

BIOLOGIA MOLECULAR EN NEFROLOGIA

Desarrollo renal: Factores de crecimiento, celularidad y transporte de sodio y potasio

J. C. Fernández Molina¹, E. Lecuona¹, E. Gallego², J. J. García Pérez² y P. Martín Vasallo¹

¹ Laboratorio de Biología del Desarrollo. Dto. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Laguna. 38206 Tenerife. ² Sección de Nefrología. Hospital Ntra. Sra. de la Candelaria. 38010 Tenerife.

El riñón de mamífero es una estructura extremadamente compleja que se ocupa, además de eliminar desechos metabólicos, de controlar la toxicidad, el volumen y la composición química del líquido extracelular. La unidad funcional, la nefrona, está formada por aproximadamente unas 10.000 células, y éstas, junto con los túbulos colectores, forman los túbulos uriníferos (de acuerdo con las convenciones anatómicas en «The Urinary system in Histology»). Se han podido diferenciar al menos 14 tipos celulares diferentes, perfectamente organizados y ubicados en los distintos segmentos de los túbulos. Esto implica que la morfogénesis renal debe estar perfectamente regulada durante el desarrollo, de tal forma que cada tipo celular en particular se sitúe en su correspondiente localización final, en relación a los demás tipos celulares a lo largo de los túbulos. Además, cada una de estas secciones debe estar correctamente alineada para conformar un túbulo normal.

Desde el punto de vista embriológico, el aparato urinario y el aparato genital provienen de un pliegue mesodérmico común, el mesodermo intermedio, que está situado a lo largo de la pared posterior de la cavidad abdominal. Además, en un período inicial, los conductos excretores de los dos sistemas desembocan en una cavidad común, la cloaca. El conducto excretor primitivo funciona como conducto urinario en principio, pero luego se transforma en el conducto genital principal.

Durante el desarrollo fetal se forman tres sistemas renales diferentes, que presentan cierta superposición: el *pronefros*, el *mesonefros* y el *metanefros*. El primero es rudimentario y no funciona; el segundo puede funcionar durante un breve tiempo al comienzo del período fetal, y el tercero forma el riñón permanente (fig. 1A).

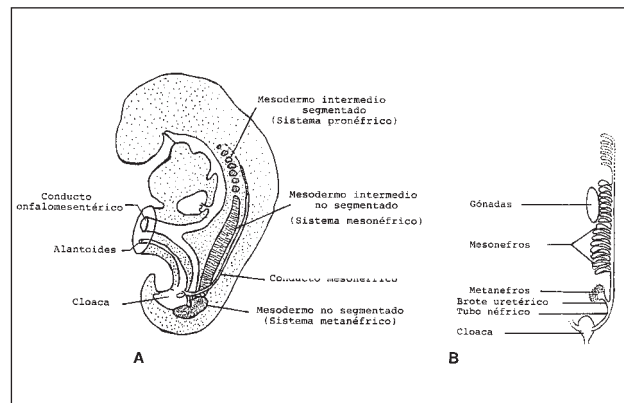


Fig. 1.—Esquema general de desarrollo renal. A) En las regiones cervical y torácica superior, el mesodermo intermedio está segmentado, mientras que en las zonas torácica inferior, lumbar y sacra forma una masa maciza no segmentada. B) El pronefros está representado por 7 a 10 grupos celulares macizos en la región cervical, y cuando degenera se forman los tubos mesonefricos hacia regiones más caudales.

Pronefros

El tubo pronefrico surge en el mesodermo, ventralmente a las somitas anteriores; la región anterior del tubo induce al mesénquima adyacente a formar los «túbulos renales pronefricos» (día 22 en humanos, 8 en ratón). En los mamíferos, a diferencia de peces y anfibios, los túbulos pronefricos y la porción anterior del conducto pronefrico degeneran; sin embargo, las porciones más caudales del tubo pronefrico persisten y llegan a convertirse en un componente clave del sistema excretor. A este tubo remanente se le conoce como tubo nefrico, conducto mesonefrico o tubo de Wolff¹.

Mesonefros

La porción media del tubo nefrico da lugar a un nuevo grupo de túbulos renales en el mesénquima adyacente, constituyendo el *mesonefros* o riñón me-

Correspondencia: Dr. Pablo Martín Vasallo.
Laboratorio de Biología del Desarrollo.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Universidad de La Laguna.
Carretera Vieja de La Esperanza, s/n.
38206 La Laguna (Tenerife), España.

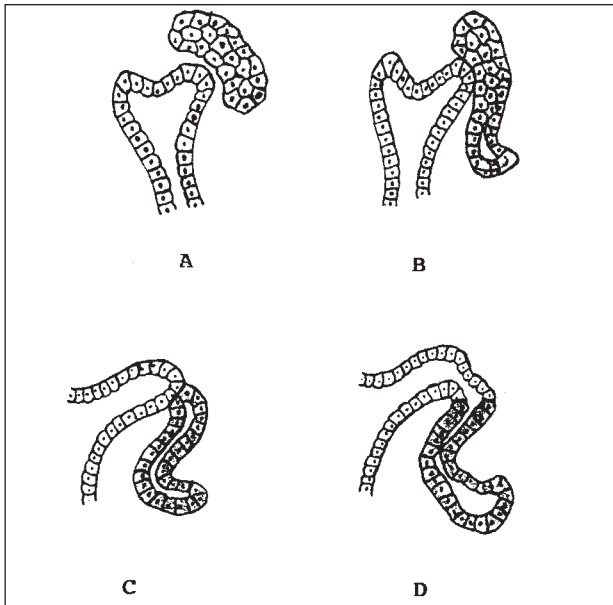


Fig. 2.—Inducción recíproca. El brote uretérico y el blastema metanéfrico se inducen mutuamente para dar lugar a la nefrona. En (A) se observa un punto de inducción, donde el brote uretérico va a entrar en contacto con un condensado celular; éste se va a dividir formando un túbulo renal primario (B). En (C) se observa claramente la cavidad generada, que en último término dará lugar a la cápsula de Bowman y los distintos túbulos renales.

sonéfrico (día 25 en humanos). Al inducirse más túbulos caudalmente, los túbulos mesonéfricos anteriores también comienzan a degradarse. En hembras de mamíferos esta regresión es completa; sin embargo, en machos, varios de estos túbulos van a convertirse en los conductos vasa deferente y conducto eferente de los testículos.

Las mesonefronas están compuestas de un glomérulo y dos segmentos que se unen a un túbulo colector; éste, a su vez, se une al conducto néfrico (conducto de Wolff). La diferenciación de los túbulos mesonéfricos tiene lugar sólo cuando el conducto mesonéfrico alcanza el nivel en el cual los túbulos se forman²⁻⁶.

Gruenwald^{7,8} demostró que al ser destruido el extremo en crecimiento del conducto néfrico, tenía lugar la formación de mesonefronas en áreas adyacentes a la perturbación producida, en las cuales no se observaba un conducto morfológicamente identificable. Este fenómeno se conoce como «formación de mesonefronas independientemente del tubo néfrico». Sin embargo, la formación de las mesonefronas era totalmente inhibida en áreas alejadas de la perturbación^{7,8}. Esto supone que al destruir el extremo del conducto néfrico quedan remanentes células del mismo, que sufren inducción independiente del conducto.

Metanefros

El riñón definitivo o *metanefros* (5.^a semana en humanos) se desarrolla a partir de un rudimento embrionario compuesto de dos capas de tejido: el brote uretérico y el mesénquima del blastema metanéfrico. Estos dos tejidos mesodérmicos interactúan y se inducen recíprocamente. Las interacciones epiteliomesenquimales se observan, además del riñón, en órganos tubulogénicos tales como hígado, pulmón, glándula mamaria y páncreas.

Se pueden distinguir tres procesos en el desarrollo del metanefros: primero, el establecimiento del blastema metanéfrico (inicialmente presente en estadio E11 en ratas) a partir del mesodermo intermediario (situado en el cordón nefrogénico); segundo, la aparición de una excrescencia y la ramificación ulterior de ésta (brote uretérico), y por último, la transformación del blastema metanéfrico (mesénquima metanefrogénico) en células epiteliales renales y la diferenciación de éstas en el corpúsculo renal y túbulos proximal y distal.

El blastema metanéfrico hace que el brote uretérico se elongue y ramifique y en el extremo de esas ramificaciones induce a las células mesenquimales a formar un agregado epitelial (compuesto por aproximadamente unas 20 células) que se van a dividir y diferenciar posteriormente en lo que va a constituir la estructura funcional renal: la nefrona.

Cada nódulo celular se elonga, dando lugar a un cuerpo en forma de «coma», que posteriormente genera un tubo en forma de «S». Las células de este epitelio se van a diferenciar y dar lugar a los diferentes tipos celulares que conformarán la cápsula, los podocitos y los túbulos distal y proximal. Las ramificaciones del brote uretérico van a dar lugar a los túbulos colectores y al uréter, la pelvis renal, los cálices mayores y menores y los túbulos colectores.

El blastema metanéfrico deriva directamente del mesodermo intermediario, que se encuentra en el cordón nefrogénico. Las células mesodérmicas residen en la parte caudal del embrión en espera del contacto con el brote uretérico, para agregarse alrededor de las terminaciones de las ramificaciones del mismo y formar el blastema metanéfrico.

Barajamos dos hipótesis alternativas para explicar el desarrollo del metanefros:

a) Las células del blastema metanéfrico toman contacto con el brote uretérico, recibiendo un estímulo de éste y diferenciándose posteriormente en los diferentes epitelios de la nefrona. Debemos aceptar que tanto blastema metanéfrico como el brote uretérico son dos tejidos no relacionados desde el punto de vista histogenético.

b) Los progenitores nefrogénicos que pueblan el blastema metanéfrico derivan del brote uretérico,

siendo la célula epitelial de éste una célula madre renal omnipotencial. Las células del brote uretérico sufren una transición epitelial-mesenquimal, dando lugar a los progenitores de la nefrona mesenquimal del blastema metanéfrico. Las células derivadas del brote uretérico se diferencian en los distintos epitelios después de la inducción⁹.

Desde los trabajos de Grobstein, Saxen y Ekblom^{10, 11-15, 5}, quedó patente que, una vez formado, el blastema metanéfrico da lugar a los distintos epitelios del riñón metanéfrico; sin embargo, esos trabajos describen únicamente a qué da lugar el blastema metanéfrico, pero no nos dice nada respecto de su procedencia.

Las nefronas metanéfricas no se forman por ramificación directa del brote uretérico. Estudios de microdissección han demostrado que la vesícula renal (la unidad estructural primaria de la metanefrona) se desarrolla sin ninguna conexión tubular al brote uretérico¹⁶. Los experimentos de Grobstein¹¹⁻¹⁵ han documentado que el blastema metanéfrico, definido como una población de células mesenquimales desgajadas del brote uretérico, da lugar, en último término, a las nefronas (fig. 3).

El metanefros humano se hace funcional durante la segunda mitad de la gestación. La orina se emite hacia la cavidad amniótica y se mezcla con el líquido amniótico, éste es ingerido por el feto y llega al intestino, donde es absorbido hacia la sangre, retornando de nuevo a los riñones, para volver al líquido amniótico, manteniendo así su ciclo, aunque durante la vida intrauterina los riñones no tienen a su cargo la excreción de productos de desecho, ya que ésta es función de la placenta.

TRANSICION MESENQUIMAL-EPITELIAL

Aunque la investigación del desarrollo renal durante los últimos treinta años se ha centrado en las transformaciones experimentadas por el blastema metanéfrico durante su diferenciación (inducida) en el epitelio de la nefrona, las señales bioquímicas que

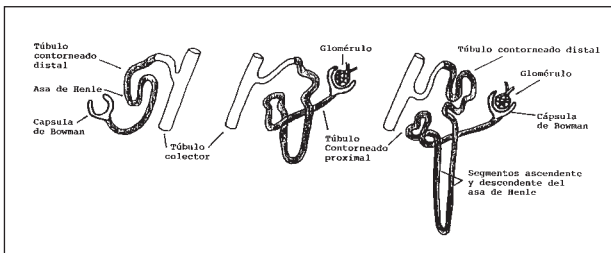


Fig. 3.—Esquema del desarrollo de una nefrona metanéfrica a partir de la inducción.

dirigen este proceso permanecen desconocidas en su mayor parte.

El desarrollo renal de los mamíferos requiere la conversión de las células del mesénquima mesodérmico en células epiteliales polarizadas¹⁷. Las células progenitoras funcionan durante el desarrollo como células pluripotenciales que dan lugar a una progenie con los distintos fenotipos epiteliales que forman el epitelio tubular renal. La proliferación e inducción de los nefroblastos se continúa con la diferenciación en un epitelio altamente segmentado como son los túbulos renales, para dar lugar a la nefrona.

La conversión de células mesenquimales en un epitelio es un proceso poco frecuente en la organogénesis y tiene lugar en el riñón, las gónadas y el mesotelio. Los cambios a que se ven sometidas pueden implicar una remodelación sustancial de la matriz extracelular de las células del mesénquima metanefrogénico. El mesénquima no inducido secreta una matriz compuesta principalmente por fibronectina y colágeno tipos I y III. Después de la inducción estas proteínas desaparecen y son reemplazadas por una lámina basal compuesta de laminina, colágeno tipo IV y proteoglicanos^{18, 19}. La invasión del espacio mesenquimal por el brote uretérico da lugar a la aparición de marcadores celulares epiteliales tales como: colágeno tipo IV, laminina (cadena α) y ovomurulina, así como la desaparición de proteínas mesenquimales tales como vimentina y N-CAM.

El citoesqueleto cambia del de una típica célula mesenquimal a una epitelial; de esta forma las células mesenquimales laxamente unidas pasan a tener una unión más estrecha y de forma claramente polarizada, con una lámina basal. Previamente a estos cambios el blastema metanéfrico inducido sintetiza el proteoglicano de membrana Syndecan; éste es importante para la formación del epitelio y su síntesis es determinante para la agregación de las células mesenquimales.

APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO RENAL

El número de células maduras en un tejido depende del balance entre la mitosis y la apoptosis (muerte celular programada). Evidentemente este balance debe estar perfectamente programado y regulado. Durante la morfogénesis de algunos tejidos, las células se generan en exceso; sin embargo, rápidamente mueren y sólo unas pocas van a dar lugar al tejido maduro^{20, 21}. En el riñón, las células que permanecen alrededor del mesénquima inducido muestran características morfológicas y bioquímicas de muerte celular programada.

En embriones E14-E19 aún se encuentran islotes de células apoptóticas entre las nefronas en desarrollo.

llo, indicando así la importancia de este fenómeno en el desarrollo renal^{22, 23}.

FACTORES INDUCTORES DEL DESARROLLO RENAL

Aunque el IGF-II y el receptor de baja afinidad p75 de NGF parecen regular el desarrollo renal en un sistema en cultivo *in vitro*, los experimentos de disrupción génica en el ratón han añadido dudas más que aclarar la relevancia de estos datos *in vivo*.

Hasta ahora no se conocía ni la sustancia inductora sintetizada por el brote uretérico ni el receptor en el mesénquima ni los genes que se activan por la inducción. Se ha identificado un gen (WT-1) que parece ser un buen candidato como detonante para el inicio de la secuencia de transformación mesénquima epitelial. Se trata de un gen que se identificó ausente o mutado en el cáncer de células embrionarias renales (tumor de Wilms). Este gen se encuentra en el cromosoma 11 (11p13) y codifica una proteína cuyo extremo amino-terminal es rico en prolina y glutamina, además de cuatro dedos de zinc (cis)₂-(his)₂ en el extremo carboxilo-terminal²⁴⁻²⁶. Hay evidencia de que el WT-1 regula la expresión de IGF2²⁷ y PDGFA²⁸ y puede estar directamente implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. Estudios de hibridación *in situ* han demostrado que es selectivamente expresado en el blastema metanéfrico, cuerpos en forma de «S» y epitelio glomerular durante el desarrollo embrionario y fetal²⁹ (fig. 2).

Los patrones de expresión de WT-1 encontrados³⁰ señalan un importante papel de este gen no sólo durante el desarrollo urogenital, sino durante la vida fetal y postnatal. Además, usando técnicas de microscopía láser se sublocalizó al WT-1 en el núcleo, independientemente del tipo celular y el estadio de desarrollo.

Recientemente se ha concluido que el crecimiento inicial del brote uretérico es dependiente de una señal del blastema metanéfrico y que el WT-1 es indispensable para su expresión³¹⁻³³. Para determinar el efecto de una mutación en el WT-1 se determinó si la deficiencia en éste afecta la expresión del Pax-2 (un posible factor regulador presente durante el desarrollo renal, miembro de la familia Pax)³⁴ que se encuentra en el tubo de Wolff y el brote uretérico, así como en el mesénquima metanéfrico, cuando comienza a condensarse alrededor de este último^{35, 36}. Se obtuvieron secciones de embriones E11 mutados y «wild type» para el WT-1 y se incubaron con un anticuerpo policlonal para el Pax-2; se obtuvo una

señal en el tubo de Wolff tanto en el mutante como en el «wild type»; sin embargo, no se detectó expresión en el blastema metanéfrico del mutante, lo cual indica la necesidad de WT-1 para la expresión de Pax-2.

MADURACION RENAL: FACTORES IMPLICADOS

Una vez completa la nefrogénesis, tanto la perfusión renal como la filtración glomerular se incrementan³⁷ y además la capacidad de conservar y excretar sodio aumenta espectacularmente^{38, 39}. Aunque la hemodinámica sistémica y los cambios hormonales juegan un papel primordial en los fenómenos madurativos, son los factores locales vasoactivos los que están estrechamente involucrados en el proceso.

Dentro de los tres sistemas vasoactivos intrarrenales más importantes en la maduración renal se encuentran: renina-angiotensina, prostaglandinas y kalikreína-kininas.

Se sabe que el riñón adulto expresa todos los componentes del sistema K-K⁴⁰⁻⁴² y que las kininas participan en la regulación de la presión sanguínea⁴³, la hemodinámica renal⁴⁴ y la excreción de sodio y agua^{45, 46}.

Las kalikreínas son serín-proteasas que actúan rompiendo enlaces peptídicos en su substrato natural: kininógeno. Se ha demostrado que el riñón en desarrollo expresa kininógeno, dando lugar a péptidos vasoactivos⁴⁷. En el adulto, la kalikreína es sintetizada y almacenada en las células de los túbulos distales^{40, 42}, sucediendo de igual forma en el riñón en desarrollo⁴⁸. La relación mRNA/proteína para la kalikreína aumenta de cuatro a seis veces en la transición de neonato a adulto, sugiriendo que la expresión está regulada durante el desarrollo.

Como corolario podemos verter las siguientes afirmaciones:

a) Kalikreína y su mRNA se expresan en el riñón metanéfrico en desarrollo.

b) Los niveles de kalikreína y su mRNA se incrementan con la maduración.

c) Hay una correlación temporal entre los cambios espaciales en la kalikreína, intrarrenal y la activación de la síntesis de kalikreína.

Además de los hallazgos de la inmunohistoquímica y de la hibridación *in situ* se pudo confirmar que, al igual que en el adulto, es el túbulo distal el lugar de síntesis y almacenamiento de la kalikreína en el riñón en desarrollo. Finalmente, se observó que la distribución de kalikreína sigue el mismo patrón centrífugo que la maduración morfológica y funcional de la nefrona^{48, 49}.

FACTORES DE CRECIMIENTO: IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO

Los factores de crecimiento regulan el crecimiento y el desarrollo durante la embriogénesis. Se puede observar una relación causa-efecto entre la expresión de los factores de crecimiento y el crecimiento renal. Dentro de la gran familia de factores de crecimiento se conocen, con una acción perfectamente caracterizada en el riñón, a IGFs (factor de crecimiento similar a insulina), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF- α (factor de crecimiento transformante), TGF- β , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), NGF (factor de crecimiento nervioso) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos).

IGF-I, IGF-II

El túbulo colector es la principal fuente de IGF-I en el riñón adulto⁵⁰, aunque también se sintetiza en células mesangiales glomerulares en cultivo^{51, 52}. Las proteínas que se unen a IGF se sintetizan en el mismo riñón^{53, 54}. Los receptores para IGF-I están localizados en glomérulo^{51, 52, 55} y en la membrana basolateral de las células de los túbulos proximales. IGF-II es algo más pequeño que IGF-I y circula unido a proteínas transportadoras que se unen a IGF-I. Como quiera que se aprecian bajos niveles de IGF-II mRNA en todos los tejidos, excepto en tejido neural; además, en roedores, el nivel cae bruscamente al nacimiento, se ha postulado que IGF-II tiene funciones predominantemente como factor de crecimiento fetal. Sin embargo, en humanos no se aprecia esa caída en la expresión, lo cual es compatible con que IGF-II juegue un papel en la fisiología del adulto⁵⁶. Los receptores de IGF-II se encuentran en glomérulo⁵⁷ y en las membranas basolateral y «brush border» de las células de los túbulos proximales⁵⁸.

EGF/TGF- α

Son miembros de la misma familia de factores de crecimiento y se piensa que actúan sobre el mismo receptor de membrana. Los niveles más altos de EGF se encuentran en las glándulas salivares de mamíferos adultos y en riñones. El EGF deriva de un precursor (prepro-EGF)^{59, 60}. Las proteínas precursoras, que son activas *per se*, contienen regiones hidrofóbicas, que los unen a la membrana plasmática. Las porciones con la proteína madura se localizan extracelularmente^{61, 62}. Se ha encontrado inmunoreactividad en la rama estrecha del asa ascendente de Henle y en el

túbulo contorneado distal de ratón^{63, 64}, así como de su precursor y de su mRNA.

TGF- β

Esta familia de polipéptidos incluye un grupo de proteínas diméricas homólogas y un grupo de polipéptidos con una menor afinidad. Cada miembro del grupo es inicialmente sintetizado como un precursor que posee actividad intrínseca. Las acciones biológicas de los TGF- β son muy variadas, incluyendo estimulación o inhibición de la proliferación, bloqueo o iniciación de la diferenciación, estimulación de la formación de la matriz extracelular y promoción o inhibición de la migración celular. Dentro de los efectos más relevantes se encuentra la estimulación de la formación de la matriz extracelular. Todas estas acciones sugieren que las funciones de TGF- β se caracterizan por un extensa remodelación tisular^{65, 66}. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha localizado al TGF- β 1 en el túbulo distal del riñón de ratón⁶⁷; sin embargo, las mayores cantidades de péptido biológicamente activo se han extraído del glomérulo de riñón; además, mRNA de TGF- β 1 y TGF- β 2 se detectan también en el glomérulo, lo cual es consistente con la síntesis a este nivel⁶⁸.

PDGF

Es un potente mitógeno para células del tejido conectivo y se piensa que puede jugar un papel en la cicatrización cuando es liberado de las plaquetas en el lugar de la herida. El PDGF maduro es un dímero de dos cadenas (A y B), tanto una como otra se sintetizan como precursor más grande. En el riñón, tanto las células epiteliales renales⁶⁹ como las mesangiales⁷⁰ sintetizan PDGF. La producción del mRNA en células mesangiales humanas puede ser inducida por el propio PDGF, así como EGF y TGF- α ⁷¹. Las células en cultivo de tumor de Wilms y las células de riñón fetal humano producen PDGF, siendo esto compatible con su papel en el desarrollo fetal normal y en la transformación neoplásica de células renales⁷².

FGF

Es una gran familia de péptidos que unen heparina, con propiedades mitogénicas y angiogénicas. Se han aislado dos FGF: uno con propiedades ácidas y otro con propiedades básicas; ambos exhiben una homología mayor del 50 %^{73, 74}. Ambos FGF poseen dos dominios potenciales para fijar heparina. En la

expresión de FGF se ha detectado una gran cantidad de células normales y transformadas *in vitro*. Tanto la forma ácida como la básica se han aislado del riñón de bovinos^{75,76}.

NGF

La familia de factores de crecimiento nervioso incluyen a NGF, BDNF (brain-derived neurotropic factor) y NT-3 (neurotrofina 3) y son importantes para el desarrollo y mantenimiento de las neuronas^{77,78}. Se ha detectado la presencia de receptores para NGF en el glomérulo 77 y RNAm para NT-3 en el riñón⁷⁸.

Hay evidencia de que el túbulo colector⁷⁹ y las células parenquimatosas de la vejiga urinaria⁸⁰ pueden sintetizar NGF. Se ha detectado inmunoreactividad para NGF en el ratón en el citoplasma apical y perinuclear de las células del túbulo colector, aunque las células intercalares no muestran inmunoreactividad⁷⁹.

Sabemos que el riñón está innervado desde el plexo aórtico y renal con fibras nerviosas aferentes y vasomotoras, lo cual está asociado con la vascularización. Por otro lado, el glomérulo carece de innervación; sin embargo, es fuertemente positivo para la p75^{NGFR} durante la morfogénesis y coexpresa altos niveles de NCAM (Lackie y cols., 1990), de tal forma que la expresión de p75^{NGFR} parece estar más directamente relacionada con la expresión de moléculas de adhesión celular y la morfogénesis epitelial que la innervación nerviosa. Este tipo de coexpresión está ampliamente representado en tejidos en desarrollo.

HGF

Es producido por las células de origen mesenquimal, tales como las células de Kupffer en el hígado y fibroblastos del bazo de embrión⁸¹. Los receptores para HGF están presentes en la membrana plasmática de células renales. Se ha localizado mRNA de HGF en las células endoteliales renales que están localizadas entre los túbulos renales⁸².

MANEJO RENAL DEL SODIO Y POTASIO

Hay una gran cantidad de trabajos que confirman la escasa capacidad del riñón del neonato para regular el balance de sodio; sin embargo, pocos de estos trabajos se han hecho en condiciones fisiológicas. Aunque el GFR es desproporcionadamente bajo comparado con el del adulto, la capacidad limitada para excretar sodio no es explicable únicamente por

este factor. Aproximadamente un 40 % del sodio filtrado se reabsorbe en la nefrona proximal, a diferencia del adulto, donde se llega a un 60 %^{83,84}. En los muy prematuros, más del 60 % del sodio filtrado llega a las zonas más distales de la nefrona, donde se reabsorbe o se excreta en la orina⁸⁵.

Hay dos características perfectamente establecidas del metabolismo del sodio en el desarrollo: primero, la existencia de un balance positivo, y segundo, la capacidad limitada de excretar una sobrecarga. El riñón en desarrollo es capaz de retener sodio eficazmente, lo cual es una condición esencial para el crecimiento. El primero y cuantitativamente más importante paso en la reabsorción del sodio tiene lugar en el túbulo proximal.

Las nefronas yuxtamedulares parecen tener una mayor capacidad que las superficiales para la reabsorción de sodio^{86,87}. Se ha postulado que una redistribución del flujo entre esas dos poblaciones de nefronas podría servir como mecanismo regulador para la excreción del sodio^{88,89}. De acuerdo con esto, un mejor desarrollo de las nefronas yuxtamedulares en el neonato^{90,91} puede constituir una forma de conservar sodio. Hay que tener en cuenta que durante la nefrogénesis, la diferenciación funcional y morfológica tiene lugar de forma centrífuga, de tal forma que las nefronas localizadas en la región externa de la corteza son las menos diferenciadas morfológicamente y sólo una pequeña proporción de éstas están irrigadas por flujo sanguíneo. Por el contrario, las nefronas yuxtamedulares poseen un polo vascular y están perfundidas en una gran proporción. El transporte incrementado de sodio tiene lugar en los segmentos de la nefrona situados más allá del túbulo proximal, aparentemente bajo la estimulación por altas concentraciones de aldosterona plasmática⁹².

La retención de sodio durante el desarrollo es consecuencia directa de una reabsorción incrementada más que de unos bajos niveles de filtración glomerular. El transporte aumentado tiene lugar en segmentos de nefrona situados más allá del túbulo proximal y posiblemente bajo la estimulación de altas concentraciones de aldosterona. Este mecanismo adaptativo puede explicarse por el hecho de que las crías medran en condiciones de baja ingesta de sodio, tal y como sucede durante el amamantamiento. El sistema renina-angiotensina-aldosterona no puede inhibirse totalmente por la expansión del volumen intravascular y esto puede explicar la respuesta natriurética pobre del animal y los humanos en desarrollo a la infusión de soluciones salinas o albuminoideas.

La concentración de potasio depende de dos factores: el balance externo de potasio, que regula el contenido corporal de este catión, y el balance interno de potasio, que regula la distribución del mismo en-

tre los espacios intra y extracelular. Hay que tener presente que más del 98 % del potasio está contenido en el espacio intracelular.

Aunque la hipercaliemia se ha atribuido a la inmadurez de la función renal, probablemente representa un desbalance agudo de la distribución corporal de potasio con salida masiva del espacio intracelular hacia el extracelular. Contrariamente a lo que sucede con el sodio, no hay un umbral renal para el potasio, por lo que éste continúa excretándose en la orina incluso en estados de depleción.

El 65 % del potasio del filtrado glomerular es absorbido en los túbulos proximales y otro 25 % lo es en las asas de Henle. Cuando el sodio es transportado desde el citoplasma de la célula epitelial tubular distal hacia el interior del líquido peritubular, el potasio es transportado hacia el interior de la célula epitelial. Posteriormente el potasio difunde desde la célula hacia la luz tubular en función de su alta concentración en la célula epitelial. Además de la secreción de potasio por los túbulos distales y colectores, hay una reabsorción activa continua de potasio a través de la membrana luminal de la célula epitelial hacia el interior de la célula.

LA BOMBA DE SODIO (Na, K-ATPasa)

La Na, K-ATPasa es un enzima de membrana plasmática de las células de mamífero que transporta, contra gradiente, dos iones de potasio hacia el interior de la célula y tres iones sodio hacia el exterior. La energía usada para ese cotransporte-antiporte la obtiene de la hidrólisis del fosfato gamma del ATP. La bomba de sodio se encarga de mantener la estabilidad osmótica celular, además de un medio interno rico en K⁺, requisito imprescindible para el correcto funcionamiento de una gran cantidad de enzimas.

De acuerdo con su papel fisiológico, el enzima se distribuye de una forma polarizada dentro del dominio basolateral de la membrana⁹⁴. En epitelios especializados, tal como es el caso de los túbulos renales entre otros, se encuentra involucrada en los procesos de excreción y reabsorción. En este epitelio, una monocapa celular separa la luz tubular del flujo sanguíneo y su función primordial es regular el transporte vectorial de agua y solutos entre ambos sistemas.

En el túbulo contorneado proximal, los canales de sodio y los sistemas de cotransporte están localizados en la membrana apical para captar rápidamente el sodio, que, una vez dentro, es bombeado a la sangre por la bomba de sodio de la membrana basolateral. Una localización incorrecta de la Na,K-ATPasa en la membrana apical provoca patologías renales del tipo de la enfermedad poliquística o daños isquémicos.

Además, la Na,K-ATPasa posee una relevante significación farmacológica, relacionada con su carácter como «receptor» de los glucósidos cardiotónicos que al fijarse específicamente a ésta inhiben su actividad enzimática.

Está compuesta de dos subunidades: una subunidad α con funciones catalíticas, de trasvase de iones sodio, potasio, magnesio, calcio y protones, así como de la fijación de ATP y fosfato inorgánico. Además de las anteriores, también es el receptor de los glucósidos cardiotónicos. La subunidad β , que, aunque siendo necesario para el correcto funcionamiento del enzima, no parece estar directamente implicado en la actividad «bomba de sodio», pero sí en el ensamblaje del sistema en la membrana. (Para más información remitirse a ref. 93.)

Podemos recapitular y dar una visión general de la fisiología de la bomba de sodio diciendo que se encuentra relacionada con la regulación de la tensión arterial, el contenido catiónico de los líquidos corporales y la función de la barrera hematoencefálica.

LA BOMBA DE SODIO DURANTE EL DESARROLLO

En la literatura encontramos una cierta confusión en cuanto al tiempo de aparición de esta enzima durante el desarrollo embrionario. Borland y Vrobrodt^{95, 96} sólo pudieron detectarla en los estadios de mórula y blastociste. Powers y Tupper⁹⁷ llegaron a la conclusión de que en los oocitos y embriones bicelulares se encontraba Na,K-ATPasa activa. Los experimentos de Andrew y cols.⁹⁸ demuestran que el primer estadio en que la subunidad catalítica de la Na,K-ATPasa se expresa abundantemente es la mórula tardía (84 h. post-hCG); sin embargo, no se encontró en los primeros cuatro ciclos celulares.

El riñón es un tejido muy rico en Na,K-ATPasa; sin embargo, no está uniformemente distribuida debido a la marcada heterogeneidad estructural y funcional. El contenido relativo en las tres divisiones anatómicas renales se desglosa como sigue: la proporción más alta se da en la médula externa, intermedia en el córtex y mucho menor en la médula interna-papila⁹⁹. Evidentemente estas medidas están determinadas por la abundancia relativa de la Na,K-ATPasa en los distintos segmentos de la nefrona.

Se ha medido la actividad de la Na,K-ATPasa en secciones individuales de la nefrona en distintas especies (conejo, rata, ratón, y humanos). Las actividades fueron comparables, siendo mayor en la rata¹⁰⁰. La mayor cantidad se mide en la rama gruesa del asa ascendente de Henle y en el túbulo contorneado distal¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. Se aprecia una considerable cantidad en el túbulo contorneado proximal. En baja cantidad se

observa en el túbulo colector y en la pars recta^{100, 102, 104, 105} y es apenas detectable en la rama delgada del asa de Henle¹⁰⁶.

El incremento espectacular de Na,K-ATPasa previamente a la cavitación y su localización en el margen basolateral del trofoectodermo mural pone en nuestras manos argumentos para atribuirle un papel crucial en la cavitación, fenómeno que es corroborado por el hecho de ser aquella bloqueada por ouabaína, inhibidor específico de la Na,K-ATPasa¹⁰⁷ (ver fig. 2).

TIPOS CELULARES RENALES

Epitelio tubular proximal. Las células del túbulo proximal poseen numerosas mitocondrias capaces de producir la ingente cantidad de energía necesaria para sostener los procesos de transporte activo. El 65 % de todos los procesos de absorción y secreción tienen lugar en los túbulos proximales. Estas células tienen un borde ciliado muy extenso, que mira hacia la luz, con lo cual se aumenta de forma considerable la superficie, además de un laberinto extenso de las vías intercelulares y basales a través de las cuales pueden fluir gran cantidad de líquidos.

Segmento delgado del asa de Henle. Como su nombre indica, se trata de un epitelio muy delgado, provisto de un sistema muy extenso de poros entre las células epiteliales, de tal forma que la permeabilidad es muy grande. Las células no poseen bordes ciliados y contienen pocas mitocondrias, indicando una intensidad mínima de actividad metabólica. Por todo ello, el segmento delgado del asa de Henle parece adaptado para la simple difusión de sustancias a través de sus paredes.

Segmento grueso del asa de Henle y epitelio tubular distal. La última porción de la rama ascendente del asa de Henle o segmento grueso tiene células epiteliales gruesas, con características físicas casi idénticas a las de las células tubulares distales. Estas células son similares a las células de los túbulos proximales, excepto que sólo poseen un borde ciliado rudimentario y tienen una zona oclusora mucho más cerrada cuando las células se unen una a otra. Las células están específicamente adaptadas para el transporte activo de sodio contra gradientes elevados de concentración y eléctricos. El epitelio es poco permeable al agua y casi impermeable a la urea. Hay una gran cantidad de mitocondrias situadas muy cerca de la membrana basal de la célula epitelial.

Epitelio del túbulo colector. El túbulo colector está formado por dos segmentos importantes similares por sus características físicas, pero netamente diferentes por sus características funcionales: la porción cortical y la porción medular. Ambas poseen células epitelia-

les de forma casi cuboide, con superficies lisas y muy pocas mitocondrias. Como es en los túbulos colectores donde la orina se vuelve muy concentrada o muy diluida, muy ácida o muy básica, el epitelio de éstos parece estar bien dispuesto para resistir estas características extremas del líquido tubular. La permeabilidad del epitelio para el agua en ambas porciones del túbulo colector depende de la concentración de ADH en sangre; si ésta es alta, el túbulo se vuelve muy permeable; por el contrario, si es baja, se reabsorbe muy poca agua y casi toda pasa a la orina. Podemos encontrar dos tipos celulares estructural y funcionalmente distintos: células principales y células intercaladas, las cuales también podemos encontrar en el túbulo colector. Hay dos poblaciones diferenciadas de células intercaladas: células tipo A y tipo B; las primeras están involucradas en la secreción ácida y en la reabsorción de bicarbonato, mientras que las segundas lo están en la secreción de bicarbonato¹⁰⁸.

LOCALIZACION RENAL DE LAS DISTINTAS SUBUNIDADES DE Na,K-ATPasa

Hasta el momento, en mamíferos, se han descrito cuatro isoformas distintas de la subunidad α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) y dos de la subunidad β ($\beta 1$ y $\beta 2$). Mientras que las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ se han detectado habitualmente en riñón, no en vano se ha considerado siempre como un modelo de tejido rico en $\alpha 1$ ¹⁰⁹; no así ha ocurrido para la presencia de $\alpha 2$ ¹¹⁰⁻¹¹² y $\alpha 3$ ^{111, 113}; otros autores han detectado de forma inconstante cantidades variables de $\alpha 2$ ¹¹³⁻¹¹⁵, $\alpha 3$ ^{110, 112, 115} o $\beta 2$ ^{115, 116}. En los trabajos más recientes¹¹⁵ se describe una expresión abundante de $\alpha 1$ y $\beta 1$, pero sólo una discreta y no uniforme distribución de $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\beta 2$.

En un estudio reciente, y usando hibridación *in situ* con sondas cRNA marcadas con digoxigenina, se han detectado los mRNA para $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ y $\beta 2$ en distintos tipos celulares a lo largo de la nefronas. Se genera así un mapa de la distribución celular de las distintas isoformas de la bomba de sodio. Aunque en determinados segmentos es evidente la coexpresión de varias subunidades α y β , se aprecian diferencias significativas en la expresión en distintos tipos celulares¹¹⁷ (fig. 4).

Los resultados indican que los mRNA para las cinco subunidades de la Na,K-ATPasa se expresan de forma distinta en los distintos y específicos tipos celulares del glomérulo y en diferentes segmentos de nefronas del córtex, médula externa y médula interna del riñón de rata. Aunque en determinados segmentos es evidente la coexpresión de varias subunidades α y β , se aprecian diferencias significativas en la ex-

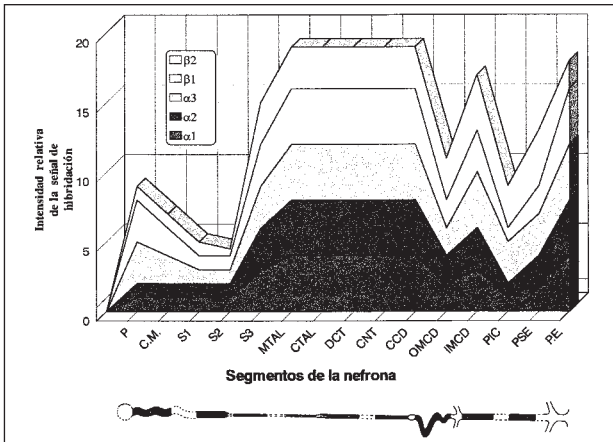


Fig. 4.—Intensidad relativa de la señal de hibridación «in situ» para las distintas isoformas de la Na,K-ATPasa en secciones discretas renales. (Los valores son meramente indicativos del patrón de intensidad de marcaje de una isoforma específica, pero no representa valores comparativos de abundancia absoluta de mRNA de una isoforma frente a otra.) PIC (células papilares intersticiales), S1, S2, S3 (segmentos del túbulo proximal), MTAL, CTAL (asa estrecha ascendente medular y cortical), DCT (túbulo contorneado distal), CNT (túbulo colector), CCD, OMCD, IMCD (túbulo colector porciones cortical, médula externa y médula interna), PSE (epitelio pélvico superficial), EP (epitelio pélvico).

presión en distintos tipos celulares. La subunidad α -3 es preferentemente expresada en células glomerulares y parietales, células mesangiales glomerulares y extraglomerulares, el OMCD y las células intersticiales papilares. La subunidad β 1 es más abundante en células epiteliales glomerulares y el epitelio de la pelvis renal. Posteriormente se ha llevado a cabo un estudio usando dot blot y experimentos de protección a RNasa en la caracterización de la expresión en estado estable de las distintas isoformas y, por otro lado, la RT-PCR conjuntamente con la microdissección y secuenciación en la determinación definitiva de la localización por segmentos de los mRNA de la Na,K-ATPasa¹¹⁸. De esta forma se obtuvieron mediante microdissección: glomérulos, túbulo contorneado proximal, asa delgada ascendente de Henle medular, túbulo colector cortical y túbulo colector de médula interna. Los resultados, que confirman anteriores trabajos¹¹⁷, demuestran que las distintas isoformas α y β se expresan de forma diferencial en los segmentos comprometidos con el transporte transepitelial de sodio y potasio.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Armando Torres la lectura crítica de este artículo. Los autores están financiados por el proyecto FIS93/0831.

Bibliografía

1. Gilbert SF: *Developmental Biology*, 3.^a edición. Ed. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, MA, USA, 1991.
2. Ekblom P: *Renal Development in the Kidney: Physiology and Pathophysiology*, ed. DW Seldin, G Giebisch, pp. 475-501. New York, Raven, 1992.
3. Moore KL y Persand TVN: *The developing Human: Clinically Oriented Embriology*, pp 265-303. Philadelphia: Saunders, 1993.
4. Potter EL: *Normal and Abnormal Development of the Kidney*, pp. 1-79. Chicago: Year Book Medical, 1972.
5. Saxen L: *Organogenesis of the Kidney*, ed. PN Barlow, PB Green, CC Wylie. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1987.
6. Torrey TW: Morphogenesis of the vertebrate Kidney. En *Organogenesis*. ed. RL Dehahn, Hursprung. pp. 559-79. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1965.
7. Gruenwald P: Experiments on the distribution and activation of nephrogenic potency in the embryonic mesenchime. *Physiol Zool* 15:396-409, 1942.
8. Gruenwald P: Stimulation of nephrogenic tissues by normal and abnormal inductors. *Anat Rec* 86:321-339, 1943.
9. Herzlinger D, Cohen D y Abramson R: Nephrogenic progenitors delaminate from the ureteric bud. *JCell Sci*. En prensa, 1993.
10. Ekblom P: *Renal Development in the Kidney: Physiology and Pathophysiology*, ed. DW Seldin, G Giebisch, pp. 475-501. New York, Raven, 1992.
11. Grobstein C: Inductive interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature* 172:869-871, 1955.
12. Grobstein C: Inductive epitheliomesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse. *Science* 118:52-55, 1953.
13. Grobstein C: Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. *JExp Zool* 130:319-340, 1955.
14. Grobstein C: Trans filter induction of the mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp Cell Res* 10:424-440, 1956.
15. Grobstein C: Some transmission characteristics of the tubule-inducing influence on mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp Cell Res* 13:575-587, 1957.
16. Potter EL: *Normal and Abnormal Development of the Kidney*, pp. 179. Chicago: Year Book Medical, 1972.
17. Ekblom P: Developmentally regulated conversion of mesenchime to epithelium. *FASEB (Fed Am Soc Exp Biol)* J3:2141-2160, 1989.
18. Ekblom P: Formation of basement membranes in the embryonic kidney: an immunohistological study. *JCell Biol* 91:1-10, 1981.
19. Mounier F, Foidart JM, Gubler MC, Beziau A y Lacoste M: Distribution of extracellular matrix glycoproteins during normal development of human kidney. *Lab Invest* 54:394-401, 1986.
20. Ellis RE, J Yuan y Horvitz RH: Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7:663-698, 1991.
21. Wyllie AH, Rose KA, Morris RG, Steel CM, Foster E y Spandios DA: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306, 1980.
22. Koseki C, Herzlinger D y Al-Awqati Q: Apoptosis in metanephric development. *JCell Biol* 119:1327-1333, 1992.
23. Ortiz-Arduan A y Neilson EG: Apoptotic cell death in renal disease. *Nefrología* 14:391-407, 1994.
24. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T y Housman DE: Isolation, characterization, and expression of the murine Wimls' tumor gene (WT-1) during kidney development. *Mol Cell Biol* 11:1707-1712, 1991.
25. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeager H, Lewis WH, Jones C y Housman DE: Isolation and characterization of a zinc finger polipeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520, 1990.

26. Morris JF, Madden SL, Tournay OE, Cook DM, Sukhatme VP y Rauscher F III: Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT-1 Wilms' tumor locus. *Oncogene* 6:2339-2348, 1991.
27. Drummond IA, Madden SL, Rohwer NP, Bell GI, Sukhatme VP y Rauscher F: Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Science* 257:674-678, 1992.
28. Gashler AL, Bouthron DT, Madden SL, Rauscher III FJ, Collins T y Sukhatme VP: Human platelet derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10984-10988, 1992.
29. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, Van Heiningen V y Hastie N: The candidate Wilms tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346:194-197, 1990.
30. Mundios S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A y Zabel B: Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119:1329-1341, 1993.
31. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D y Jaenisch R: WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691, 1993.
32. Burrow C y Wilson PD: A putative tumor-secreted growth factor activity required for primary culture of human nephroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6066-6070, 1993.
33. Rupprecht HD, Drummond IA, Madden SL, Rauscher FJ III y Sukhatme VP: The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *JBiol Chem* 269:6198-6202, 1994.
34. Gruss P y Walther C: Pax in development. *Cell* 69:719-722, 1992.
35. Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO y Gruss P: Pax-2, a new murine paired box containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109:787-795, 1990.
36. Dressler GR y Douglass EC: Pax-2 is a DNA binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms' Tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1179-1183, 1992.
37. Gruskin AB, Edelmann CM Jr y Yuan S: Maturational changes in renal blood flow in piglets. *Pediatr Res* 4:7-13, 1970.
38. Aperia A y Binder G: Distal tubular sodium reabsorption in the developing rat kidney. *Am JPhysiol* 240: (Renal fluid Electrolyte Physiol 9) F:487-F491, 1981.
39. Merlet-Benichou C y De Roufignac C: Renal clearance studies in fetal and young guinea pigs: effect of salt loading. *Am JPhysiol* 232:F178-185, 1977.
40. Barajas L, Powers K, Carretero OA, Scicli AG e Inagami T: Immunocytochemical localization of renin and Kalikrein in the rat renal cortex. *Kidney Int* 29:965-970, 1991.
41. Proud D, Perkins M, Pierce J, Yates KN, Highet PF, Herring PL, Mangkornkanok/Mark M, Bahu R, Carone F y Pisano JJ: Characterization and localization of human renal kininogen. *JBiol Chem* 256:10634-10639, 1985.
42. Xiong W, Chao L y Chao J: Renal kallikrein mRNA localization by in situ hybridization. *Kidney Int* 35:1324-1329.
43. Benetos AH, Gavras JM, Stewart RJ, Vavrek S, Hatinoğlu y Gavras I: Vasodepressor role of endogenous bradykinin assessed by a bradykinin antagonist. *Hypertension Dallas* 8:971-974, 1986.
44. Fenoy FJ, Scicli G, Carretero O y Roman RJ: Effect of an angiotensin II and a kinin receptor antagonist on the renal hemodynamic response to captopryl. *Hypertension Dallas* 17:1038-1044, 1991.
45. Kauker ML: Bradykinin action on the efflux of luminal 22Na in the rat nephron. *JPharmacol Exp Ther* 214:119-123, 1980.
46. Willis LR: Effect of bradykinin on the renal medullary osmotic gradient in water diuresis. *Eur JPharmacol* 45:173-183, 1977.
47. El-Dahr SS, Sipp S y Chao J: Ontogeny of the intrarenal kallikrein-kinin system. Evidence for developmental regulation (Abstract). *Pediatr Res* 29:341, 1991.
48. El-Dahr SS y Chao J: Spatial and temporal expression of kallikrein and its mRNA during nephron maturation. *Am JPhysiol* 262:F705-F711, 1992.
49. Wines DR, Brady JM, Pritchett DB, Roberts J y MacDonald RJ: Organization and expression of the rat kallikrein gene family. *JBiol Chem* 264:7653-7662, 1989.
50. Bortz JD, Rotwein P, DeVol D, Betchel PJ, Hansen VA y cols.: Focal expression of insulin like growth factor I in rat kidney collecting duct. *Am JPhysiol* 107:811-819, 1988.
51. Aron DC, Rozenzweig J y Abboud HE: Synthesis and binding of insulin-like growth factor I by human glomerular mesangial cells. *Am JPhysiol* 254:C411-416, 1989.
52. Conti FG, Striker LJ, Elliot SJ, Andreani D y Striker GE: Synthesis and release of insulin-like growth factor I by mesangial cells in culture. *Am JPhysiol* 255:F1214-1219, 1988.
53. Albiston AL y Herington AC: Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* 130:497-502, 1992.
54. Kobayashi S, Clemmons DR y Ventatachalam MA: Colocalization of insulin-like growth factor binding protein with insulin like growth factor 1. *Am JPhysiol* 261:F22-28, 1991.
55. Arqvist HJ, Ballaermann BJ y King GL: Receptors for and effects of insulin and IGF-I in rat glomerular mesangial cells. *Am JPhysiol* 254:C411-416, 1988.
56. Hammerman MR: The growth hormone insulin like growth factor axis in kidney. *Am JPhysiol* 257:F503-514, 1989.
57. Haskell JF, Pillion DJ y Meezan E: Specific, high affinity receptors for insulin-like growth factor II in the rat kidney glomerulus. *Endocrinology* 123:774-780, 1988.
58. Hammerman MR y Rogers S: Distribution of IGF receptors in the plasma membrane of proximal tubular cells. *Am JPhysiol* 253:F841-847, 1987.
59. Gray AT, Dull Jy Ullrich A: Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature Lond* 303:722-725, 1983.
60. Scott JM, Urdea M, Quiroga R, Sánchez-Pescador N, Fong M, Selby WJ, Rutter y Bell GI: Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science Wash DC* 221:236-240, 1983.
61. Carpenter G y Cohen S: Epidermal Growth factor. *JBiol Chem* 265:7709-12, 1990.
62. Massagué J: Transforming growth factor α . *JBiol Chem* 265:21393-96, 1990.
63. Salido EC, Barajas L, Lechago J, Laborde NP y Fischer DA: Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse kidney. *JHistochem Cytochem* 34:1155-1160, 1986.
64. Salido EC, Fischer DA y Barajas L: Immunoelectron microscopy of epidermal growth factor in mouse kidney. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 96:105-113, 1986.
65. Barnard JA, Lyons RM y Moses HL: The cell biology of transforming growth factor β Biochim. *Biophys Acta* 1032:79-87, 1990.
66. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P y cols.: Transforming growth factor β multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc London Ser B* 327:145-54, 1990.
67. Thomson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB y cols.: Expression of transforming growth factor β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *JCell Biol* 108:661-69, 1989.

68. MacKay K, Kondaiah P, Danielpour D, Austin HA III y Brown PD: Expression of transforming growth factor β 1 y β 2 in rat glomeruli. *Kidney Int* 38:1095-1100, 1990.
69. Kartha S, Bradham DM, Grotendorst GR y Toback FG: Kidney epithelial cells express c-cis protooncogene and secrete PDGF-like protein. *Am JPhysiol* 255:F800-806, 1988.
70. Shultz PJ, DiCorleto PE, Silver BJ y Abboud HE: Mesangial cells express PDGF mRNAs and proliferate in response to PDGF. *Am JPhysiol* 255:F674-684, 1988.
71. Silver B, Jaffer FE y Abboud H: Platelet derived growth factor synthesis in mesangial cells: induction by multiple peptide mitogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1056-1050, 1989.
72. Fraizer GE, Bowen-Pope DF y Vogel AM: Production of platelet derived growth factor by cultured Wilms' tumor cells and fetal kidney cells. *JCell Physiol* 133:169-174, 1987.
73. Burgess WH y Maciag T: The heparina binding (Fibroblast) Growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58:575-606, 1989.
74. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M y cols.: Molecular cloning and expression of human hepatocytes growth factor. *Nature* 342:440-443, 1989.
75. Baird A, Esch F, Bohlen P, Ling N y Gospodarowicz D: Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. *Reg Peptides* 12:201-213, 1985.
76. Gautschki-Sova P, Jang Z, Frater-Schroder M y Bohlen P: Acidic fibroblast growth factor is present in nonneural tissue: isolation and chemical characterization from bovine kidney. *Biochemistry* 26:5844-5847, 1987.
77. Chesa PG, Rettig WJ, Thomson TM, Old LJ y Melamed MR: Immunohistochemical analysis of nerve growth factor receptor expression in normal and malignant human tissues. *Histochem Cytochem* 36:383-389, 1988.
78. Maisnierre PC, Belluscio L, Squinto S, Furth ME y cols.: Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247:1446-1451, 1990.
79. Barajas L, Salido EC, Laborde NP y Fischer DA: Nerve growth factor immunoreactivity in mouse kidney: an immunoelectron microscopic study. *JNeurosci Res* 18:418-424, 1987.
80. Steers WD, Kolbeck S, Creedon D y Tuttle JB: Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. *JClin Invest* 88:1709-1715, 1991.
81. Tashiro K, Hagiya M, Nichizawa T, Seki T, Shimonishi M y cols.: Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3200-3204, 1990.
82. Nagaïke M, Hirao S, Tajima H, Noji S, Taniguchi S y cols.: Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. *JBiol Chem* 268:22781-84, 1991.
83. Merlet-Benichou C y De Rouffignac C: Renal clearance studies in fetal and young guinea pigs: effect of salt loading. *Am JPhysiol* 232:F178, 1977.
84. Schoeman MJ y Spitzer A: The effect of intravascular volume expansion on proximal tubular reabsorption. *Proc Soc Exper Biol Med* 165:319, 1980.
85. Kleinman LI: Renal sodium reabsorption during saline loading and distal blockade in newborn dogs. *Am JPhysiol* 228:1403, 1970.
86. Aschinberg LC, Goldsmith DI, Olbing H y cols.: Neonatal changes in renal blood flow distribution in puppies. *Am JPhysiol* 228:1453, 1970.
87. Olbing H, Blaufox MD, Aschinberg LC, Silkans GI, Berstein J, Spitzer A, Edelman CM Jr y Liang TCW: Postnatal changes in renal glomerular blood flow distribution in puppies. *JClin Invest* 52:2885-2895, 1973.
88. Horster M, Kemler BJ y Valtin H: Intracortical distribution of number and volume of glomeruli during postnatal maturation in the dog. *JClin Invest* 50:796-800, 1971.
89. MacDonald MS y Emery JL: The late intrauterine and postnatal development of human renal glomeruli. *JAnat* 93:331, 1978.
90. Arant BS Jr: Developmental patterns of renal functional maturation compared in the human neonate. *JPediatr* 92:705-712, 1978.
91. Engle WD y Arant BS Jr: Renal handling of β 2 microglobulina in the human neonate. *Kidney Int* 24:358-363, 1983.
92. Spitzer A: The role of the kidney in sodium homeostasis during maturation. *Kidney Int* 21:539-545, 1983.
93. Sweadner KJ: Isozymes of the Na,K-ATPase. *Bioch Biophys Acta* 988:185-220, 1989.
94. Caplan MJ, Anderson HC, Palade GE y Jamieson JD: Intracellular sorting and polarized cell surface delivery of Na,K-ATPase an endogenous component of MDCK cell basolateral plasma membranes. *Cell* 46:623-631, 1986.
95. Vorbrod A, Konwinski M, Solter D y Koprowski H: Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 55:117-134, 1977.
96. Borland RM: Transport processes in the mammalian blastocyst. En *Development in mammals* (MH Johnson, Ed.), vol. 1, pp 31-37. North-Holland, New York, 1977.
97. Powers RD y Tupper JF: Developmental changes in membrane transport and permeability in the early mouse embryo. *Dev Biol* 56:306-315, 1977.
98. Andrew JW y Gerald MK: Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na,K-ATPase during mouse embryogenesis, 1987.
99. Hendler ED, Torretti Jy Epstein FH: The distribution of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase in medulla and cortex of the kidney. *JClin Invest* 50:1329-1337, 1971.
100. Katz AI, Doucet A y Morel F: Na,K-ATPase activity along the rabbit, rat and mouse nephron. *Am JPhysiol* 237:F114-F120, 1979.
101. Schmidt U y Dubach UC: Activity of Na,K-stimulated adenosine-triphosphatase in the rat nephron. *Pflügers Arch* 306:219-226, 1969.
102. Garg LC, Knepper MA y Burg MB: Mineralcorticoid effects on Na,K-ATPase in individual nephron segments. *Am JPhysiol* 240:F536-544, 1981.
103. Schmidt U y Horster M: Na,K-activated ATPase: activity maturation in rabbit nephron segments dissected in vitro. *Am JPhysiol* 233:F55-60, 1977.
104. Schmidt U y Horster M: Sodium potassium activated adenosine triphosphatase: methodology for cuantification in microdissected renal segments from freeze-dried and fresh tissue, in *Methods in pharmacology*, edited by Martínez-Maldonado M. New York, Plenum, vol. 4b, pp 259-256, 1978.
105. El Mernissi G y Doucet A: Quantitation of [3 H]ouabain binding and turnover of Na,K-ATPase along the rabbit nephron. *Am JPhysiol* 247:F158-167, 1984.
106. Katz AI: Distribution and function of classes of ATPases along the nephron. *Kidney Int* 29:21-31, 1986.
107. Watson AJ y Kidder GM: Immunofluorescence assesment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K-ATPase during mouse embriogenesis. *Dev Biol* 126:80-90, 1988.
108. Kim J, Tisher CG y Masden KM: Diferentiation of intercalated cells in developing rat kidney: an immunohistochemical study. *Am JPhysiol* 266:F977-990, 1994.
109. Barlet-Bas C, Arystarkhova E, Cheval L, Marsy S, Sweadner K, Modyanov N y Alain Doucet: Are there several isoforms of Na,K-ATPase a subunit in the rabbit kidney? *JBiol Chem* 266:11512-11515, 1993.
110. Herrera VLM, Emanuel JR, Ruiz-Opazo N, Levenson R y Nadal-Ginard B: Three differentially expressed Na,K-ATPase α subunit isoforms: structural and functional implications. *J Cell Biol* 105:1855-1865, 1987.

111. Orłowski Jy Lingrel JB: Tissue specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α -isoform and β subunit mRNAs. *JBiol Chem* 263:10436-10442, 1988.
112. Sverdlov, ED, Akopyanz NS, Petrukhin KE, Broude NE, Monastyrskaya GS y Moddyanov NN: Na,K-ATPase: tissue specific expression of genes coding for α -subunit in diverse human tissues. *FEBS Lett* 239:65-68, 1988.
113. Young RM y Lingrel JB: Tissue distribution of mRNAs encoding the α isoforms and β subunit of rat Na,K-ATPase. *Biochem. Biophys Res Commun* 145:52-58, 1987.
114. Emanuel JR, Garets S, Stone L y Levenson R: Differential expression of Na,K-ATPase α and β subunit mRNAs in rat tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 8:9030-9034, 1987.
115. Farman N, Country N, Logvinenko N, Blot-Chaubaud M, Borbouze R y Bonvalet JP: Adrenalectomy reduces α -1 and not β 1 Na,K-ATPase mRNA expression in rat distal nephron. *Am J Physiol* 263 (*Cell Physiol* 32):C810-817, 1992.
116. Martín-Vasallo P, Dackowski W, Emanuel JR y Levenson R: Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase β subunit. Primary structure and tissue specific expression. *JBiol Chem* 264:4613-4618, 1989.
117. Ahn KY, Masden KM, Tisher CC y Kone BC: Differential expression and cellular distribution of mRNAs encoding α and β isoforms of Na,K-ATPase in rat kidney. *Am J Physiol* 265:F792-801, 1993.
118. Clapp WL, Bowman P, Shaw GS, Patel P y Kone BC: Segmental localization of mRNAs encoding Na,K-ATPase α and β subunit isoforms in rat kidney using RT-PCR. *Kidney Int* 46:627-638, 1994.