agati,V.D., 2001. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1164-1172.
98. Marques,L.P., Pacheco,G.G., Rioja,L.S., Nunes,S.N., Velone,S.T., and Santos,O.R., 2005. Can systemic lupus erythematosus be the cause of collapsing glomerulopathy? *Lupus* 14, 853-855.
99. Matsusaka,T., Xin,J., Niwa,S., Kobayashi,K., Akatsuka,A., Hashizume,H., Wang,Q.C., Pastan,I., Fogo,A.B., and Ichikawa,I., 2005. Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 1013-1023.
100. Matter,K. and Balda,M.S., 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 225-236.
101. McCarthy,K.M., Skare,I.B., Stankewich,M.C., Furuse,M., Tsukita,S., Rogers,R.A., Lynch,R.D., and Schneeberger,E.E., 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 9), 2287-2298.
102. Meehan,S.M., Pascual,M., Williams,W.W., Tolkoff-Rubin,N., Delmonico,F.L., Cosimi,A.B., and Colvin,R.B., 1998. De novo collapsing glomerulopathy in renal allografts. *Transplantation* 65, 1192-1197.
103. Meyer,T.N., Schwesinger,C., Ye,J., Denker,B.M., and Nigam,S.K., 2001. Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 276, 22048-22055.
104. Miner,J.H., 1999. Renal basement membrane components. *Kidney Int.* 56, 2016-2024.
105. Miner,J.H., 2003. A molecular look at the glomerular barrier. *Nephron Exp. Nephrol.* 94, e119-e122.
106. Mitic,L.L., Van Itallie,C.M., and Anderson,J.M., 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 279, G250-G254.
107. Morita,K., Sasaki,H., Furuse,M., and Tsukita,S., 1999. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147, 185-194.

108. Moudgil,A., Nast,C.C., Bagga,A., Wei,L., Nurmamet,A., Cohen,A.H., Jordan,S.C., and Toyoda,M., 2001. Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 59, 2126-2133.
109. Moudgil,A., Shidban,H., Nast,C.C., Bagga,A., Aswad,S., Graham,S.L., Mendez,R., and Jordan,S.C., 1997. Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients: treatment with intravenous immunoglobulin. *Transplantation* 64, 1847-1850.
110. Murakami,R., Kumazaki,T., Tajima,H., Hayashi,H., Kuwako,T., Hakozaiki,K., and Kiriyaama,T., 2005. Urinary excretion of vasoactive factors following contrast media exposure in humans. *Nephron Clin. Pract.* 101, c150-c154.
111. Nadasdy,T., Allen,C., and Zand,M.S., 2002. Zonal distribution of glomerular collapse in renal allografts: possible role of vascular changes. *Hum. Pathol.* 33, 437-441.
112. Nagata,M., Hattori,M., Hamano,Y., Ito,K., Saitoh,K., and Watanabe,T., 1998. Origin and phenotypic features of hyperplastic epithelial cells in collapsing glomerulopathy. *Am. J. Kidney Dis.* 32, 962-969.
113. Nasr,S.H., Markowitz,G.S., Sentman,R.L., and D'Agati,V.D., 2006. Sickle cell disease, nephrotic syndrome, and renal failure. *Kidney Int.* 69, 1276-1280.
114. Ohse,T., Pippin,J.W., Vaughan,M.R., Brinkkoetter,P.T., Krofft,R.D., and Shankland,S.J., 2008. Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1879-1890.
115. Oken,D.E., Wolfert,A.I., Laveri,L.A., and Choi,S.C., 1985. Effects of intra-animal nephron heterogeneity on studies of glomerular dynamics. *Kidney Int.* 27, 871-878.
116. Osswald,H., Haas,J.A., Marchand,G.R., and Knox,F.G., 1979. Glomerular dynamics in dogs at reduced renal artery pressure. *Am. J. Physiol* 236, F25-F29.
117. Pavenstadt,H., Kriz,W., and Kretzler,M., 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 83, 253-307.
118. Perez,A., Ramirez-Ramos,M., Calleja,C., Martin,D., Namorado,M.C., Sierra,G., Ramirez-Ramos,M.E., Paniagua,R., Sanchez,Y., Arreola,L., and Reyes,J.L., 2004. Beneficial effect of retinoic acid on the outcome of experimental acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 2464-2471.
119. Perrone,R.D., Madias,N.E., and Levey,A.S., 1992. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin. Chem.* 38, 1933-1953.

120. Piepenhagen,P.A., Peters,L.L., Lux,S.E., and Nelson,W.J., 1995. Differential expression of Na(+)-K(+)-ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron. *Am. J. Physiol* 269, C1417-C1432.
121. Powell,D.R., Desai,U., Sparks,M.J., Hansen,G., Gay,J., Schrick,J., Shi,Z.Z., Hicks,J., and Vogel,P., 2005. Rapid development of glomerular injury and renal failure in mice lacking p53R2. *Pediatr. Nephrol.* 20, 432-440.
122. Presne,C., Cordonnier,C., Makdassi,R., Pruna,A., and Fournier,A., 2000. [Collapsing glomerulopathy and cytomegalovirus, what are the links?]. *Presse Med.* 29, 1815-1817.
123. Prozialeck,W.C. and Niewenhuis,R.J., 1991. Cadmium (Cd²⁺) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107, 81-97.
124. Raats,C.J., Van Den,B.J., and Berden,J.H., 2000. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* 57, 385-400.
125. Rao,V.H., Lees,G.E., Kashtan,C.E., Nemori,R., Singh,R.K., Meehan,D.T., Rodgers,K., Berridge,B.R., Bhattacharya,G., and Cosgrove,D., 2003. Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS). *Kidney Int.* 63, 1736-1748.
126. Ray,P.E., Liu,X.H., Robinson,L.R., Reid,W., Xu,L., Owens,J.W., Jones,O.D., Denaro,F., Davis,H.G., and Bryant,J.L., 2003. A novel HIV-1 transgenic rat model of childhood HIV-1-associated nephropathy. *Kidney Int.* 63, 2242-2253.
127. Reiser,J., von Gersdorff,G., Simons,M., Schwarz,K., Faul,C., Giardino,L., Heider,T., Loos,M., and Mundel,P., 2002. Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17, 951-955.
128. Reyes,J.L., Lamas,M., Martin,D., del Carmen,N.M., Islas,S., Luna,J., Tauc,M., and Gonzalez-Mariscal,L., 2002. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* 62, 476-487.
129. Reyes,J.L., Roch-Ramel,F., and Besseghir,K., 1987. Net sodium and water movements in the newborn rabbit collecting tubule: lack of modifications by indomethacin. *Biol. Neonate* 51, 212-216.
130. Rodewald,R. and Karnovsky,M.J., 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.* 60, 423-433.

131. Roh,M.H., Liu,C.J., Laurinec,S., and Margolis,B., 2002. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J. Biol. Chem.* 277, 27501-27509.
132. Sakaguchi,T., Gu,X., Golden,H.M., Suh,E., Rhoads,D.B., and Reinecker,H.C., 2002. Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 21361-21370.
133. Sakakibara,A., Furuse,M., Saitou,M., Ando-Akatsuka,Y., and Tsukita,S., 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* 137, 1393-1401.
134. Sawada,H., Stukenbrok,H., Kerjaschki,D., and Farquhar,M.G., 1986. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am. J. Pathol.* 125, 309-318.
135. Scaglia,F., Vogel,H., Hawkins,E.P., Vladutiu,G.D., Liu,L.L., and Wong,L.J., 2003. Novel homoplasmic mutation in the mitochondrial tRNA^{Tyr} gene associated with atypical mitochondrial cytopathy presenting with focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Med. Genet. A* 123, 172-178.
136. Schmidt,C., Hocherl,K., Schweda,F., Kurtz,A., and Bucher,M., 2007. Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1072-1083.
137. Schwartz,E.J., Cara,A., Snoeck,H., Ross,M.D., Sunamoto,M., Reiser,J., Mundel,P., and Klotman,P.E., 2001. Human immunodeficiency virus-1 induces loss of contact inhibition in podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1677-1684.
138. Schwartz,W.B., Bennett,W., Curelop,S., and Bartter,F.C., 2001. A syndrome of renal sodium loss and hyponatremia probably resulting from inappropriate secretion of antidiuretic hormone. 1957. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 2860-2870.
139. Schwimmer,J.A., Markowitz,G.S., Valeri,A., and Appel,G.B., 2003. Collapsing glomerulopathy. *Semin. Nephrol.* 23, 209-218.
140. Simon,D.B., Lu,Y., Choate,K.A., Velazquez,H., Al Sabban,E., Praga,M., Casari,G., Bettinelli,A., Colussi,G., Rodriguez-Soriano,J., McCredie,D., Milford,D., Sanjad,S., and Lifton,R.P., 1999. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285, 103-106.
141. Simons,K. and Ikonen,E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

142. Simons,M., Schwarz,K., Kriz,W., Miettinen,A., Reiser,J., Mundel,P., and Holthofer,H., 2001. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am. J. Pathol.* 159, 1069-1077.
143. Smeets,B., Te Loeke,N.A., Dijkman,H.B., Steenbergen,M.L., Lensen,J.F., Begieneman,M.P., van Kuppevelt,T.H., Wetzels,J.F., and Steenbergen,E.J., 2004. The parietal epithelial cell: a key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 928-939.
144. Somlo,S. and Mundel,P., 2000. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 24, 333-335.
145. Sonoda,N., Furuse,M., Sasaki,H., Yonemura,S., Katahira,J., Horiguchi,Y., and Tsukita,S., 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 147, 195-204.
146. Soos,T.J., Meijer,L., and Nelson,P.J., 2006. CDK/GSK-3 inhibitors as a new approach for the treatment of proliferative renal diseases. *Drug News Perspect.* 19, 325-328.
147. Soriano-Rosas,J., Avila-Casado,M.C., Carrera-Gonzalez,E., Chavez-Mercado,L., Cruz-Ortiz,H., and Rojo,J., 1998. AIDS-associated nephropathy: 5-year retrospective morphologic analysis of 87 cases. *Pathol. Res. Pract.* 194, 567-570.
148. Souza-Menezes,J., Morales,M.M., Tukaye,D.N., Guggino,S.E., and Guggino,W.B., 2007. Absence of CIC5 in knockout mice leads to glycosuria, impaired renal glucose handling and low proximal tubule GLUT2 protein expression. *Cell Physiol Biochem.* 20, 455-464.
149. Stein,D.F., Ahmed,A., Sunkhara,V., and Khalbuss,W., 2001. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis with recovery of renal function: an uncommon complication of interferon therapy for hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* 46, 530-535.
150. Stokes,M.B., Davis,C.L., and Alpers,C.E., 1999. Collapsing glomerulopathy in renal allografts: a morphological pattern with diverse clinicopathologic associations. *Am. J. Kidney Dis.* 33, 658-666.
151. Takeuchi,Y., Uchida,S., Marumo,F., and Sasaki,S., 1995. Cloning, tissue distribution, and intrarenal localization of CIC chloride channels in human kidney. *Kidney Int.* 48, 1497-1503.

152. Tanawattanacharoen,S., Falk,R.J., Jennette,J.C., and Kopp,J.B., 2000. Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* 35, 1166-1174.
153. Thomas,D.B., Franceschini,N., Hogan,S.L., Ten Holder,S., Jennette,C.E., Falk,R.J., and Jennette,J.C., 2006. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int.* 69, 920-926.
154. Tomlinson,L., Boriskin,Y., McPhee,I., Holwill,S., and Rice,P., 2003. Acute cytomegalovirus infection complicated by collapsing glomerulopathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18, 187-189.
155. Toth,C.M., Pascual,M., Williams,W.W., Jr., Delmonico,F.L., Cosimi,A.B., Colvin,R.B., and Tolkoff-Rubin,N., 1998. Recurrent collapsing glomerulopathy. *Transplantation* 65, 1009-1010.
156. Tsimihodimos,V., Psychogios,N., Kakaidi,V., Bairaktari,E., and Elisaf,M., 2007. Salicylate-induced proximal tubular dysfunction. *Am. J. Kidney Dis.* 50, 463-467.
157. Tsukita,S., Furuse,M., and Itoh,M., 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285-293.
158. Turksen,K. and Troy,T.C., 2001. Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev. Dyn.* 222, 292-300.
159. Turksen,K. and Troy,T.C., 2002. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129, 1775-1784.
160. Van Itallie,C., Rahner,C., and Anderson,J.M., 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest* 107, 1319-1327.
161. Van Itallie,C.M. and Anderson,J.M., 1997. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 9), 1113-1121.
162. Vestri,S., Okamoto,M.M., de Freitas,H.S., Aparecida Dos,S.R., Nunes,M.T., Morimatsu,M., Heimann,J.C., and Machado,U.F., 2001. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. *J. Membr. Biol.* 182, 105-112.
163. Wean JT and Richards AN. Observation on the composition of glomerular urine, with particular reference to the problem of reabsorption in the renal tubule. 71[1924], 209-227. 1924. *Am J Physiol.*

Ref Type: Generic

164. Wei,R.G., Chen,S.M., Jiang,T., Jiang,X.Y., Zeng,Y., and Mo,Y., 2004. [Idiopathic collapsing glomerulopathy in children: report of two cases]. *Zhonghua Er. Ke. Za Zhi.* 42, 731-733.
165. Weiss,M.A., Daquiaoag,E., Margolin,E.G., and Pollak,V.E., 1986. Nephrotic syndrome, progressive irreversible renal failure, and glomerular "collapse": a new clinicopathologic entity? *Am. J. Kidney Dis.* 7, 20-28.
166. Wiederkehr,M.R., Rogers,T.E., and Moe,O.W., 2002. Collapsing glomerulopathy: a cause of noncardiogenic pulmonary edema. *Am. J. Kidney Dis.* 40, E10.
167. Wittchen,E.S., Haskins,J., and Stevenson,B.R., 1999. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J. Biol. Chem.* 274, 35179-35185.
168. Wong,T.Y., Chan,P.K., Leung,C.B., Szeto,C.C., Tam,J.S., and Li,P.K., 1999. Parvovirus B19 infection causing red cell aplasia in renal transplantation on tacrolimus. *Am. J. Kidney Dis.* 34, 1132-1136.
169. Yang,Y., Gubler,M.C., and Beaufile,H., 2002. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 91, 416-423.
170. Zhong,J., Zuo,Y., Ma,J., Fogo,A.B., Jolicoeur,P., Ichikawa,I., and Matsusaka,T., 2005. Expression of HIV-1 genes in podocytes alone can lead to the full spectrum of HIV-1-associated nephropathy. *Kidney Int.* 68, 1048-1060.
171. Zimmerhackl,B., Parekh,N., Kucherer,H., and Steinhausen,M., 1985. Influence of systemically applied angiotensin II on the microcirculation of glomerular capillaries in the rat. *Kidney Int.* 27, 17-24.

