

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FACULTAD DE MEDICINA



MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESPECIALIZACIÓN EN FISIOLÓGÍA

**“DETERMINACIÓN DE ACUAPORINAS RENALES EN
CONEJOS CON OBSTRUCCIÓN EXPERIMENTAL DE
AMBOS URÉTERES”**

POR:

CÁNDIDO ELÍAS AMADOR FERNÁNDEZ, MD.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2007

15989

Obs del Autor

21 FEB 2000

ST

**“DETERMINACIÓN DE ACUAPORINAS RENALES EN CONEJOS CON
OBSTRUCCIÓN EXPERIMENTAL DE AMBOS URÉTERES”**

Con amor y dedicación a Marleny, Jesús, Airam, Alfredo Alejandro y Alberto Elías, por tener fe en mí y sobre todo paciencia por tantas horas de tolerancia, al no poder compartir con ustedes durante todo este tiempo, debido a mis estudios de post-grado y finalmente por el tiempo empleado en la elaboración de nuestra tesis de maestría.

Agradecimiento primero a nuestro creador Dios, a mis padres Cándido y Elaida, a mis hermanos Lourdes, Ada, Nicolas y Alexis, a mis compañeros de maestría sobre todo a Ivón, Juan, Lili, Bechi y a mi asesora de tesis profesora Delia de Garrido Además agradezco al Jurado Calificador profesoras Blasina de Camargo y Oris de Calvo por sus recomendaciones para mejorar el contenido de esta tesis de maestría.

Agradecimiento especial para el Dr Rolando Milord, la Dra. Idalmis de Torraza y las Licenciadas Jin Liu y Vielka Anderson por todo su apoyo en la elaboración de esta tesis

Mil gracias a todos y que Dios los llene de bendiciones

ÍNDICE GENERAL

	Página
I RESUMEN ESPAÑOL E INGLÉS	1-2
II INTRODUCCIÓN	3-7
III FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	8-61
IV JUSTIFICACIÓN	62-63
V OBJETIVOS	64
5 1 Objetivos generales	64
5 2 Objetivos específicos	64
VI HIPÓTESIS	65
6 1 Hipótesis Nula	65
6 2 Hipótesis Alternativa	65
VII METODOLOGÍA	66
7 1 Población de referencia	66
7.2 Tipo de estudio	66
7 3 Tamaño de la muestra	66
7 4 Criterios de selección	67
7 4 (a) Criterios de inclusión	67
7 4 (b) Criterio de exclusión	67
7 5 Materiales	67-68
7 6 Preparación de conejos	68
7 6 (a) Alimentación	68
7 6 (b) Anestesia	69
7 6 (c) Técnica de ligaduras de uréteres	69
7 6 (d) Recolección de muestras	69
7 7 Técnica de inmunohistoquímica	70-74
7 8 Análisis de datos	74-75
VIII RESULTADOS	76-87
IX DISCUSIÓN	88-90
X CONCLUSIONES	91-92
XI RECOMENDACIONES	93-94
XII BIBLIOGRAFÍA	95-99

XIII ANEXOS
13 1 Figuras

100
100-108

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro I Sitios de expresión de las once isoformas de acuaporinas	34
Cuadro II Isoformas renales de acuaporinas	35
Cuadro III Desórdenes en el balance de agua asociado a disregulación en las acuaporinas	42
Cuadro IV Parámetros funcionales renales en conejos con y sin obstrucción bilateral de uréteres	46
Cuadro V Comparación de los efectos hemodinámicos glomerulares entre la obstrucción unilateral (OUU) y bilateral de los uréteres (OBU)	53
Cuadro VI Diferencias en la función tubular después de 24 horas de liberada la ligadura en la obstrucción unilateral (OUU) y bilateral (OBU)	56
Cuadro VII Peso en kilogramos en los conejos del grupo control y experimental	76
Cuadro VIII Reactividad del marcador anti-AQP1, anti- AQP2 y anti-AQP4 de acuerdo a la localización renal de las AQP en los conejos del grupo control y experimental	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Anatomía regional desde la corteza a la médula renal	9
Figura 2 Las tres funciones básicas de la nefrona	13
Figura 3 Mecanismos de transporte de los solutos en los diferentes segmentos del nefrón.	19
Figura 4 Transporte de NaCl y difusión pasiva de agua a lo largo de la nefrona durante antidiuresis y diuresis acuosa.	22
Figura 5 Esquema bidimensional topológico de la acuaporina I	30
Figura 6 Estructura cristalográfica de la acuaporina I	31
Figura 7 Regulación de AQP2 en las células principales de los túbulos colectores corticales y medulares interno	43
Figura 8 Descripción de los anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP1	100
Figura 9 Descripción de los anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP2	101
Figura 10 Descripción de los anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP4	102
Figura 11 Población de estudio conejos Albinos New Zealand	103
Figura 12 Materiales utilizados	104
Figura 13 Rasurado de oreja y exposición de la vena marginal en el conejo	104
Figura 14 Incisión vía abordaje abdominal	105
Figura 15 Exposición del uréter antes de su ligadura con seda 00	105
Figura 16 Cierre de herida quirúrgica, luego de la ligadura de uréteres en los conejos del grupo experimental	106
Figura 17 Extracción renal a las 72 horas de la ligadura en el grupo Experimental	106
Figura 18 Vista macroscópica de la hidronefrosis a las 72 horas de ligadura en el conejo del grupo experimental	107

	Página
Figura 19 Muestras de los riñones extraídos en el grupo experimental al cumplirse las 72 horas de la ligadura.	107
Figura 20 Frascos de anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP proporcionados por CHEMICON INTERNATIONAL.	108
Figura 21 Portaobjetos con el montaje de la técnica de inmunohistoquímica en los riñones de los conejos del grupo control y experimental	108
Figura 22 Vista macroscópica de la corteza, médula y papila renal en el conejo control (sin ligadura)	77
Figura 23 Hidronefrosis con cambios isquémicos en riñón de conejos del grupo experimental (con ligadura de 72 horas)	78
Figura 24 Histología comparativa entre el grupo control y experimental a nivel de la corteza renal con un poder en microscopia de luz de 10x.	79
Figura 25 Histología comparativa entre el grupo control y experimental a nivel de la corteza renal con un poder en microscopia de luz de 20x.	80
Figura 26 Histología comparativa entre el grupo control y experimental a nivel de la médula renal con un poder por microscopia de luz de 10x.	81
Figura 27. Lesión tubular aguda a nivel de la médula renal en los conejos del grupo experimental, con un poder por microscopia de luz de 40x	82
Figura 28 Reactividad inmunohistoquímica del marcador anti-AQP1 en la corteza renal de conejos a nivel del túbulo proximal en el grupo control y el grupo experimental, con un poder por microscopia de luz de 40x.	83
Figura 29 Reactividad inmunohistoquímica del marcador anti-AQP2 en la médula renal de conejos a nivel de los túbulos colector corticales en el grupo control y experimental, con un poder por microscopia de luz de 40x.	84
Figura 30 Reactividad inmunohistoquímica del marcador anti-AQP4 en la médula renal de conejos a nivel de los túbulos colectores medulares, en el grupo control y experimental Con un poder por microscopia de luz de 40x.	85

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA TESIS

AQP = ACUAPORINAS

AQP1 = ACUAPORINA UNO

AQP2 = ACUAPORINA DOS

AQP4 = ACUAPORINA CUATRO

TFG = TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR

FSR = FLUJO SANGUÍNEO RENAL

FPR = FLUJO PLASMÁTICO RENAL

Cap glom. = CAPILARES GLOMERULAR

Cap perit = CAPILAR PERITUBULAR

P_{cg} = PRESIÓN HIDROSTÁTICA CAPILAR GLOMERULAR

P_{cb} = PRESIÓN HIDROSTÁTICA CAPSULA DE BOWMAN

Π_{cg} = PRESIÓN ONCÓTICA CAPILAR GLOMERULAR

Π_{cb} = PRESIÓN ONCÓTICA CAPSULA DE BOWMAN

L_p = PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA GLOMERULAR

S = ÁREA DE SUPERFICIE DE LOS CAPILARES GLOMERULARES

s = COEFICIENTE DE REFLEXIÓN

MA = MEMBRANA APICAL

MB = MEMBRANA BASOLATERAL

TP = TÚBULO PROXIMAL

TCC = TÚBULO COLECTOR CORTICAL

TCM = TÚBULO COLECTOR MEDULAR

PTH = HORMONA PARATIROIDEA

OBU = OBSTRUCCIÓN BILATERAL URETERAL

OBU = OBSTRUCCIÓN UNILATERAL URETERAL

I RESUMEN

“DETERMINACIÓN DE ACUAPORINAS RENALES EN CONEJOS CON OBSTRUCCIÓN EXPERIMENTAL DE AMBOS URÉTERES”

Es de gran interés en los últimos años el papel que han tomado los canales de agua llamados ACUAPORINAS en la regulación del medio interno. Este trabajo de investigación se centra en la identificación en la expresión de las acuaporinas y su papel en la regulación del metabolismo del agua. Se utilizaron como animales experimentales conejos albinos Newzeland del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá. A los conejos se les realizó una lesión renal bilateral con ligadura de ambos uréteres con el fin de producir hidronefrosis bilateral y observar en forma cualitativa y semicuantitativa si se reduce la expresión renal de acuaporinas en los riñones de estos conejos. Se utilizó la técnica de anticuerpos policlonales contra acuaporinas como marcadores para determinar la densidad de estos canales de agua en los riñones de los conejos. Mediante la técnica de microscopia de luz se evaluaron los cambios estructurales en los riñones de estos conejos y se compararon los resultados con conejos controles a los cuales no se le ligaron los uréteres. Este estudio es de trascendental importancia por la gran utilidad clínica que resulto en la manipulación biofisiofarmacológica en la expresión de estos canales de agua.

En nuestro medio, Panamá, no se ha realizado ningún estudio para evaluar la expresión de estos canales de agua, ni en situaciones fisiológicas, ni fisiopatológicas, ni mucho menos en la práctica clínica. Al hacer las biopsias renales en Panamá no se realizan técnicas biomoleculares para determinar el papel de las acuaporinas en diferentes situaciones fisiopatológicas. Estamos seguros que este trabajo de investigación, dejara un aporte de gran valor a la comunidad científica, tanto a nivel de las ciencias básicas, como para el especialista clínico y sobre todo, el poder aplicar esta técnica, en nuestro medio, Panamá.

SUMMARY

“DETERMINATION OF RENAL AQUAPORIN IN RABBITS WITH EXPERIMENTAL BILATERAL URETERAL OBSTRUCTION”

It is of great interest to observe the role undertaken in the last years by the water channels called AQUAPORIN in the regulation of the “milieu intérieur” This investigation is centered on the role of the aquaporin in the regulation of water metabolism. Albinic rabbits from the bioterium of the Faculty of Medicine of the University of Panama were used as experimental subjects. The rabbits were subjected to bilateral renal lesion by ligation of both ureters with the purpose of causing bilateral hydronephrosis and to observe qualitatively and semi quantitatively if the renal expression of aquaporins is produced in the kidneys of these rabbits. The technique used was the polyclonal antibodies against aquaporins as markers to evaluate the density of these channels of water in the kidneys of rabbits. Through the technique of light microscope the structural changes in the kidneys of the rabbits were evaluated and the results compared with control rabbits that did not have their ureters ligated. This study is of transcendental importance due to the great clinical utility resulted in the biopharmacologic manipulation in the expression of these water channels.

In our media, Panama, no studies have been conducted to evaluate the expression of these water channels, on physiologic or physiopathological circumstances, hardly less in the clinical practice. When renal biopsies are done in Panama, no biomolecular techniques are done to determine the role of aquaporins in different physiopathological situations. We are positive that this research project will be of great value to the scientific community, both at the basic science level and for the clinical specialist, and mainly enabling the application of this technique in our media, Panama.

II INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la fisiología renal es de vital importancia para el fisiólogo y el médico clínico. Con respecto a la regulación del medio interno, los conceptos impartidos por Walter Cannon y Claude Bernard están vigentes en el presente. Según Claude Bernard todas las actividades del organismo son dependientes de un medio interno constante y el medio interno es aquel líquido que rodea a las células. Según Walter Cannon el medio interno es regulado en márgenes estrechos y esta constancia del medio interno la llamó HOMEOSTASIS Garrido (2002) El término homeostasis implica una variedad de procesos dentro de un organismo viviente con el fin de mantener el equilibrio fisiológico. Una de las funciones homeostáticas más crítica es la regulación de la composición química de los fluidos corporales. Esta función, en los vertebrados, es realizada primordialmente por los riñones.

El mantenimiento del balance hídrico implica igualar la ganancia y la pérdida de agua. La principal fuente de ganancia de agua en la mayoría de los mamíferos se encuentra en la dieta, también se forma agua como resultado de la oxidación de las moléculas de nutrientes. Se pierde agua en las heces y en la orina, por la respiración y a través de la piel. Aunque la cantidad de agua absorbida y eliminada puede variar notablemente de un animal a otro y también de un momento a otro en el mismo animal, el volumen de agua del cuerpo permanece constante. Los principales compartimientos donde se distribuye el agua corporal son el plasma, los fluidos intersticiales (incluyendo a la linfa), y los fluidos intracelulares. El peso de un ser humano adulto promedio es de 70 Kg y de este peso aproximadamente el 60% es agua, es decir tenemos

aproximadamente 42 litros de agua si nuestro peso fuera de 70 Kg, a su vez, el agua corporal total se distribuye de la siguiente manera en un 40% (28 litros) a nivel intracelular, un 20% (14 litros) extracelular y de este 20%, el 15% se encuentra en el líquido intersticial, y el restante 5% se distribuye en un 45% en el espacio intravascular y el restante 05% en los líquidos transcelulares (líquido intraocular, líquido peritoneal, espacio sinovial, pericardio y los líquidos contenidos en órganos huecos, sistema respiratorio, genitourinario y digestivo) Rose (2002)

El principal factor que determina el intercambio de agua entre los compartimientos del cuerpo es el potencial osmótico que se relaciona directamente con la presión osmótica que es la presión necesaria que impide la emigración del solvente La presión osmótica causa movimiento de fluido en ambas direcciones simultáneamente La variación de concentración de solutos causa mayor movimiento en una dirección, sin anular el movimiento en la otra dirección Peñalba y Garrido (2007)

El riñón participa en la homeostasis a través de sus tres funciones básicas

- 1) Reguladora regula la osmolaridad, el volumen, la composición y el pH del fluido extracelular, mediante la excreción de agua, sodio, potasio, cloro, bicarbonato, hidrogeniones, fosfatos y otros solutos
- 2) Excretora excretan productos finales del metabolismo como urea, creatinina, ácido úrico, productos finales de la hemoglobina, hormonas, sustancias químicas exógenas (drogas) y sus metabolitos
- 3) Endocrina sintetizan y liberan renina, eritropoyetina, prostaglandinas, bradiquininas, calcitriol, urodilatina, dopamina y endotelina.

Garrido (op cit)

La unidad funcional del riñón es el nefrón. Cada nefrón está formado por un túbulo largo, unido a un bulbo cerrado, la cápsula de Bowman, que contiene un racimo de

capilares retorcidos, el glomérulo. Cuando el filtrado efectúa su largo viaje a través del nefrón, las células del túbulo renal reabsorben selectivamente moléculas del filtrado y secretan otras moléculas en él. El exceso de agua y los productos de desecho son excretados del cuerpo como orina. La conservación de agua en los mamíferos es posible por la capacidad de excretar una orina que es hipertónica en relación con la sangre, debido al mecanismo de contracorriente que ocurre en las asas de Henle.

La función del nefrón es influida por hormonas, sobre todo, a nivel del nefrón distal donde actúan hormonas claves como la aldosterona y la hormona antidiurética. En este trabajo mencionaremos en el marco teórico el rol de la hormona antidiurética (ADH) y su relación con los canales de agua, sobre todo, con la acuaporina 2 (AQP2).

Es interesante conocer como el riñón participa en la regulación del medio interno al igual que el sistema neuroendocrino y el sistema cardiovascular, a su vez estos mantienen una perfecta sincronización que mantiene el equilibrio del medio interno, que rodea a las células. Este líquido que rodea a las células se llama LEC (líquido extracelular) y para mantener todos los componentes del líquido extracelular en equilibrio se requiere de un gran trabajo renal. El conocimiento de cómo el sistema renal regula los diferentes parámetros homeostáticos renales es de gran interés histórico, desde mediciones macroscópicas realizadas en el pasado (cualitativas – cuantitativas) hasta evaluaciones microscópicas, terminando con evaluaciones biomoleculares sobre los diferentes mecanismos de regulación de volumen y del medio interno por el riñón. Hay incremento en el número de estos estudios, en los últimos años. Podemos mencionar como ejemplo el aporte de la Biología Molecular con el descubrimiento de las acuaporinas (AQP) por Peter Agre, que respondió la incógnita de cómo el agua penetra las células epiteliales con uniones estrechas (tight

junction) y lo hace a través de estos canales de agua llamados acuaporinas en presencia de hormona antidiurética (ADH) Agre (1993), Knepper (1994), Nielsen y Agre (1995), Selding (2000) Es sorprendente en la actualidad que el conocimiento de las diferentes disregulaciones a través de estos canales de agua intervienen en una gran variedad de patologías como 1) cirrosis hepática 2) síndrome nefrótico 3) falla cardíaca congestiva. 4) diabetes insípida nefrogénica. Selding (sup cit), Bedford (2003), Lee et al (2003), Costello-Boering et al (2003), Fernández (2003), Gold (2005) La diabetes insípida nefrogénica es explicada por tres posibles mecanismos el primero por cambios estructurales en el mismo canal de agua, el segundo por alteración en su vía de traslocación a la membrana apical y por último el tercer mecanismo es por anomalía en el mismo receptor V2 de la hormona anti diurética(ADH) Nielsen (2000)

En el año 2002 se realizó, en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, un trabajo experimental sobre la mediciones de parámetros renales en conejos con ligadura bilateral de ambos uréteres demostrando un síndrome poliúrico en estos conejos y se correlacionaron con el daño tubular ocasionado por la isquemia de las células tubulares, secundario al aumento de la presión intratubular debido a la ligadura de ambos uréteres Amador (2002) De este trabajo surgió la idea de investigar acerca de la expresión de las acuaporinas renales, ya que estos cambios en los parámetros renales se podrían deber a la disminución de la expresión renal de los canales de agua “ACUAPORINAS”

AMADOR, C E , GARRIDO, D R. 2002 Determinación de parámetros renales en conejos con obstrucción experimental de ambos uréteres Trabajo realizado en la asignatura de Fisiología Avanzada del programa de maestría. Universidad de Panamá, Panamá, Panamá, 24 págs

En este trabajo de investigación se evaluará la expresión de estos canales de agua, en conejos con ligadura de ambos uréteres (grupo experimental) y en conejos sin ligaduras (grupo control) para responder las siguientes interrogantes

¿Hay disminución en la expresión de las acuaporinas renales en los conejos con ligadura de los uréteres?

¿Hay correlación entre los hallazgos histopatológicos y estructurales obtenidos mediante microscopia de luz en los conejos con ligadura bilateral de uréteres?

¿Cuál es la diferencia observada entre los conejos con ligaduras y sin ligaduras de ambos uréteres con respecto a la expresión de las acuaporinas (AQP)?

Finalmente, el papel central de esta tesis es el realizar el montaje de la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales contra las AQP1, AQP2 y AQP4, para poder contestar las interrogantes, anteriormente enunciadas

III FUNDAMENTO TEÓRICO

En un corte histológico de riñón se observan diferencias regionales, en su porción más externa, esta la corteza renal, donde se localizan los glomérulos, túbulos proximales, distales, segmento conector y colector cortical. Una región más interna que es la médula renal en donde se encuentran las asas de Henle y los túbulos colectores medulares (Fig 1)

La unidad funcional del riñón es el nefrón y hay aproximadamente 1 – 1.3 millones de nefrones en los riñones humanos. De acuerdo a la localización del glomérulo en la corteza renal los mamíferos tienen tres tipos de nefrones. Rose (op cit)

- 1) Nefrones Superficiales o Corticales. Representan el 85% de las nefronas. Tienen sus glomérulos ubicados en las zonas externas de la corteza. Se caracterizan por tener asa de Henle cortas que terminan en las capas más externas de la médula renal.
- 2) Nefrones Intermedios Corticales. Los glomérulos se localizan en la zona intermedia de la corteza renal.
- 3) Nefrones Yuxtamedulares. Los glomérulos están en la parte más interna de la corteza, localizados en la unión de la corteza y la médula renal. Estas nefronas tienen sus asas de Henle largas que profundizan en la médula renal y llegan hasta la papila renal. Importantes en el mecanismo de contracorriente y la concentración de la orina.

Figura 1

Anatomía regional: desde la corteza renal a la médula renal.

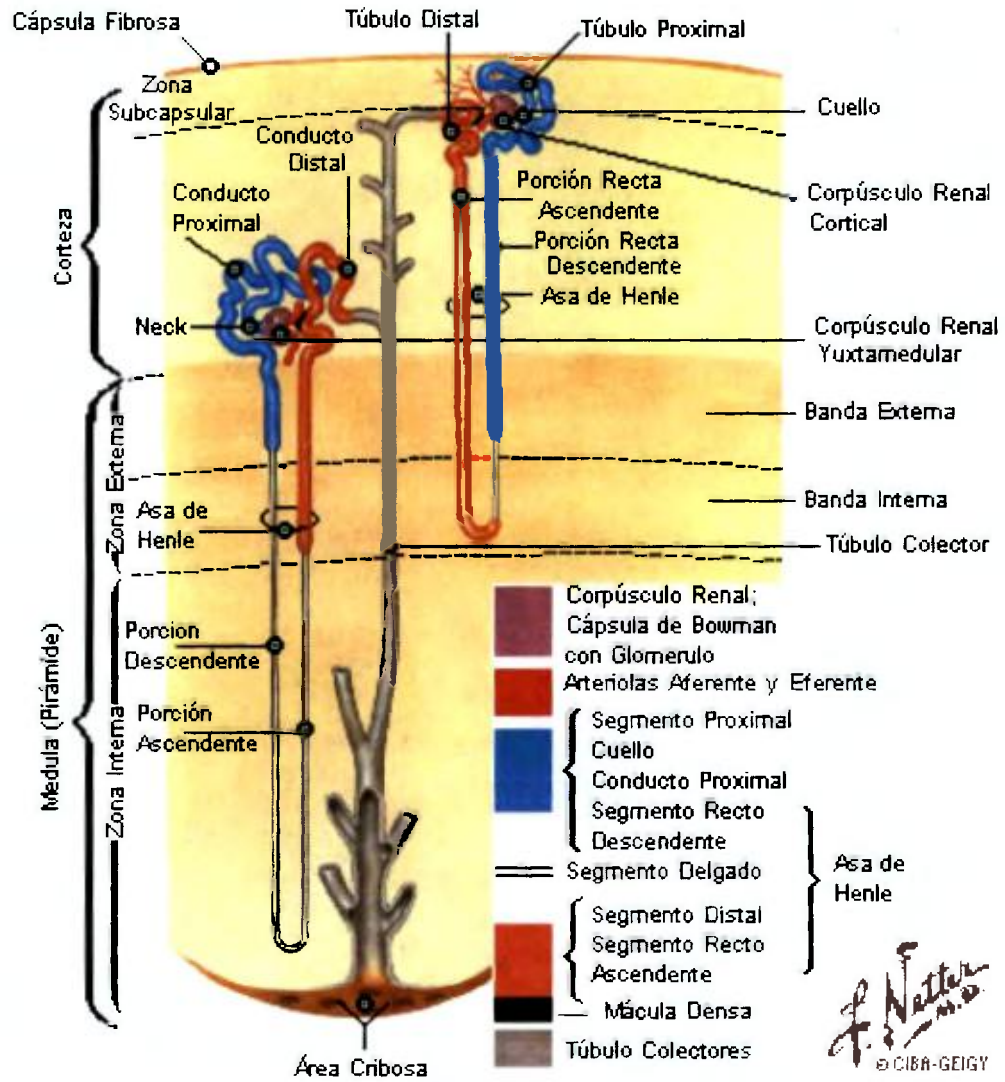


Figura1. Se observan los nefrones corticales y yuxtamedulares. Además observamos los diferentes túbulos renales y su distribución en la corteza y médula renal.

En el capilar glomerular se lleva a cabo el proceso de Filtración Glomerular Que es el paso de solutos y agua de los capilares glomerulares al espacio de Bowman. Esto es un proceso pasivo y es determinado por las Fuerzas de Starling

Las presiones que comandan el movimiento de líquidos a través de la pared del capilar glomerular son las presiones o Fuerzas de Starling

Podemos resumir que la filtración glomerular es un proceso pasivo que depende de la presión arterial media que se transmite al glomérulo El grado que se transmite esta presión, depende de la resistencia del lecho renal Garrido (op cit)

Hay dos factores que básicamente determinan la formación del ultrafiltrado glomerular

- 1) El Coeficiente de Filtración Glomerular (Kf)
- 2) Las Fuerzas Físicas de Starling (Pf) (presión de filtración)

Debemos considerar el coeficiente de filtración, que representa la permeabilidad al agua de la pared de los capilares glomerulares Los 2 factores que contribuyen en el coeficiente de filtración son la permeabilidad por unidad de superficie (Lp) y la superficie total (S)

La TFG es la velocidad en ml/min a la cual los riñones forman el ultrafiltrado Se calcula con la siguiente fórmula.

$$\text{TFG} = \text{Kf} \times \text{Pf}$$

El valor normal de Kf = 125 ml/min, donde Kf es una medida de que depende de la permeabilidad de la membrana (Lp) y la superficie de los capilares glomerulares (S)

Desglosando la fórmula anterior podemos describir mejor, en forma matemática la TFG, así

$$\text{TFG} = \text{LpS} (\Delta \text{ presión hidrostática} - \Delta \text{ presión oncótica})$$

$$\text{TFG} = \text{LpS} (\text{Pcg} - \text{Pcb}) - \text{s} (\pi \text{cg} - \pi \text{cb})$$

En términos simples podemos decir que hay fuerzas que hacen que el líquido se desplace fuera del capilar y otras que hacen que se mantenga dentro del capilar, la resultante de estas fuerzas se denomina Presión Efectiva de Filtración (Pf)

Fuerzas que lo desplazan fuera del capilar:

- 1.) **Presión hidrostática del capilar (45 mmHg).**
- 2.) **Presión oncótica de la cápsula de Bowman (0).**

Fuerzas que lo mantienen dentro del capilar:

- 1.) **Presión oncótica del capilar (25 mmHg).**
- 2.) **Presión hidrostática del espacio intersticial (10 mmHg).**

Los cambios en la resistencias de las arteriolas tanto aferentes o eferentes producen cambios de las fuerzas de Starling. Por ejemplo, al contraerse la arteriola eferente, aumentara la presión hidrostática del capilar glomerular, con lo que aumentará la filtración glomerular. En cambio si se contrae la arteriola aferente, caerá la presión hidrostática capilar, y por ende disminuirá la filtración glomerular.

La presión Hidrostática Glomerular y la presión Hidrostática de la Cápsula de Bowman se mantienen constante a lo largo del capilar durante el proceso de filtración glomerular. La presión neta de filtración es de 10 mmHg en el extremo aferente y cae a cero en el extremo eferente.

Tenemos el **equilibrio de filtración**, que es el punto donde la Presión Neta de Filtración (Pf) es de cero y se alcanza a la mitad del capilar glomerular. En condiciones normales el equilibrio se alcanza cuando se ha filtrado el 20 % del Flujo Plasmático Renal (FPR). El equilibrio de filtración varía con el FPR de la siguiente manera: si aumenta el FPR, el equilibrio de filtración se desplaza hacia el extremo eferente del capilar glomerular, lo que aumenta la TFG. Si el FPR disminuye, se filtra menos del 20%, lo que determina una menor TFG y el equilibrio de filtración se desplaza hacia el extremo aferente del capilar. Garrido (op cit)

s = Es el coeficiente de reflexión de las proteínas a través de la pared del capilar que varía desde 0 si es completamente permeable, a 1 si es impermeable

Puesto que el filtrado está principalmente libre de proteínas, $\pi_{cb} = 0$ y $s = 1$. De este modo tenemos la ecuación final del proceso de filtración glomerular

$$\text{TFG} = L_p S (P_{cg} - P_{cb} - \pi_{cg})$$

De este modo tenemos que el valor normal de la TFG es

$$\text{TFG} = 12.5 \text{ ml/min} (45\text{mmHg} - 10\text{mmHg} - 25\text{mmHg}) = 125 \text{ ml/min.}$$

Como resultado de la filtración glomerular se producen aproximadamente en 24 horas 180 litros de ultrafiltrado de plasma, si este ultrafiltrado se excretara sin modificación, se perdería una cantidad equivalente en términos de orina. Estas modificaciones ocurren en los túbulos renales, se llevan a cabo mediante la reabsorción y mediante la secreción de algunas sustancias desde la sangre capilar hacia la orina.

El transporte de cualquiera sustancia por los túbulos renales se puede realizar por dos vías: 1) La Vía Celular o Transepitelial. Es el paso de la sustancia por la membrana

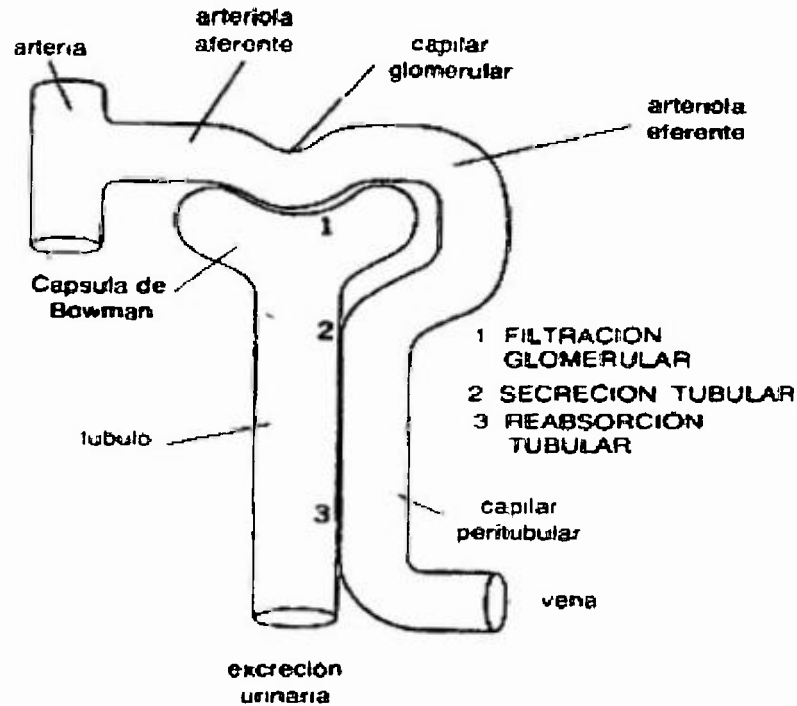
apical y basolateral del epitelio renal

2) La Vía Paracelular. Es el paso de la sustancia a través de la unión estrecha.

La aparición de una sustancia en la orina es lo que llamamos **Excreción**. Hay tres procesos que anteceden a la excreción y que son consideradas las tres funciones básicas de la nefrona. (Fig 2)

Figura 2

Las tres funciones básicas de la nefrona



Fuente Rose y Post (2002)

Figura 2

1 - Filtración Glomerular Es el movimiento de agua y solutos del capilar glomerular (Cap glom) al espacio de Bowman

2 - Secreción Tubular Es el movimiento de la sustancia desde el capilar peritubular, al intersticio renal, luego a la célula tubular y finalmente llegando hasta el lumen tubular (fluido endotubular)

3 - Reabsorción Tubular Es el movimiento de agua y solutos desde el lumen tubular, a la célula epitelial, luego al intersticio y finalmente al capilar peritubular Este proceso puede ser pasivo o activo Puede seguir la vía celular o paracelular

El contenido del filtrado glomerular puede modificarse en su paso por los túbulos renales, mediante los procesos de reabsorción y secreción tubular. De este modo, pueden extraerse sustancias del fluido endotubular por el **proceso de reabsorción** y pueden adicionarse sustancias al fluido endotubular, que no fueron filtradas, por el **proceso de secreción tubular**.

La reabsorción de agua a lo largo de la nefrona varía de acuerdo al segmento de la nefrona involucrado, es diferente la reabsorción de agua a nivel del nefrón proximal, que en el distal. Esta diferencia es producida por las características de permeabilidad de las diferentes células al agua y es modificada por factores como carga de sodio, velocidad de flujo tubular, descarga simpática y efectos hormonales sobre todo a nivel del nefrón distal.

Equilibrio del Sodio y agua: Es conocido el efecto osmótico que ejerce el sodio, que favorece el movimiento del agua y su reabsorción a lo largo de la nefrona. Por lo tanto, la reabsorción de sodio es una de las funciones más importantes del riñón. El Na^+ es el principal catión del líquido extracelular (LEC), y su cantidad determina el volumen de este compartimiento. Por lo tanto, los mecanismos que regulan la filtración y reabsorción de sodio, tienen importancia decisiva para conservar en rangos normales los volúmenes del LEC y el sanguíneo, y además la presión arterial.

Normalmente la cantidad de Na^+ que ingresa al cuerpo, debe ser igual a la que se excreta. Cuando el equilibrio se hace positivo, o sea aumenta la cantidad de Na^+ en el LEC (mayor ingreso que excreción), se produce una expansión del LEC con el concomitante aumento del volumen sanguíneo y de la presión arterial y puede aparecer edema (acumulación anormal de líquido en el espacio intersticial).

La excreción de sodio es menor del 1% del total que se filtra por el glomérulo (carga filtrada) **La mayor reabsorción de Na⁺** se produce en el túbulo contorneado proximal (60 - 65% de la carga filtrada), y **es acompañada de reabsorción de agua.**

La rama gruesa ascendente de Henle reabsorbe un 25% de la carga filtrada, pero a diferencia del túbulo proximal, a este nivel el túbulo es impermeable al agua.

Las porciones terminales del nefrón (túbulo distal y túbulo colector), reabsorben un 8% de la carga filtrada. Especial mención merece la porción terminal de los túbulos colectores corticales y medulares que reabsorben un porcentaje relativamente bajo de la carga filtrada (3%), pero que es regulado hormonalmente por la aldosterona y el factor natriurético atrial (FAN)

Mencionaremos la relación del sodio y agua a lo largo de la nefrona con las células involucradas (Fig. 3)

Primera porción del túbulo contorneado proximal o segmento (S1) A este nivel se reabsorben varios solutos acoplados al Na⁺ (glucosa, aminoácidos, lactato, fosfato, citrato y HCO₃⁻) mediante mecanismos de cotransporte y de contratransporte

Porción Terminal del túbulo contorneado proximal o segmento (S2) El líquido que llega a este nivel, difiere bastante del filtrado glomerular original, ya que carece de glucosa, aminoácidos y tiene una carga baja de HCO₃⁻, y a su vez contiene una carga elevada de Cl⁻. Por lo tanto, a este nivel predominantemente se reabsorbe Na⁺Cl⁻, ya sea por mecanismo transcelular, como por mecanismo paracelular (las uniones intercelulares “no son tan estrechas” y permiten el paso de este anión entre las células) Todo esto es acompañado de una **reabsorción isosmótica de agua**, ya que cada vez que los solutos se desplazan al interior de las células, el agua sigue al soluto por gradiente osmótico y se conserva la isosmolaridad. El segmento S3 del túbulo proximal no es contorneado, sino recto por lo cual, es llamado pars recta.

El segmento S₃ del túbulo proximal se continua con el segmento descendente del asa de Henle

Equilibrio glomerulotubular Es el principal mecanismo de regulación de la reabsorción a nivel del túbulo proximal. En términos generales podemos decir que este equilibrio, permite una reabsorción de una fracción constante de la carga filtrada (60% - 65%)

Asa de Henle **Altamente permeable al agua en su segmento descendente**
Impermeable al agua en sus segmentos ascendente: delgado y grueso Se reabsorbe el 25% del sodio filtrado

Rama Descendente es **altamente permeable al agua** y moderadamente permeable a solutos pequeños como NaCl y urea. Se reabsorbe el 20% del agua filtrada.

Rama Ascendente delgada es altamente permeable al NaCl, moderadamente permeable a la urea.

Rama Ascendente gruesa Impermeable a sodio, cloro y urea. La reabsorción de iones a este nivel es por mecanismos activos. A este nivel en la membrana luminal se encuentra un **cotransportador triónico** ($\text{Na}^+ - 2 \text{Cl}^- - \text{K}^+$), el que produce reabsorción neta de Na^+ , K^+ y Cl^- gracias al gradiente electroquímico del Na^+ . Estas células son impermeables al agua, por lo tanto se produce reabsorción neta de solutos sin agua (segmento diluyente). En la membrana luminal existe un anti-portador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ que reabsorbe Na^+ y secreta H^+ , lo que permite la reabsorción de HCO_3^- . En la membrana basolateral está la bomba ATP $\text{asa-Na}^+ - \text{K}^+$ que saca activamente el sodio de la célula.

Túbulo Distal Es **impermeable al agua** y no es afectada por la acción de la ADH

El túbulo distal en la membrana basolateral tiene ATP $\text{asa-Na}^+ - \text{K}^+$ y un canal de Cl^-

La membrana luminal tiene un cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ que interviene en la reabsorción de sodio y es dependiente de la oferta tubular de sodio al túbulo distal y

varía importantemente con el flujo urinario Este cotransportador es inhibido por diuréticos tiazídicos al competir por el sitio del cloro en el cotransportador de Na^+ - Cl^- en la membrana luminal

Segmento Conector Es la porción entre el túbulo distal y el inicio del túbulo colector cortical Tiene características de ambos Al igual que el túbulo distal Es **impermeable al agua** aún en presencia de ADH Reabsorbe activamente calcio, es afectada por PTH y calcitriol Al igual que el colector cortical reabsorbe activamente sodio por una canal de sodio y secreta pasivamente potasio por acción de la aldosterona.

Túbulo Colector Cortical Encontramos 2 tipos de células, las células principales que se encargan de la reabsorción de Na^+ y secreción de K^+ , y las células intercalares tipo A o alfa y tipo B o beta, que tienen que ver con el equilibrio ácido-base **Estas células intercalares son relativamente impermeables al agua en estado basal y no son sensibles a la ADH** Las células principales son sensibles a la aldosterona (reabsorción de sodio y secreción de potasio) y ADH (reabsorción de agua) Las células principales tienen canales de Na^+ y K^+ en la membrana luminal y ATPasa- Na^+ - K^+ en la membrana basolateral Gracias a los canales de Na^+ y K^+ que se encuentran en la membrana luminal, es posible el desplazamiento de estos iones, mediante el gradiente electroquímico, que es mantenida por la bomba Na/K ATPasa basolateral La Aldosterona, hormona esteroïdal sintetizada en la corteza suprarrenal, actúa directamente en las células principales donde a nivel del DNA estimula la síntesis de proteínas de los canales de Na^+ y de la bomba Na-K-ATPasa, con un efecto neto en aumento de la función de este sistema y por ende aumento de la reabsorción de Na^+ y de secreción de K^+ (Fig 3)

A este nivel del túbulo colector renal se reabsorbe alrededor del 3% de la carga filtrada de sodio, y es justamente a este nivel donde hay una regulación más fina del equilibrio

Finalmente, **la reabsorción de agua a este nivel del túbulo colector es controlada por la hormona antidiurética ADH**, la que se secreta en la hipófisis posterior y produce un aumento de la permeabilidad del túbulo colector (estimulando la fusión de vesículas con la membrana plasmática, las que contienen **AQP2**, canales proteicos que permiten el paso de agua a través de ellos) (Fig 3)

Túbulo Colector Medular Tenemos el Colector Medular externo y el Colector Medular interno Los túbulos colectores medulares externos, intervienen principalmente en la acidificación de la orina y en la excreción de amonio Los túbulos colectores medulares internos son más importantes en la concentración de la orina.

Túbulo Colector Medular Externo La mayoría de las células en el túbulo colector medular externo son células intercalares, de manera que tienen en su membrana luminal abundantes bombas de ATP asa- $K^+ - H^+$ y ATP asa- H^+ y en su membrana basolateral el cotransportador $Cl^- - HCO_3^-$ que favorece la reabsorción de bicarbonato **Es impermeable al agua en estado basal, pero en presencia de ADH aumenta importantemente la permeabilidad al agua**, lo que permite un equilibrio osmótico con el intersticio medular, por lo que es importante también en la concentración de la orina.

Túbulo Colector Medular Interno Tienen células similares en función a las células principales y células intercalares Son más importantes en la concentración de la orina. Este segmento es muy importante en la reabsorción de agua y la excreción de una orina concentrada. La ADH aumenta la permeabilidad al agua, lo que permite un

equilibrio osmótico con el intersticio medular e interviene en la concentración de orina. Rose (po cit)

Pelvis Renal, Uréteres y Vejiga Cambios mínimos ocurren en la composición de orina, una vez que sale el fluido endotubular del colector medular más interno. La pelvis, uréteres y vejiga son moderadamente permeables a la urea y el agua.

Garrido (op cit)

Figura 3

Mecanismos de transporte de solutos en los diferentes segmentos del nefrón.

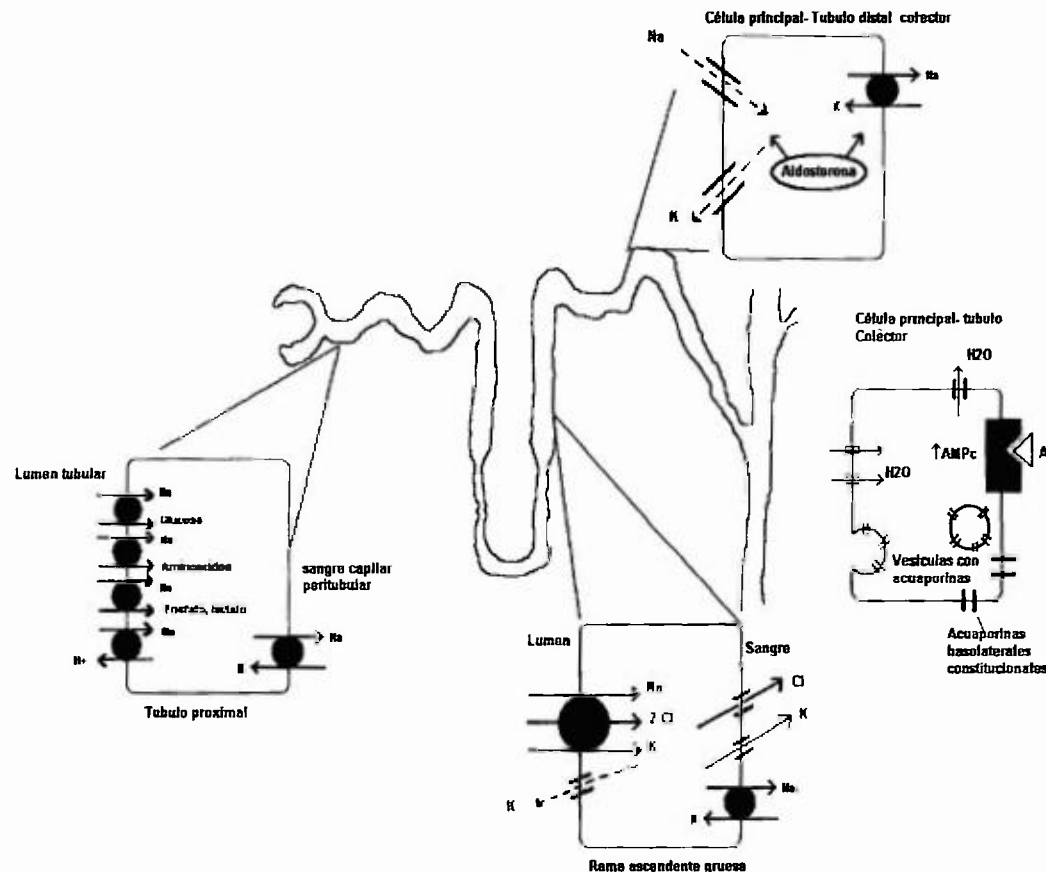


Figura 3 Células involucradas en el transporte de solutos y agua, en los diferentes segmentos del nefrón. (ver texto arriba)

Concentración y dilución de la orina

La osmolaridad de líquidos corporales es alrededor de 290 mOsm/L, y su regulación es un proceso integral y muy fino (cambios pequeños en la osmolaridad causan reacciones que tienden a volver a la osmolaridad a rangos normales)

En este contexto, los túbulos colectores corticales y medulares son los lugares donde se ejerce el equilibrio del agua (tal como sucede con el Na⁺ y el K⁺) Las variaciones en la reabsorción de agua producen cambios en la osmolaridad de la orina, la que puede variar desde 50 mOsm/L (orina diluida) hasta 1200 mOsm/L (orina concentrada) (Fig 4)

Ante una pérdida continua de agua, se produce una concentración y un aumento de la osmolaridad plasmática. La osmolaridad plasmática es constantemente censada por los Osmorreceptores del hipotálamo anterior. Ante un aumento de la osmolaridad, la estimulación producida en los osmorreceptores tiene dos efectos principales: Generación de la sed, y aumento de la secreción de ADH (hormona antidiurética o vasopresina) por la hipófisis posterior. **La concentración y dilución de la orina depende de la acción de la ADH y la tonicidad medular.**

La acción de la ADH a través de su receptor V₂R a nivel renal, se resume en lo siguiente

- Aumenta la permeabilidad del agua en los túbulos colectores corticales y medulares, mediante la expresión de acuaporinas (AQP2) en las superficies lumbales. Con esto aumenta el paso del agua a través de los túbulos hacia los capilares peritubulares y por consiguiente mayor reabsorción de agua.
- Incrementa la actividad del cotransportador Na⁺-2Cl⁻-K⁺ en el segmento grueso del asa de Henle

- Aumenta la permeabilidad de la urea en los túbulos colectores medulares internos
Estas 2 últimas acciones tienen como fin aumentar también la reabsorción de agua. El aumentar la permeabilidad al agua en los túbulos colectores, por sí sola no determina una mayor reabsorción de agua, también se necesita una fuerza osmótica que logre desplazar el agua

La ADH aumenta la reabsorción de otros solutos que funcionan como osmoles activos en el intersticio medular renal y sirven de motor para el desplazamiento del agua. (NaCl y Urea)

La participación de las Acuaporinas en el proceso de reabsorción de agua a lo largo de la nefrona

La AQP1 es el canal de agua responsable en el movimiento transcelular de agua en el túbulo proximal y en el asa descendente de Henle. Las isoformas de AQP2, AQP3, y AQP4 están presentes en las células principales de los túbulos colectores corticales y medulares internos. La AQP2 está en la membrana apical y es la base de la regulación por la ADH en la permeabilidad al agua en estos segmentos tubulares. La AQP3 y AQP4 se encuentran en la membrana basolateral de las células principales, donde intervienen en la salida del agua hacia el capilar peritubular. La AQP2 tiene regulación a corto plazo y a largo plazo. La regulación a corto plazo es mediada por la ADH, vía AMP cíclico, causando que las vesículas que contienen los canales de agua-AQP2 se fusionen con la membrana apical, como resultado el número de canales y la permeabilidad al agua aumenta en forma importante. En la regulación a largo plazo, la ADH aumenta la transcripción del Gen AQP2, aumentando la abundancia de la proteína AQP2 en las células principales de los túbulos colectores corticales y medulares internos.

Figura 4

Transporte de NaCl y difusión pasiva de agua a lo largo de la nefrona durante antidiuresis y diuresis acuosa.

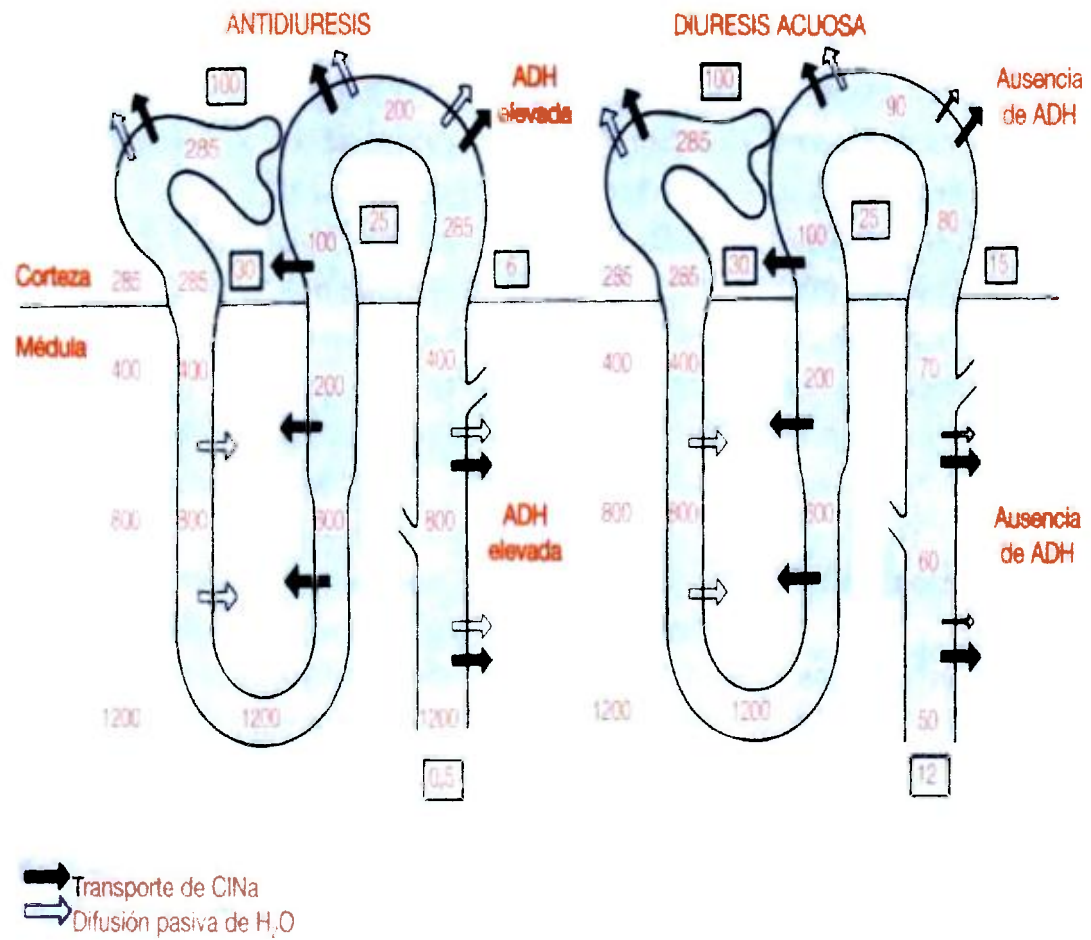


Figura 4. Resumen del transporte de NaCl y agua; durante una antidiuresis (orina concentrada o hipertónica) y diuresis acuosa (orina diluida o hipotónica). Las concentraciones del fluido tubular se expresan en mmol/L. Los números grandes en los cuadros representan el porcentaje de filtrado glomerular que permanece en el túbulo en cada sitio. Se indica que la composición y el volumen del fluido tubular son esencialmente los mismos al final del asa de henle, ya que la excreción de orina concentrada o diluida se define principalmente en lo túbulo colectores. Rose y Post (2002)

Mencionaremos los aspectos fisiológicos más relevantes de la **ADH o Arginina Vasopresina**.

Estructura. Es un nonapéptido formado por la siguiente secuencia de aminoácidos

Cys - Tyr - Phe - Gln - Asn - Cys - Pro - Arg - Gly -NH₂

Hay dos puentes de disulfuro conectados a los dos residuos de cisteína

Síntesis Este polipéptido es sintetizado en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. En humanos y en la mayoría de los mamíferos, la hormona anti diurética es la Arginina Vasopresina, la cual es codificada por el RNA mensajero para la preneurofisina II (preprohormona). Después de la separación del péptido señal (ocurre en el retículo endoplásmico), la prohormona resultante contiene arginina vasopresina, neurofisina II y un glicopéptido. La separación de estos tres compuestos ocurre en los gránulos secretorios del aparato de Golgi. Mutaciones de la neurofisina II deteriora la secreción de la Arginina Vasopresina, sugiriendo que neurofisina II participa en el proceso de secreción de la ADH. Los niveles circulante de ADH dependen de la tasa de liberación en la neurohipófisis y de su tasa de degradación.

La vida media de la ADH es 18 minutos y su degradación ocurre en el hígado y riñones. Las enfermedades hepáticas y renales puede deteriorar la degradación de la ADH y favorecer la retención de líquidos. Boron y Boulpaep (2003)

Transporte Los gránulos secretorios procedentes del aparato de Golgi se mueven por transporte axonal hacia la terminal nerviosa. El transporte desde los cuerpos celulares hasta las terminaciones axónicas dura aproximadamente 10 horas. Las neurofisinas son importantes en el transporte, almacenamiento y liberación de la ADH.

Estímulos 1) Hiperosmolaridad 2) Hipovolemia.

Función primaria Regula la osmolaridad de los líquidos corporales

Función secundaria Regula el volumen intravascular

La producción de ADH está regulada por mecanismos osmóticos (osmoreceptores) y no osmóticos (baroreceptores) Los osmoreceptores se encuentran en células del hipotálamo anterolateral, basta una variación de 1% de la osmolaridad del líquido extracelular para que se libere ADH Cuando la osmolaridad plasmática se encuentra por debajo de 280 mOsmo/l, estas neuronas (osmoreceptores) se encuentran en estado de reposo y la secreción de ADH es mínima. Cuando la osmolaridad plasmática se eleva por arriba de este valor umbral, las células osmoreceptoras se estimulan para liberar ADH Los baroreceptores se activan a través de variaciones en el tono del sistema nervioso autónomo, es menos sensible y requiere de cambios entre 5 a 10% del volumen sanguíneo para que actúe en la liberación de ADH El mejor ejemplo de su acción es la hemorragia aguda, en que sin cambio osmolar, se produce antidiuresis La concentración plasmática de ADH se determina por radioinmunoanálisis, considerando normales cifras de 0 a 5 pg/ml En el último tiempo se han descrito mediadores nerviosos centrales para la liberación de ADH, en respuesta a los estímulos osmóticos y no osmóticos como catecolaminas, agentes anticolinérgicos, angiotensina II, prostaglandinas y calcio Fármacos y otros estímulos actúan ejerciendo un efecto directo sobre las neuronas involucradas en el sistema de secreción de ADH, por ejemplo, el alcohol y el frío inhiben la secreción de ADH y se acompañan de diuresis, la nicotina, la morfina, ciertos anestésicos, la emoción y el vómito se cree que producen directamente secreción de ADH y conducen a la antidiuresis, a este respecto cabe destacar el importante rol de las náuseas como estímulo de ADH, probablemente el no osmótico más potente, llegando a elevar hasta en 500 veces los niveles circulantes de ADH Rose (op cit)

Mecanismo de Acción y Efectos en el Organismo Los dos efectos más importantes de la ADH son mediados a través de dos tipos de receptores, los V₁R (efecto vasoconstrictor) y V₂R (efecto antidiurético)

Desde el lóbulo posterior de la hipófisis, la ADH pasa a la circulación general y se une a los receptores V₂R en la membrana baso-lateral de los túbulos colectores, desencadenando una serie de reacciones en presencia de magnesio y catalizadas por adenilciclase, que transforma ATP en AMP cíclico. Esta enzima es inhibida por prostaglandina E. El AMP cíclico estimula una proteína quinasa, que fosforilada favorece la aparición de estructuras denominadas microtúbulos y microfilamentos, que aumentan la permeabilidad al agua en las células del lumen, formando canales acuosos llamados acuaporinas, siendo la acuaporina 2 el más importante. Recientemente se han medido niveles urinarios de acuaporina 2 por radioinmunoanálisis específico, usando anticuerpos policlonales humanos. Los niveles de acuaporina 2 en orina aumentan en respuesta al aumento de la ADH plasmática permitiendo diferenciar la diabetes insípida tipo I (central) de la II (nefrogénica) en que la función del receptor V₂ está alterada. Kanno et al (1995) El receptor V₂R también se encuentra en el endotelio vascular y produce vasodilatación mediado por óxido nítrico (NO)

Además del receptor V₂R, la ADH se une a otros tipos de receptores como son V₁R, V₃R y OTR. El receptor V₁R se encuentra en los vasos sanguíneos e induce vasoconstricción, vía fosfolípasa C, fosfatidilinositol y aumento de calcio intracelular. También produce liberación de prostaglandinas a nivel del intersticio medular.

El receptor V₁R a nivel endotelial produce vasodilatación mediado por NO. Holmes et al (2001)

Rose (op cit) El receptor V_3R media los efectos de la ADH en la pituitaria, aumentando el AMP cíclico, lo que facilita la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

El receptor OTR (receptor de oxitocina) se encuentra en el útero, glándulas mamarias Produce constricción mediado por fosfolipasa C y aumento de calcio intracelular Los receptores OTR se encuentran también, en el endotelio vascular y producen vasodilatación mediado por el óxido nítrico (NO) Holmes et al (po cit)

Otros efectos de la ADH La ADH actuando sobre receptores V_2R estimula la liberación de los factores VIII y Von Willebrand desde el endotelio vascular La administración de ADH es eficaz en la mejoría transitoria de la tendencia hemorrágica de ciertas patologías que incluyen la hemofilia, la enfermedad de Von Willebrand y la insuficiencia renal avanzada. Bichet et al (1988)

ACUAPORINAS

Es indispensable comprender la importancia de estos canales de agua llamados acuaporinas debido a que el agua es el principal componente de los seres vivos, la capacidad que tienen las células para absorberla y liberarla puede ser considerada como una propiedad fundamental de las células vivas El agua puede atravesar las membranas lipídicas por difusión Sin embargo, las membranas plasmáticas exhiben permeabilidades diferentes al agua y esto da lugar que en la década de los 50s se pensara en la existencia de los canales de agua. Sidel (1957) A pesar de las múltiples evidencias, no fue hasta hace 15 años que se determinó la estructura molecular de los poros de agua, mientras se purificaba un componente del antígeno del grupo sanguíneo Rh. A este canal se le denominó CHIP-28 (channel-forming integral protein of 28 kDa), ahora conocida como AQP1 Agre (1993) La presencia de estas proteínas en las diferentes membranas permitió establecer que estos canales

constituyen una familia de proteínas que se localizan en todas las células y que participan en el transporte de agua, y de esta forma pudieran estar vinculadas con la regulación del volumen celular. A esta familia de proteínas integrales de membrana se le denominó por el Comité de nomenclatura del Genoma Humano ACUAPORINAS (AQP) Agre (1997)

Topología y Estructura. Están formadas por 6 segmentos transmembranales y cuatro subunidades. Esquema detallado de la AQP-1 (Fig 5) Puede verse que (a) AQP-1 es una proteína formada por 2 mitades en tandem (una tras otra) (b) Tiene 6 segmentos transmembranales, que se numeran del 1 al 6 Comenzando en el grupo amino-terminal, la primera mitad del tandem está formada por los segmentos 1, 2 y 3, y la segunda, muy parecida, por los segmentos 4, 5 y 6 Terminando con el grupo carboxi-terminal (c) Cinco asas (denominadas A, B, C, D y E) conectan los 6 segmentos (d) A, C y E son extracelulares, B y D intracelulares (e) Las dos asas largas, B y E, se doblan hacia el interior de la bicapa (B desde el lado citosólico y E desde el extracelular) y se enlazan para formar el filtro de selectividad (FS) (f) Hay tres aminoácidos seguidos en el asa B y en la E, asparragina, N, prolina, P, y alanina, A (uno tras otro), que caracterizan las proteínas integrales de la membrana y forman el filtro de selectividad (g) Aunque la AQP-1 tiene varias cisteínas, la cisteína 189 (C-189) que está en el asa E, es el sitio de acción del agente mercurial al que nos hemos referido antes (h) Cuatro moléculas de AQP-1 forman un tetrámero en el que cada molécula es permeable al agua, constituyendo un canal de agua independiente. Así, el tetrámero tiene 4 veces la permeabilidad del monómero.

Actualmente se conocen las estructuras cristalográficas de la acuaporina CHIP de eritrocitos de humano, de la acuaporina AQP1 de mamíferos (Fig 6) y de la acuagliceroporina GlpF de Escherichia coli Walz et al (1997) Fu et al (2000)

Una característica única de esta estructura es que los extremos NH^2 -terminal de las hélices HB y HE se juntan en el centro de la membrana. Ambas hélices tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada (NPA) en estos extremos, las cuales interactúan a través de la prolina y la alanina de la hélice opuesta. El poro tiene un vestíbulo de forma cónica en la parte periplásmica. Este conduce a un canal selectivo de 28 Å de largo. El valor más pequeño del radio de dicho canal está a la mitad de éste y es de 3.0 Å. Sorprendentemente, la mayor parte de las paredes internas de este canal son hidrofóbicas, más en el caso de la GlpF que en la AQP1. Cada uno de los canales está formado por seis hélices α transmembranales (H1-H6) y otras dos pequeñas de longitud igual a la mitad del ancho de la membrana (HB, HE). Estas ocho hélices forman un "haz helicoidal a la derecha" con un poro en el centro.

Murata et al (2000) proponen que la forma en la que el canal AQP1 conduce y selecciona a las moléculas de agua es un mecanismo en el que se forma una columna de éstas a lo largo del poro hidrofóbico haciendo puentes de hidrógeno con aminoácidos polares específicos que se encuentra a lo largo del camino de permeabilidad. En el centro del poro el valor del radio es un poco mayor al de una molécula de agua (2.8 Å). Aunque la longitud de esta restricción es sólo la de un aminoácido, esto bloquearía el paso de solutos más grandes y de iones, ya que el poro no tiene la estructura necesaria para liberarlos de sus capas de hidratación. Debido al campo electrostático positivo generado por los dipolos de las hélices HB y HE, el oxígeno de una molécula de agua que se aproxima al centro de la membrana se orienta hacia el lado donde se juntan dichas hélices. Los grupos amidos de las asparaginas de las secuencias conservadas NPA en los extremos NH^2 -terminal de estas hélices están orientadas hacia el eje del poro, lo que les permite hacer puentes de hidrógeno con el

oxígeno de la molécula de agua en dicha posición. Esta configuración orienta el plano de la molécula de agua perpendicularmente al eje del canal, evitando que sus hidrógenos formen puentes con moléculas vecinas, rompiendo la estructura que favorecería la conducción de protones. Las acuaporinas excluyen absolutamente todo tipo de iones y solutos cargados, incluyendo a protones y al ion hidróxido. Todas las acuaporinas son permeables a agua y las AQP3, AQP7 y AQP9 también son permeables a glicerol. En eucariotes, muchos de estos canales son regulados por fosforilación (principalmente por proteína quinasa A), pH y osmolaridad. La mayoría de las acuaporinas son inhibidas por compuestos mercuriales, pero no es una característica común a todas, porque algunas pueden incluso ser activadas por éstos, el sitio de inhibición por Hg^{2+} ha sido localizado en el loop C, Cisteína 189 y Alanina 37 el cual no está presente en todos los tipos. Zhang et al (1993)

Su permeabilidad al agua es alta, en el orden de 3×10^9 moléculas de agua por segundo, para la AQP1, y cifras cercanas para casi todas las demás. Requieren una energía de activación bastante baja, en el orden de 5 kcal/mol o menores.

Las acuaporinas son altamente selectivas al paso de agua, impidiendo incluso el paso de protones, la estructura del poro acuoso impide que el agua protonada (H_3O^+) sea capaz de atravesar la barrera formada por el residuo Arg-195, el cual está conservado en todos los miembros de la familia y ocupa una posición preponderante en el poro. Existe una segunda barrera al paso de protones, formada por un fuerte dipolo en el centro del poro formado por dos segmentos que contienen la secuencia NPA (asparagina-prolina-alanina), el cual reorienta las moléculas de agua al pasar, interrumpiendo las interacciones entre una molécula y la siguiente, lo cual elimina la posibilidad del transporte de protones simultáneamente.

Figura 5

Esquema bidimensional topológico de la acuaporina 1 (AQP₁)

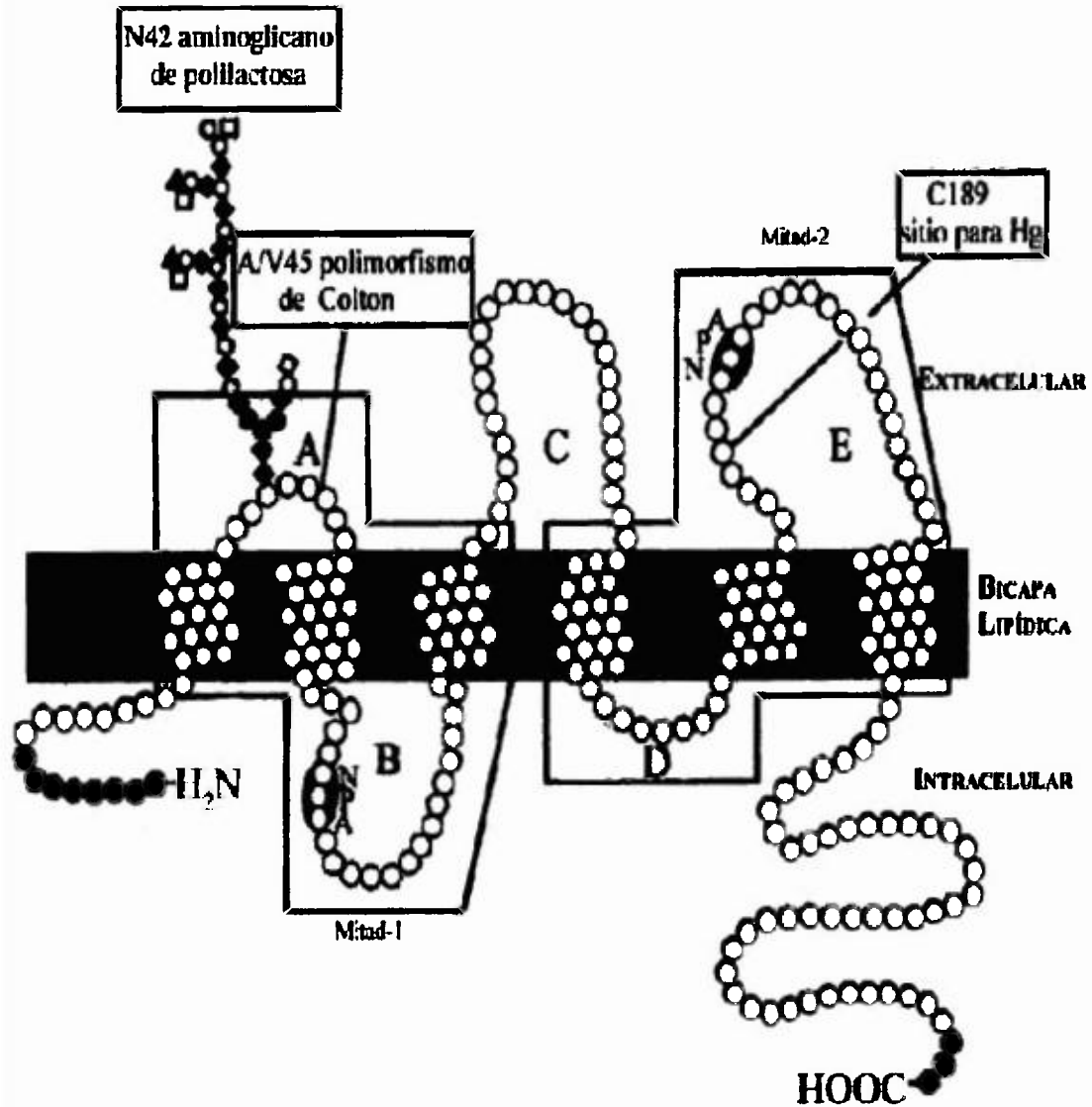
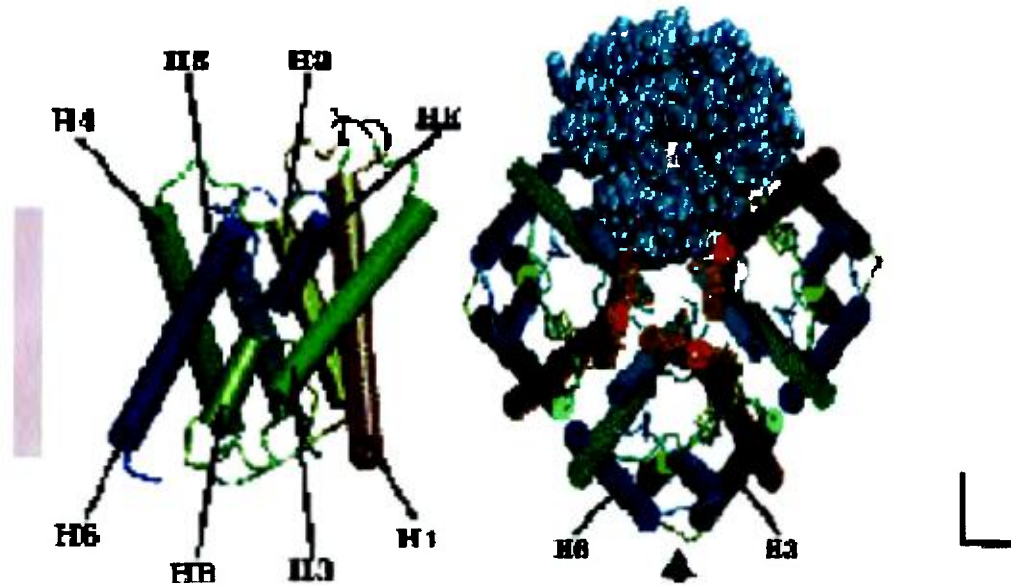


Figura 5 De izquierda a derecha se muestran el grupo amino-terminal (citósico), luego tres segmentos transmembranales 1, 2 y 3 que forman la mitad 1 del tandem, que termina con los segmentos 4, 5 y 6 (mitad 2 del tandem, en cierto modo “invertida” en relación a la mitad 1) Las asas B y E conteniendo las secuencias NPA (ver texto), se introducen en la bicapa, desde el lado intra- (B) y extra-celular (E), respectivamente, para formar el filtro de selectividad El agente mercurial actúa en la Cisteína 189 En el asa A se marca el sitio de glicosilación y el polimorfismo de Colton. Preston et al (1992)

Figura 6

Estructura cristalográfica de la acuaporina 1 (AQP₁).



Fuente: Sui et al. (2001).

Figura 6. En el lado izquierdo: observamos el monómero visto desde adentro de la membrana, utilizando cilindros para representar las hélices α de la proteína. H₁ contiene el grupo amino terminal y H₆ el grupo carboxilo terminal, ambos en el lado citoplásmico de la célula. La barra gris representa el ancho y localización de la membrana celular. En el lado derecho: vista del tetrámero desde el citoplasma, en el que se aprecian los 4 poros; misma representación que en el lado izquierdo, salvo el monómero superior, en el cual se utilizan radios de van der Waals. La flecha en la parte inferior indica el punto de vista de la figura en el lado izquierdo. Las barras de referencia a la derecha tienen 10 Å de largo.

En general, estos canales de agua tampoco permiten el paso de otros iones, porque el tamaño del poro es aproximadamente de 2.8 Å, el cual es mucho menor que el diámetro de cualquier ion hidratado. La presencia de un residuo alternativo a Histidina-180 (His-180), como Glicina (Gly), está asociada con un diámetro del poro mayor, como sucede en las acuagliceroporinas, lo cual permite el paso de glicerol y otros solutos. Fu et al. (op.cit).

La AQP1, AQP2 y AQP3 forman tetrámeros en la membrana. Sin embargo, la AQP4 en las células gliales y en la membrana basolateral de los túbulos colectores en las células principales, se ensamblan en una estructura multimérica que visualizada por microscopía electrónica con fractura de congelación, adquieren una forma de partículas cuadradas intramembranales Nielsen et al (op cit)

Tipos de Acuaporinas De acuerdo a sus propiedades filogenéticas, su especificidad al agua y otros solutos, las acuaporinas se han dividido en dos grupos 1) Grupo Ortodoxo transporta selectivamente agua. 2) Grupo Cocktail (Acuagliceroporinas) transporta además de agua, otros pequeños solutos, como el glicerol Nielsen et al (2000)

Estas acuaporinas son canales de agua que se expresan en 11 isoformas (Cuadro I), de las cuales 6 se expresan a nivel renal (AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP6 y AQP7) Nielsen et al (op cit) (Cuadro II)

Estos canales de agua, según su localización han aumentado nuestra comprensión y entendimiento sobre el transporte de agua a través de membrana celular de las células epiteliales Además las acuaporinas de isoformas renales se han asociado a una variedad de situaciones fisiopatológicas (Cuadro III) Nielsen (op cit)

Isoformas Renales Es de conocimiento que la AQP 1 es responsable de la permeabilidad del agua en el túbulo proximal y asa descendente de Henle

Las AQP 2 a la AQP4 se expresan en los túbulos colectores corticales y medulares internos, en las células principales La AQP 2 se ubica en las células principales de los túbulos colectores a nivel de la membrana apical y es regulada en términos de tiempo en regulación a corto plazo y a largo plazo, vía arginina vasopresina / monofosfato de adenosina cíclico (ADH /AMPc) (Fig. 7)

La AQP3 se encuentra en la membrana basolateral de los túbulos corticales y medulares internos, favoreciendo la reabsorción de agua en esta localización

Mientras que la AQP4 se encuentra a nivel de la membrana basolateral de los túbulos colectores y no tiene regulación a corto ni largo plazo como la AQP2 Kwon (1998)

La AQP6 se encuentra en los podocitos glomerulares, segmento S₂-S₃ en los túbulos proximales y células intercalares de los túbulos colectores medulares externos a nivel de las vesículas intracelulares

La AQP7 se encuentra en los túbulos proximales a nivel de la membrana apical

Cuadro I

SITIOS DE EXPRESIÓN DE LAS ONCE ISOFORMAS DE ACUAPORINAS

	SITIO DE EXPRESIÓN	COMENTARIO
AQP-0	OJO CÉLULAS FIBRAS LENTES	BALANCE DE LÍQUIDOS - LENTES
AQP-1	GLÓBULOS ROJOS RIÑÓN TUBULOS PROXIMALES OJO EPITELIO CILIAR CEREBRO PLEXO COROIDEO PULMÓN EPITELIO ALVEOLAR	PROTECCIÓN OSMOTICA REABSORCIÓN AGUA PRODUCCIÓN HUMOR ACUOSO PRODUCCIÓN DE LCR HIDRATACIÓN ALVEOLAR
AQP-2	RIÑÓN TÚBULO COLECTOR CORTICAL Y MÉDULAR INTERNO	REABSORCIÓN DE AGUA - ADH - APICAL
AQP-3	RIÑÓN TUBULOS COLECTOR CORTICAL Y MEDULAR EXTERNO TRAQUEA EPITELIO	REABSORCIÓN AGUA - BASOLATERAL SECRECIÓN AGUA DENTRO - TRAQUEA
AQP-4	RIÑÓN TUBULOS COLECTOR CORTICAL Y MÉDULAR CEREBRO CÉLULAS EPENDIMALES CEREBRO HIPOTÁLAMO PULMÓN EPITELIO BRONQUIAL	REABSORCIÓN AGUA - BASOLATERAL BALANCE FLUIDOS LCR OSMORECEPTORES ? SECRECIÓN FLUIDO BRONQUIAL
AQP-5	GLÁNDULAS SALIVARES GLÁNDULAS LACRIMALES	PRODUCCIÓN SALIVA PRODUCCIÓN LAGRIMAS
AQP-6	RIÑÓN	MUY BAJA PERMEABILIDAD AGUA Y OTRAS FUNCIONES ??
AQP-7	RIÑÓN, ADÍPOCITOS TESTÍCULOS Y ESPERMA	TRANSPORTE DE GLICEROL FUERA DEL ADIPOCITO FLUIDEZ GONADAL
AQP-8	TESTÍCULOS, PÁNCREAS E HÍGADO	DEFICIENCIA PRODUCE COLESTASIS INTRAHEPÁTICA
AQP-9	LEUCOCITOS, HÍGADO, PULMÓN, Y BAZO	FUNCIÓN ??
AQP-10	EPITELIO EN DUODENO Y YEYUNO	POSIBLE PAPEL EN EL CONTROL METABÓLICO

Fuente Nielsen et al (2000) Hatakeyama et al (2001)

Cuadro II

ISOFORMAS RENALES DE ACUAPORINAS

AQP	Localización Renal	Distribución subcelular	Regulación	Localización Extrarenal
AQP1	TP segmento S ₂ ,S ₃	Membrana apical y basolateral	Desconocida	Endotelio, plexo coroideo, cornea, epitelio ciliar
AQP2	Células principales en los TCC y TCMI	Membrana apical y vesículas intracelulares	ADH corto plazo exocitosis Largo plazo biosíntesis	Testículos
AQP3	Células principales en los TCC y TCMI	Membrana basolateral	ADH largo plazo	Epitelio vía aérea, conjuntiva, colon,
AQP4	Células principales en los TCC y TCMI	Membrana basolateral	Desconocida	Cerebro Astroglia, epéndimo, epitelio superficie de vía aérea.
AQP6	Podocitos glomerulares, TP S ₂ , S ₃ Células intercalares TCME	Vesículas intracelulares	Compuertas rápidas	Desconocida
AQP7	TP segmento S ₃	Membrana apical	Desconocida	Testículos, corazón y tejido adiposo

Fuente Seldin y Giebisch (2000)

TP = túbulos proximales

TCC = túbulos colectores corticales

TCME = túbulos colectores medulares externos

TCMI = túbulos colectores medulares internos

Características y Funciones

AQP0 Se llama así, porque fue descrita antes de la AQP1. Se expresa en las células fibrilares del cristalino, en las cuales cumple un papel primordialmente estructural, aunque su función aún está lejos de ser comprendida completamente, fue llamada LMIP (Lens Major Intrinsic Protein), debido a que es una de las proteínas más abundantes en estas células, constituyendo la mitad de todas sus proteínas, no es inhibida por mercuriales y su permeabilidad al agua es baja en proporción con las demás. Parece que su función más importante es servir como proteína de adhesión entre las células del cristalino, lo cual se evidencia por la interrupción de los contactos intercelulares en individuos con mutaciones congénitas en el gen de AQP0, con la consecuente desorganización del tejido, generando la aparición de cataratas de diferente gravedad. Su actividad como canal de agua es activada por disminución de pH e inactivada por aumentos de calcio intracelular y da lugar a flujos de agua cuando el gradiente osmótico lo permite, lo cual puede jugar un papel importante en la regulación de la forma celular del cristalino. Mulders et al (1995)

AQP1 Es la acuaporina más abundante en las membranas animales y posiblemente la de expresión menos selectiva. Ha sido la acuaporina prototipo pues fue la primera en ser descrita y por tanto es la más estudiada hasta el momento, lo cual ha permitido conocerla mejor que todos los demás miembros de la familia. Fue descubierta inicialmente en eritrocitos, pero su presencia se ha demostrado en la mayor parte de epitelios, sobre todo abundante en túbulo proximal renal (TPR) y segmento descendente delgado (SDD) del asa de Henle en el riñón, en todos los tipos de endotelio, en los epitelios de cristalino y córnea y en los colangiocitos. Existen otros epitelios en los cuales se ha demostrado su ausencia como en la nefrona distal y las glándulas salivales. Sin embargo, parece estar presente en la mayoría de membranas,

aunque en muchas de ellas su papel funcional es desconocido Agre et al (2002) Es la responsable de la alta permeabilidad al agua del túbulo proximal (TPR) y del segmento descendente delgado (SDD) del asa de Henle, en los cuales es una de las proteínas más abundantes tanto en membrana apical como basolateral Su distribución parece ser diferente dentro del túbulo proximal, pues es más abundante en el segmento 3 de éste, también es más abundante en los segmentos descendentes delgados del asa de Henle, el cual está presente sobre todo en nefronas de asa larga. Nielsen et al (2002) Esta acuaporina es crítica para la reabsorción renal de agua, pues el TPR es responsable por la reabsorción de las dos terceras partes de toda el agua filtrada, su expresión defectuosa o su ausencia produce un riñón incapaz de concentrar la orina en forma eficiente, por la elevada carga de agua que debe manejar la nefrona distal, además, la elevada permeabilidad al agua del SDD del asa de Henle es vital para el mecanismo de contracorriente, fundamental para mantener el gradiente osmolar medular, el cual es el fundamento principal para que se pueda dar la dilución y concentración de orina. Su expresión en algunos lechos endoteliales es regulada por una diversidad de estímulos locales y sistémicos, aún por dilucidar Por ejemplo, en el lecho vascular pulmonar su expresión es incrementada en forma notable por corticosteroides, lo cual ha sido implicado en la maduración pulmonar inducida por éstos Además, la AQPI ha sido involucrada en la regulación del flujo de líquido en casi todos los compartimientos del organismo, otorgándole un papel preponderante en condiciones fisiológicas como el intercambio de fluido capilar, la producción de líquido cefalorraquídeo, el humor acuoso o la endolinfa, lo cual necesariamente ha dirigido la atención a buscar su papel en condiciones patológicas relacionadas como el edema cerebral, el edema pulmonar, el edema periférico o el glaucoma.

AQP 2 Es expresada exclusivamente en membranas apicales en los túbulos colectores corticales y medulares internos. Es la responsable de la permeabilidad apical al agua de este segmento de la nefrona, es inhibida por mercuriales y su actividad es dependiente de hormona antidiurética (ADH). La AQP2 está presente en vesículas intracelulares las cuales son inducidas a la fusión con la membrana externa por la ADH, cuando la hormona no está presente los segmentos de membrana con AQP2 son reinternalizados, al parecer a través de un mecanismo similar a la reinternalización de receptores. La hormona ejerce su efecto a través de la fosforilación mediada por proteína quinasa A (PKA), secundaria a la activación de su receptor de membrana acoplado a proteínas G (regulación a corto plazo), además de promover la expresión de la proteína (regulación a largo plazo). Diversas mutaciones congénitas en el gen que codifica AQP2 y que inducen una alteración en las propiedades fundamentales de la proteína, pueden producir un tipo de diabetes insípida nefrogénica, condición caracterizada por poliuria e incapacidad para concentrar la orina, con las consecuentes pérdida aumentada de líquidos y deshidratación.

AQP 3 Es expresada en membranas basolaterales de los túbulos colectores corticales y medulares internos, coexistiendo con AQP2 en el mismo tipo de células, la función de ambas acuaporinas está acoplada, pues AQP3 es la responsable de la permeabilidad al agua de la membrana basolateral. También puede ser regulada por ADH, pero no es dependiente completamente de su presencia como sucede con AQP2. Esta acuaporina también ha sido encontrada en otros tejidos como epitelios de las vías aéreas, piel y ojo, pero su función en estas células no ha sido estudiada suficientemente, aunque también allí parece participar en la permeabilidad de membranas basolaterales permitiendo el movimiento de agua que ha ingresado a la célula por otra acuaporina apical, de manera similar como sucede en el nefrón distal. Es permeable también a

glicerol, pero el papel fisiológico de esta función no es claro. Es inactivada por disminución de pH y puede ser regulada por fosforilación.

AQP4 Es la acuaporina más abundante en el cerebro, donde fue aislada por primera vez. No es sensible a mercuriales y es activada por fosforilación mediada por diversos sistemas. Es expresada en células astrogliales, incluyendo células ependimarias y endoteliales, pero no ha sido identificada en neuronas. Es muy abundante en regiones osmosensibles, como el núcleo supraóptico del hipotálamo, donde está presente en la región que rodea las neuronas secretoras de ADH, por lo cual se cree que interviene en la regulación de su producción. Interviene también en la producción de líquido cefalorraquídeo, al parecer predominantemente en la absorción por lo cual está implicada en la producción de edema cerebral y otras condiciones relacionadas. También se encuentra en fibras musculares esqueléticas, sobre todo las de tipo rápido, en las cuales se ha encontrado una clara asociación con la función del citoesqueleto. Adicionalmente se ha encontrado en riñón, sobre todo en médula, pero sólo en membranas basolaterales de las células principales del túbulo colector, donde se localiza con AQP3, no es sensible a ADH ni a ninguna otra hormona, allí parece intervenir en el flujo basolateral de agua. Sánchez (2003)

AQP 5 Está localizada en la membrana apical de células epiteliales en múltiples glándulas, tales como las sudoríparas, lacrimales, salivares y submucosas respiratorias, su principal papel fisiológico consiste en regular el flujo de agua hacia la luz glandular. También han sido encontradas en los neumocitos tipo I y su disfunción está relacionada con múltiples enfermedades respiratorias como el asma y la bronquitis crónica. También es expresada en el epitelio corneal, donde contribuye a la hidratación de la córnea y al mantenimiento de la transparencia de esta. Se han

encontrado defectos asociados con esta AQP en pacientes con síndrome de Sjögren, aunque la asociación con esta enfermedad aún no es clara.

AQP6 Se encuentra principalmente en el túbulo colector renal, aunque ha sido hallada en otros tejidos, principalmente epiteliales. Su expresión en riñón está limitada a las células intercaladas, en las cuales se encuentra en vesículas intracelulares, localizada con la H⁺-ATPasa, las cuales pueden incorporarse a la membrana por un estímulo desconocido. Su permeabilidad al agua es baja, no es inhibida por mercurio e incluso puede ser activada por bajas concentraciones de éste. Es regulable por pH, siendo activada por acidificación e inhibida por alcalinización y ha sido demostrado que participa en la secreción de H⁺ por las células intercaladas, importante en el proceso de balance ácido base renal, posiblemente regulando flujos de agua en respuesta a los flujos de protones y otros iones acompañantes durante el proceso de regulación del pH intracelular. También es permeable a algunos aniones, aunque la significancia fisiológica de este hecho no es conocida. Yasui et al (1999)

AQP7 Fue identificada inicialmente en tejido adiposo donde es expresada ampliamente, aunque también parece estar presente en muchos otros tejidos como espermatoцитos y túbulo proximal renal. Es permeable a glicerol y parece ser una ruta alterna para la salida del glicerol producido durante la lipólisis.

AQP8 Está presente exclusivamente en membranas intracelulares, ha sido hallada en células epiteliales del yeyuno, íleon, colon, bronquios y glándulas salivales, además parece estar presente en hepatocitos y testículo. Es la única acuaporina que exhibe permeabilidad a la úrea, pero su función específica aún es desconocida.

Ma et al (1997)

AQP9 Identificada en hepatocitos, células en las cuales parece cumplir su principal papel. Es también permeable a otros solutos de bajo peso molecular y puede funcionar

como una ruta de entrada para glicerol durante la gluconeogénesis. Su función en situaciones de control metabólico extremo podría ser importante para aumentar la fuente de glicerol en el hepatocito, probablemente funcionando en concierto con la AQP7 en tejido adiposo. También es expresada en leucocitos, donde se ha encontrado que es permeable a arsenita, un agente usado en quimioterapia para el tratamiento de ciertos tipos de leucemia mielocítica, por lo cual su expresión en células tumorales podría tener cierta significancia terapéutica.

AQP10 Es la más recientemente descrita, fue hallada en duodeno y yeyuno, pero al parecer se encuentra en epitelios en forma inespecífica, se desconoce su significancia funcional. Hatakeyama et al (2001)

Cuadro III

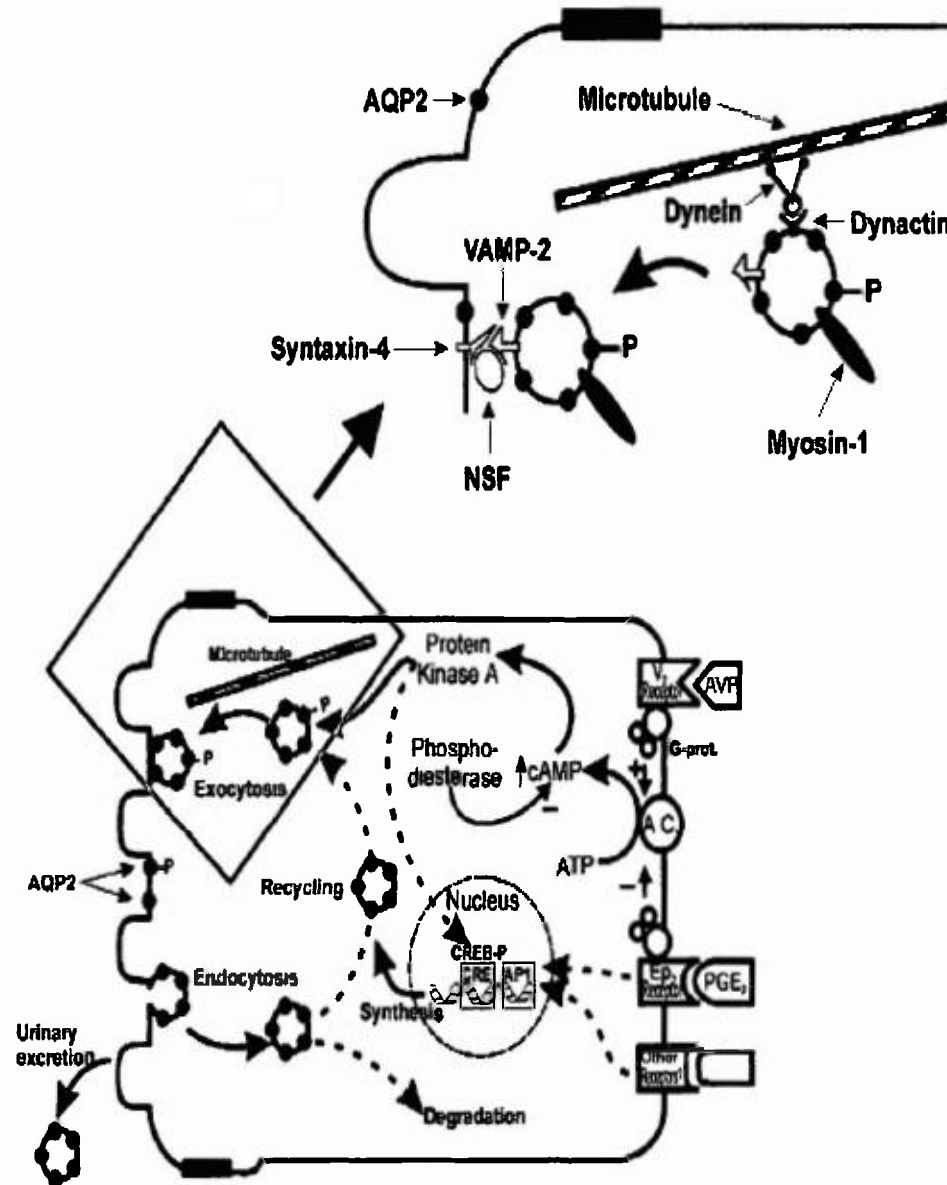
DESORDENES EN EL BALANCE DE AGUA ASOCIADO A DISREGULACIÓN EN LAS ACUAPORINAS

<p>Diabetes insípida nefrogénica adquirida Tratamiento con litio Hipokalemia Hipercalcemia Nefropatía post-obstructiva Obstrucción bilateral de uréteres Obstrucción unilateral de uréteres</p>
<p>Defectos genéticos Diabetes insípida central Diabetes insípida nefrónica hereditaria Ligada al cromosoma X Mutaciones en el receptor de vasopresina 2 (V₂) No ligado al cromosoma X Mutación en el Gen de acuaporina 2 (AQP2) Diabetes insípida severa por incremento en los niveles de fosfodiesterasa – AMP cíclico</p>
<p>Enfermedades o condiciones que cursan con retención de agua Falla cardíaca congestiva Síndrome nefrótico Cirrosis hepática Embarazo</p>
<p>Otras enfermedades Síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética Escape de vasopresina Polidipsia primaria Falla renal crónica Falla renal aguda Dieta baja en proteínas Reducción en la capacidad de concentrar la orina por la edad</p>

Fuente Nielsen 2000

Figura 7

Regulación de AQP2 en las células principales de los túbulos colectores corticales y medulares internos



Fuente Nielsen et al (op cit)

Figura 7

Regulación del “trafficking” (movimiento de la AQP2 desde las vesículas intracelulares hasta la membrana apical) y expresión de AQP2 en las células principales de los túbulos colectores corticales y medulares Arginina Vasopresina (AVP) actúa en los receptores V_2 en la membrana basolateral A través de proteína G_s que activa la adenilciclase, acelerando la producción de AMP cíclico a partir del ATP El AMP cíclico se une a la subunidad reguladora de la protein kinasa A (PKA), cual activa la subunidad catalítica de la PKA La PKA fosforila AQP2 en las vesículas intracelulares y posiblemente otras proteínas de membrana o citosólicas En el cuadro gris, se representa el aparato molecular responsable del “trafficking” La proteína motora de los microtúbulos la Dineína y la dinactina (proteína asociada a la dineína), interaccionan con la miosina-1 (proteína asociada a las vesículas que transportan la AQP2) En la membrana apical se encuentra la sintaxina-4 que interacciona con dos proteínas asociadas a la vesícula intracelular que transporta la AQP2 y estas proteínas son 1) el receptor VAM-2 que está en las vesículas cargadas con AQP2 2) el receptor soluble NSF (n-etilmaleimida-sensitive fusión protein) Esta interacción de la proteína de membrana (Sintaxina-4) con las proteínas citoplasmáticas (VAM-2, NSF) producen la fusión y el anclaje de las vesículas saturadas con AQP2 a la membrana apical de las células principales de los túbulos colectores El AMP cíclico, también puede participar en la regulación a largo plazo, aumentando la expresión de la AQP2 El AMP cíclico incrementa los niveles de la subunidad catalítica de la PKA en el núcleo Se cree que factores transcripcionales fosforilados como la proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico

(CREB) y el c-jun/c-fos, incrementan la transcripción de gen AQP2, resultando en aumento de la síntesis de la proteína AQP2, cual finalmente puede entrar al sistema de “trafficking” (sistema de lanzaderas o “shuttle hypothesis”) en la regulación a corto plazo Nielsen et al (op cit)

Como mencionamos en la introducción de esta tesis, el antecedente que nos motivó a realizar este trabajo nace en el año 2002, cuando realizamos en un modelo de laboratorio, la determinación de parámetros renales en conejos con obstrucción experimental de ambos uréteres Este trabajo de investigación se realizó en la asignatura de Fisiología Avanzada del programa de maestría en la Universidad de Panamá. Amador (op cit)

Es necesario resumir esta investigación pionera de esta tesis, para poder interpretar mejor los resultados y las conclusiones de este trabajo de tesis En el experimento previo, en la asignatura de Fisiología Avanzada, medimos una serie de parámetros renales, utilizando como sujetos a conejos Albinos Newzealand y los dividimos en dos grupos el grupo control sin ligadura de ambos uréteres y el grupo experimental con ligadura de ambos uréteres Los parámetros renales medidos, nos orientan a definir la insuficiencia renal aguda y el desarrollo de síndrome poliúrico (excreción de orina aumentada) (Cuadro IV)

Los objetivos específicos de este trabajo fueron

- 1) Determinar los valores de creatinina plasmática, Na^+ urinario, Na^+ plasmático, fracción de excreción de sodio (FENA), Urea urinaria, Urea plasmática, flujo urinario, Depuración de agua libre, reabsorción de agua libre, osmolaridad urinaria, osmolaridad plasmática, relación osmolaridad o/p, tanto en el grupo control como en el experimental

2.) Realizar la correlación histopatológica mediante microscopía de luz, en los conejos del grupo control y experimental.

Cuadro IV.

PARÁMETROS FUNCIONALES RENALES EN CONEJO SIN (GRUPO CONTROL) Y CON OBSTRUCCIÓN BILATERAL DE URÉTERES (GRUPO EXPERIMENTAL). PROYECTO RENAL.2002.

Parámetros Renales	Control	Obstrucción Ureteral bilateral
Creatinina plasma (mg/dl)	* 0.8	8
Creatinina orina (mg/dl)	* 41.35	18
Relación creat o/p	* 51.69	2.25
Osmolaridad plasmática (mOsm/L)	307	329
Osmolaridad urinaria (mOsm/L)	* 1,000	290
Relación Osmolaridad o/p	* 3.26	0.86
Urea plasmática (mg/dl)	* 24	105
Urea orina (mg/dl)	* 260	40
Na ⁺ orina (mEq/L)	* 6	52
Na ⁺ plasma (mEq/L)	146	139
FENA % (porcentaje)	* 0.08	20
Flujo urinario (ml/min)	* 0.104	0.52
C H ₂ O libre (ml/min/Kg)	* - 0.1	0.03
T ^c H ₂ O libre (ml/min/Kg)	* 0.1	- 0.03
Peso (Kg)	2.44	2.43

* P < 0.05

Fuente: Amador y Garrido (2002).

Se encontró en este proyecto los siguientes resultados, que resumimos a continuación
En el (Cuadro IV) se aprecian todos los parámetros renales medidos tanto en los conejos del grupo control como en el grupo experimental Se obtuvieron valores de significancia estadística entre el grupo control y experimental en relación con los valores de creatininas en o/p, Urea o/p, Na⁺ urinario, FENA, relación Osmolaridad U/P, Osmolaridad urinaria, depuración y reabsorción de agua libre

Con respecto a las alteraciones estructurales en los riñones del grupo control y grupo experimental también se observaron cambios dramáticos en el conejo con ligadura bilateral de los uréteres, encontrándose en el conejo con ligadura bilateral de los uréteres, gran dilatación de túbulo colectores, túbulo proximales, edema glomerular pero, en menor proporción, que en los túbulo renales, compresión glomerular y aumento del espacio capsular (cápsula de Bowman) Estos cambios fueron más severos en la médula que en la corteza renal

En este proyecto evaluamos la importancia del sistema renal en el manejo del medio interno de los mamíferos (conejos) Pudimos observar que en los conejos que ligamos ambos uréteres por 72 horas, luego de liberar la ligadura y re-establecer el flujo urinario se demostraron alteraciones estructurales a nivel de las presiones intratubulares (aumento), con gran dilatación de los túbulo colectores, túbulo proximales y compresión glomerular (aumento de la presión de la cápsula de Bowman), lo que disminuyó la Tasa de Filtración Glomerular manifestándose por aumento considerable de la creatinina plasmática. Además al producirse alteraciones tubulares estructurales se comprometió el funcionamiento normal de los túbulo renales en cuanto a sus propiedades de reabsorción de sodio y agua, provocando las siguientes alteraciones el aumento en la excreción de sodio en orina, aumento en la depuración de agua libre de solutos en orina y disminución de la reabsorción de sodio

a nivel tubular Por último observamos el síndrome poliúrico que desarrollaron los conejos del grupo experimental manifestado por un aumento en la excreción de orina con respecto al grupo control En humanos adultos, se define la poliuria, como una diuresis mayor de 3,000 ml/día. Walsh (2002)

Este efecto desde el punto de vista histomorfológico se evidenció más en las estructuras de los túbulos colectores Según la literatura este efecto de poliuria post obstructiva se relaciona a defectos en la expresión de proteínas en los túbulos renales tanto en la corteza como en la médula renal Estas proteínas son los canales de agua o acuaporinas Los investigadores han encontrado que se afectan las acuaporinas tanto en la membrana apical como en la basolateral Kim et al (2001)

La recomendación final y más importante de este proyecto fue el poder realizar estudios inmunohistoquímicos con marcadores policlonales contra las acuaporinas y poder demostrar la falta de expresión de las diferentes acuaporinas a nivel de los túbulos renales tanto en la corteza como en la médula renal Este fue el objetivo principal de nuestro trabajo de tesis, el montaje de la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales, con el fin de determinar si se expresan o no, los canales de agua en los conejos experimentales y compararlos con el grupo control

Las alteraciones fisiológicas determinadas en este experimento en conejos, con ligadura de ambos uréteres, tiene efectos notables sobre la Tasa de Filtración Glomerular y el Flujo Sanguíneo Renal

La función básica del riñón es la formación de un ultrafiltrado que está libre de proteína y contiene solutos y agua en concentraciones isoosmolares al plasma. Este ultrafiltrado sufre cambios a lo largo de la nefrona, secundario a los procesos de reabsorción y secreción tubular Una vez que estos procesos ocurren, las restantes porciones de los túbulos renales, eliminan la orina formada y se excretara solamente el

1 % de lo filtrado Cuando hay una resistencia al flujo de orina en cualquier lugar del tracto urinario, lo describimos como uropatía obstructiva. El término de nefropatía obstructiva se reserva cuando hay daño en el parénquima renal que resulta de la obstrucción al flujo urinario en cualquier lugar del tracto urinario El término hidronefrosis es derivado del griego Hidro (hydor – agua), nefro (nephros – riñón) y osis (condición) La hidronefrosis es generalmente definida como la dilatación de la pelvis y cálices renales resultado de la obstrucción del flujo urinario La dilatación de la pelvis y cálices renales puede ocurrir sin obstrucción, por lo tanto, esta definición no es exacta. Entonces, el término **hidronefrosis debe ser usado como una definición descriptiva** para nombrar la dilatación de la pelvis y cálices renales.

No debe ser usado como la causa de la dilatación El término uropatía obstructiva e hidronefrosis no debe ser usado en forma intercambiable Walsh (op cit)

Es bien conocido que la obstrucción bilateral del tracto urinario es una causa frecuente de pérdida de la función renal Frokiaer et al (1996) Aunque la obstrucción es potencialmente reversible con el tratamiento de la enfermedad de fondo

En humanos, como ejemplo, podemos mencionar a.) En la uropatía obstructiva secundario al crecimiento excesivo del tejido prostático se produce compresión extrínseca de la uretra prostática. Hay aumento en las presiones dentro del tracto urinario, produciendo alteraciones funcionales importantes a nivel renal, con aumento de la presión dentro de la cápsula de Bowman y disminución notable de la presión de filtración glomerular y caída por consiguiente de la filtración glomerular, alterando la depuración de creatinina (disminución) La excreción de Na^+ urinario aumenta por efecto tubular donde disminuye la reabsorción de Na^+ y también ocurren cambios importantes en la depuración de agua libre (aumento)

En la obstrucción del tracto urinario al producirse la reversión del proceso liberando la obstrucción, se produce un marcado incremento en el flujo urinario que a veces es prolongado y que se asocia con deterioro en la capacidad de concentrar la orina. También es importante mencionar que entre los sujetos (humanos) con obstrucción parcial y crónica del tracto urinario o sujetos con liberación parcial o completa de la obstrucción del tracto urinario, una disminución en la capacidad de concentrar la orina puede ser demostrada Ewald y Mckenzy (2002)

En modelos experimentales de ratas se ha producido lesión renal obstruyendo un solo uréter y se han encontrado cambios significativos en la capacidad de concentración de la orina. Chen et al (2001)

Después de la obstrucción bilateral ureteral, investigadores como Frokiaer et al (op cit), han encontrado disminución en la expresión de la AQP 2 que explica la disminución en la concentración de la orina que desarrollan estos conejos o en los modelos de animales con obstrucción bilateral de los uréteres (ratas)

Se han sometido análisis estadísticos en las diferentes mediciones de los parámetros renales para agrupar los diferentes tipos de falla renal aguda en tres clases

1) Insuficiencia renal aguda Pre-renal 2) Insuficiencia renal aguda. Renal 3) Insuficiencia renal aguda Post-renal El parámetro renal que tiene mayor sensibilidad y especificidad para dividir los diferentes tipos o clases de insuficiencia renal aguda es la fracción de excreción de sodio a nivel urinario (% FENA) Como ejemplo de esto tenemos que valores $> 2\%$ del FENA es indicativo de insuficiencia renal aguda de origen renal o post-renal) y valores $< 1\%$ es indicio de un componente pre-renal (ejemplo deshidratación, hipovolemia o bajo gasto cardíaco)

Ewald y Mckenzy (sup cit)

Las bases fisiológicas sobre la función renal explican las alteraciones encontradas en cada uno de los parámetros alterados en una situación de ligadura bilateral de ambos uréteres. La literatura describe los cambios encontrados en animales experimentales con obstrucción unilateral y bilateral de los uréteres. En ambas situaciones podemos decir que los eventos fisiopatológicos son diferentes. Walsh (op cit)

Cambios fisiopatológicos en la obstrucción bilateral ureteral (OBU) a nivel de:
Flujo Sanguíneo Renal (FSR), Tasa de Filtración Glomerular (TFG) y Presión Ureteral (PU)

El Flujo Sanguíneo Renal, disminuye en forma más significativa en las primeras siete horas en los animales con obstrucción bilateral de los uréteres (OBU) que en los animales con obstrucción unilateral ureteral (OUU). La resistencia vascular renal, aumenta en forma más significativa en los animales con obstrucción bilateral ureteral (OBU) en las primeras siete horas que en los animales con obstrucción unilateral ureteral (OUU). Después de las 24 horas en ambos modelos de obstrucción, ya sea, bilateral o unilateral (OBU) y (OUU), se observan cambios parecidos a nivel del Flujo Sanguíneo Renal y la resistencia vascular renal. Estos cambios son disminución del FSR y aumento de la resistencia vascular renal. En otras palabras después de las 24 horas, los cambios del flujo sanguíneo renal y resistencia vascular renal en ambos modelos de obstrucción son similares. Al comparar la presión ureteral (PU) en los animales con OBU y OUU, se demostró una significativa diferencia después de la 24 horas de obstrucción, con una mayor presión ureteral en los animales con obstrucción bilateral ureteral (OBU). Moody et al (1977). Al usar microesferas radioactivas, en la OBU, se ha determinado que el FSR es mejor distribuido a nivel de los nefrones corticales en un 55% que en las zonas más internas del riñón con solamente un 14% del FSR. Jaenike (1972)

Los animales con OBU pasan a través de una fase de vasodilatación preglomerular y después a una fase de vasoconstricción postglomerular y permanece en este estado. Esto explica la progresiva y persistente elevación en la presión ureteral a pesar de la disminución del FSR y un aumento de la resistencia vascular renal. En contraste, durante la OUU, el riñón pasa a través de tres fases: 1) vasodilatación preglomerular, 2) vasoconstricción postglomerular, 3) vasoconstricción preglomerular.

La Tasa de Filtración Glomerular (TFG) después de las 48 horas con OBU está significativamente disminuida (22% de los valores controles) en comparación con la TFG antes de la obstrucción (preobstrucción) Gulmi et al (1995).

Dal Canton et al (1980) realizó técnica de micropunción en ratas después de 24 horas con obstrucción bilateral ureteral. Observaron una disminución de la TFG en nefrón único, después de la liberación de la obstrucción, en un 40% debajo del valor basal con un aumento de la presión tubular de 14 a 30 mmHg. Hubo pocos cambios en la presión glomerular capilar de 46 a 50 mmHg, antes y después de la obstrucción respectivamente. Hubo un 52% de aumento de la resistencia arteriolar aferente, después de la liberación de la obstrucción, produciendo este efecto, una disminución de la TFG en el periodo post-liberación de la obstrucción. Por lo tanto en ambas situaciones (OBU/OUU) hay una disminución de la TFG después de las 24 horas.

En la obstrucción unilateral ureteral la disminución de la TFG se debe al aumento notable de la resistencia arteriolar aferente. Sin embargo, en la obstrucción bilateral ureteral la disminución de la TFG se debe principalmente al aumento en la presión intratubular, con pocos cambios en la resistencia arteriolar aferente (Cuadro V).

Cuadro V

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS HEMODINÁMICOS GLOMERULARES ENTRE LA OBSTRUCCIÓN UNILATERAL (OUU) Y BILATERAL DE LOS URÉTERES (OBU).

	P_T	P_G	FPAA	R_a	TFG
OOU 24-hr	=	↓	↓↓	↑↑	↓↓
OBU 24-hr	↑↑	=	=	=	↓↓

Fuente: Dal Canton et al. (1980).

FPAA = Flujo plasmático de la arteriola aferente. OBU = Obstrucción bilateral ureteral. OOU = Obstrucción unilateral ureteral. P_T = Presión intratubular.
 P_G = Gradiente de presión hidrostática a través de los capilares glomerulares.
 R_a = Resistencia arteriola aferente. TGF = Tasa de filtración glomerular.

El mediador vasoactivo que explica estos cambios en la OBU a nivel de la hemodinámica del capilar glomerular, tomando en cuenta las fuerzas de Starling del capilar glomerular, es el **Péptido Natriurético Atrial (PNA)**. El péptido natriurético atrial tiene diversos efectos fisiológicos como son: vasodilatación, natriuresis, y diuresis. Las acciones diuréticas y natriuréticas son desencadenadas por 1.) aumento de la TFG a través de la vasodilatación aferente y vasoconstricción eferente. 2.) aumenta el coeficiente de ultrafiltración (K_f) al producir relajación de las células mesangiales. 3.) inhibe la retro alimentación túbulo-glomerular. Todos los cambios observados en la OBU a nivel de el FPR, TFG y PU (presión ureteral); son explicados por la acción del PNA. Cogan (1990). Algunos investigadores, han demostrado niveles elevados de PNA en ratas después de 24 horas de OBU, pero no han encontrado estos valores elevados en ratas con OOU. Fried et al. (1987). El estímulo que produce los niveles elevados de PNA pareciera ser el aumento del

volumen intravascular Este aumento del volumen intravascular, fue determinado por elevación de la presión de oclusión del capilar pulmonar y el aumento de peso corporal en caninos repletados con volumen, a los cuales se le realizó OBU

Gulmi et al (op cit)

Además del PNA, se han encontrado otros mediadores vasoactivos que ayudan a que la caída de la TFG y FPR, no sea tan severa en ratas con OBU Estos agentes son

1) óxido nítrico (NO) 2) factor activador plaquetario (FAP) 3) endotelina. 4) vasopresina. Reyes et al (1992)

Hay diferencias en la función tubular después de la liberación de la ligadura en animales con obstrucción bilateral ureteral (OBU) y obstrucción unilateral ureteral

(OUU) (Cuadro VI) **La OBU produce diuresis postobstructiva y natriuresis** El

PNA está involucrado al igual que a nivel de la hemodinámica del capilar glomerular

La diferencia está en las acciones del PNA a nivel tubular 1) inhibe canales de sodio

en la membrana apical de las células principales de los túbulos colectores corticales

2) inhibe la reabsorción de NaCl en el colector medular por acción directa a través de

GMP cíclico 3) inhibe la secreción de renina y aldosterona. 4) inhibe la acción de la

angiotensina II sobre el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ por lo que el PNA disminuye la

reabsorción proximal de Na^+ 5) En los colectores corticales disminuye la reabsorción

de Na^+ (inhibe la acción de aldosterona) y de agua (inhibe la acción de ADH)

En la OBU hay un aumento en la excreción de potasio debido al aumento en la

disponibilidad de Na^+ , al aumento de la velocidad del fluido endotubular y a los

niveles de potasio en plasma. **Durante la OBU ocurre un deterioro en la capacidad**

de acidificar la orina La disminución en la reabsorción distal de Na^+ contribuye a la

incapacidad del riñón a excretar iones hidrógenos

En los riñones con liberación de ligadura después de OBU, pierden la capacidad de concentrar la orina. Hay un aumento en la depuración de agua libre. En la OBU después de quitar la obstrucción se produce un aumento en la excreción total de solutos. Los sitios más afectados en la OBU son el asa de Henle, los túbulos distales, y túbulos colectores medulares internos. Los mecanismos involucrados que explican la disminución en la capacidad de concentrar la orina son: 1) La incapacidad del intersticio medular en mantener la médula hipertónica. 2) la pérdida de la sensibilidad de los túbulos colectores corticales y medulares internos a la ADH.

Hay una pérdida en la capacidad de reabsorber Na^+ a nivel del segmento grueso del asa de Henle, después de la OBU. Esta afección imposibilita en mantener el intersticio medular hipertónico, por lo cual, disminuye la reabsorción de agua y se pierde la capacidad de concentrar la orina. Walsh (2002)

Cuadro VI.

DIFERENCIAS EN LA FUNCIÓN TUBULAR DESPUÉS DE 24 HORAS DE LIBERADA LA LIGADURA EN LA OBSTRUCCIÓN UNILATERAL (OUU) Y BILATERAL URETERAL (OBU).

	Control	Unilateral	Bilateral
Diuresis postobstructiva		Ausente	Presente
Porcentaje de filtración excretada (V/TFG)	1%	↓ 0.5%	↑ 18%
Fracción excretada de Na ⁺ filtrado	0.6%	↓ 0.4%	↑ 13%
Reabsorción tubular proximal		↓	↓
Reabsorción tubular distal			↓
Fracción de reabsorción proximal	58%	74%	46%
Fracción de reabsorción distal	12%		34%
Fracción de K ⁺ excretada	12.3%	↓ 7%	↑ 90%
Osmolaridad O/P	7.6	1.35	1.47

Fuente: Walsh (2002).

TFG = tasa de filtración glomerular.

P = plasma.

O = orina.

V = volumen.

Definitivamente hay diferencias notables en los parámetros fisiológicos, entre la obstrucción unilateral y bilateral de los uréteres. Esta diferencia es más marcada en la obstrucción bilateral ureteral (OBU).

La técnica que se utilizará en la detección de las acuaporinas renales es la tinción inmunohistoquímica. La **inmunohistoquímica** se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una sustancia que se puede transformar en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno. El complejo antígeno anticuerpo, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa,

antiperoxidasas, fluoresceína, etc), permite ser localizado e identificado dentro de la muestra a estudiar

El fundamento de la inmunohistoquímica es la detección de antígenos expresados en las células (ya sea en su membrana, en el citoplasma o en el núcleo) mediante anticuerpos específicos marcados con un complejo enzimático (avidina-biotina, peroxidasa o fosfatasa alcalina-estreptoavidina) que cuando se expone a un substrato en presencia de un cromógeno, el sitio de reacción antígeno-anticuerpo puede ser visualizado a través del microscopio de luz

La técnica de inmunohistoquímica ha sido utilizada para la investigación desde hace más de 20 años. Varios métodos se han desarrollado para la visualización de los antígenos, entre ellos los más utilizados son el método ABC (complejo Avidina-Biotina) y el de la fosfatasa alcalina. El método ABC fue desarrollado por Hsu y colaboradores en 1981. Este método aprovecha la gran afinidad que tiene la avidina para unirse a cuatro moléculas de biotina y el complejo de tres peroxidasa unidas a la avidina. El cromógeno utilizado como revelador en este método es la diaminobenzidina (DAB), la reacción positiva es de color marrón o café ocre la cual puede variar de intensidad y estar localizada en la membrana, citoplasma o en el núcleo de la célula.

Descripción de la técnica de inmunohistoquímica se realiza por etapas

1) Preparación de las laminillas Las laminillas deberán de ser previamente tratadas con algún adhesivo tisular (poli-L-lisina, silano o Histo Bond que son laminillas ya preparadas), de lo contrario podría desprenderse el tejido, debido al tratamiento a que es sometido la laminilla. No se recomienda utilizar adhesivos proteicos (como es la gelatina) ya que podría existir reacciones cruzadas y

observarse tinción de fondo que afecte la tinción específica.

2) Fijación e inclusión Los fijadores son divididos en fijadores por coagulación y fijadores por intercambio. Los primeros conservan bien la inmunoreactividad de las proteínas como las inmunoglobulinas, los filamentos y los receptores, pero no conservan las proteínas pequeñas, por lo que los aldehídos (formaldehído y glutaraldehído) han probado ser mejores fijadores, ya que preservan las estructuras e inmovilizan los antígenos. El fijador más utilizado es el formol al 10% amortiguado

(formol bufferado) a un pH de 7.4. Es importante mencionar que los tejidos no deben ser sobre fijados, ya que esto causará deterioro de los determinantes antigénicos (6 – 12 horas de fijación es óptima para la mayoría de los tejidos)

La inclusión de los tejidos en parafina se realiza en forma usual, teniendo especial cuidado de regular la temperatura de la parafina y de la platina a menos de 60° C, ya que de lo contrario los antígenos se desnaturalizan. Es importante que los cortes sean desparafinados totalmente, ya que la parafina puede interferir con la reacción antígeno-anticuerpo

3) Hidratación: No se deberá dejar secar la laminilla, ya que para que se lleven a cabo todas las reacciones siguientes, es necesaria el agua.

4) Recuperación antigénica Debido a los procesos de fijación e inclusión en ocasiones el antígeno no puede ser detectado debido a la formación de puentes de hidrógeno como el caso de la formalina. En estos casos pueden utilizarse recuperadores antigénicos los cuales son sustancias químicas o enzimáticas que provocarán la destrucción de estos puentes de hidrógeno devolviéndole sus características antigénicas

5) **Bloqueo enzimático** Debido a que la peroxidasa y la fosfatasa alcalina son enzimas que se localizan en casi todos los tejidos es necesario bloquearlas para evitar reacciones inespecíficas. El bloqueo se lleva a cabo a través de su inutilización, con un sustrato específico. La peroxidasa es bloqueada con peróxido de hidrógeno y la fosfatasa alcalina con levamisol.

6) **Detección** El método ABC (complejo Avidina - Biotina) utiliza para la detección del antígeno presente en el tejido, un anticuerpo específico (anticuerpo primario), posteriormente se agrega un anticuerpo anti IgG el cual está previamente biotinilado (anticuerpo secundario), la biotina se une al complejo enzimático (avidina – peroxidasa) el cual va a activar en el cromógeno aplicador (diaminobenzidina) pudiendo observarse la reacción en el microscopio de luz, con una positividad de color marrón o café ocre.

Uso de controles el uso de controles positivos y controles negativos es la base para determinar, si los anticuerpos en uso y el procedimiento son correctamente llevados a cabo. El **control negativo** es una sección de tejido igual que la del sujeto. Estos proveen de información con respecto a si, el tñido con inmunoperoxidasa es específico o solamente el tñido, es debido a las propiedades contenidas en el tejido. El control negativo lleva todo el procedimiento igual que el tejido en cuestión, excepto el anticuerpo primario, usualmente se sustituye con suero normal de ratón o conejo.

Los **controles positivos** son tejidos usados que contienen el anticuerpo en cuestión y verifican la validez del anticuerpo y el procedimiento usado. Cada anticuerpo necesita un control positivo, ya que cada anticuerpo tiene afinidad por un antígeno en particular. Los controles positivos deben ser tejidos que han sido fijados

adecuadamente para prevenir la destrucción de los antígenos y que haya mejor afinidad al ser ligados con los anticuerpos Anderson y Torraza (2007)

Esta técnica es importante implementarla en la tesis de maestría, debido a que el objetivo principal en esta investigación es el demostrar la presencia o ausencia de canales de agua (acuaporinas – antígeno) en conejos, en una situación experimental luego de inducir una lesión renal Se debe evaluar si hay expresión de estos canales de agua, en los riñones del grupo control y experimental La técnica inmunológica escogida para detectar la reacción antígeno – anticuerpo en esta tesis es la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales contra AQP1, AQP2 y AQP4

Con respecto a los anticuerpos primarios que se pueden utilizar en la técnica de inmunohistoquímica, pueden ser de origen monoclonal y policlonal Un **anticuerpo monoclonal** es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral Los anticuerpos monoclonales, son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir, todos los clones proceden de una sola célula madre Es posible producir anticuerpos monoclonales que se unan específicamente con cualquier molécula con carácter antigénico Este fenómeno es de gran utilidad en bioquímica, biología molecular, fisiología, farmacología y en medicina. Janeway et al (2001)

Si una sustancia extraña (un antígeno) se inyecta en el cuerpo de un ratón o un humano, alguna de las células B de su sistema inmune se transformaran en células plasmáticas y empezarán a producir anticuerpos que se unirán a ese antígeno. Cada célula B produce un solo tipo de anticuerpo, pero diferentes linfocitos B, producirán anticuerpos estructuralmente diferentes que se unen a distintas partes del antígeno. Esta mezcla fisiológica natural de anticuerpos heterogéneos, es conocida como **anticuerpos policlonales.**

Los anticuerpos monoclonales muestran una serie de ventajas sobre los anticuerpos policlonales como 1) Mayor homogeneidad 2) Reproducibilidad de sus efectos, como consecuencia de su homogeneidad 3) Mayor capacidad potencial de seleccionar los mejores anticuerpos en afinidad y tipo de reconocimiento (más específicos) La desventaja de los anticuerpos monoclonales es su complejidad en la técnica de elaboración y su alto costo. Al revisar la literatura, los anticuerpos policlonales son los de mayor uso, en la detección de estos canales de agua, ya sea utilizando la técnica de inmunohistoquímica o inmunoblot (Western blot) Kim et al (2001) La explicación inmunológica del uso de anticuerpos policlonales es por su versatilidad, debido a que permite interactuar el anticuerpo con diversas partes de los epítomos antigénicos de los canales de agua y además las variaciones filogenéticas de los aminoácidos que constituyen los canales de agua, en los mamíferos es despreciable. Hernández et al (2002) Los anticuerpos policlonales que utilizamos anti-AQP son extraídos de conejos y lo compramos en USA por internet a la compañía CHEMICON INTERNATIONAL. Ver anexo (Fig 8), (Fig 9) y (Fig 10)

IV JUSTIFICACIÓN

En Panamá, no se ha realizado ningún trabajo, en la determinación de las acuaporinas renales, ni a nivel de las ciencias básicas, ni a nivel de la clínica. Tampoco se han realizados investigaciones sobre estas acuaporinas en modelos experimentales considerando situaciones fisiológicas y fisiopatológicas, por lo cual este será el primero

Desde el punto de vista de preparaciones de tejido renales en biopsias, no se realizan montajes con anticuerpos policlonales para determinar la expresión renal de las acuaporinas, por lo tanto, la técnica montada en este trabajo será de gran utilidad en nuestro medio

La importancia de las acuaporinas renales en su participación en una amplia gama de enfermedades justifica la realización de este trabajo con el fin de encontrar respuestas en la fisiopatología de dichas enfermedades

El aporte del conocimiento científico a la comunidad académica desde estudiantes, profesores y clínicos sobre la importancia fisiológica de estos canales de agua será de gran valor, al promulgar o diseminar los resultados de este trabajo mediante conferencias y publicación del mismo

En nuestro medio en Panamá, por las característica epidemiológicas de nuestra población y la esperanza de vida al nacer cada vez son más frecuente el tratamiento de enfermedades que afectan el metabolismo del agua y el medio interno como son la

insuficiencia cardíaca congestiva, la cirrosis hepática y la insuficiencia renal Lee et al (2003) Fernández (2003)

Este trabajo sobre acuaporinas abre la posibilidad del uso de los ACUARETICOS en el contexto clínico para mejorar la calidad de vida de estos pacientes que no responde al uso de diuréticos convencionales y requieren el uso de medicamentos que afectan la función de estos canales de agua a nivel renal, por lo cual este trabajo representa un adyuvante al manejo de estas situaciones clínicas donde el paciente requiere mantener un adecuado flujo urinario para evitar complicaciones y reducir la morbi-mortalidad de estos pacientes Costel-Boerring et al (2003)

Al evaluar los pro/contra de la técnica por inmunohistoquímica, debemos tomar en cuenta el costo económico elevado del montaje, utilizando anticuerpos policlonales contra diferentes clases de acuaporinas Esta técnica es costosa por los reactivos que se utilizan y el recurso humano capacitado e idóneo que se requiere Pero si los beneficios son mayores que los costos entonces se justifica realizar este trabajo de tesis para demostrar la utilidad o no de la técnica.

En el año 2003, el Dr Peter Agre investigador y hematólogo de profesión se hizo acreedor del premio Nobel de Química por el descubrimiento del canal de agua llamado CHIP 28 (channel forming – integral protein 28 KDa) en los glóbulos rojos Este trabajo de tesis es de actualidad, considerando que el trabajo que nos inspiro a determinar los canales de agua se realizó un año antes del otorgamiento del premio Nobel de Química al Dr Peter Agre

V OBJETIVOS

5.1 Objetivos generales

- 5.1.1) Determinar la expresión de los canales de agua mediante la implementación de la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos policlonales
- 5.1.2) Integrar la importancia de la expresión renal de las acuaporinas desde el punto de vista fisiológico y fisiopatológico en conejos

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1) Observar las diferencias histológicas entre el grupo control y el grupo experimental mediante la técnica de microscopía de luz
- 5.2.2) Determinar la diferencia en la intensidad de la reactividad de los marcadores Anti-AQP1, anti-AQP2, anti-AQP4 en los riñones del grupo control y experimental
- 5.2.3) Evaluar la utilidad de la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos policlonales en la determinación de la reactividad de AQP1, AQP2 y AQP4 en conejos del grupo control y experimental
- 5.2.4) Adquirir destrezas en el manejo experimental de animales en el laboratorio

VI HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis nula

Ningún cambio significativo se observara tanto a nivel de microscopía de luz, como en la densidad de receptores de AQP1, AQP2, AQP4 en el grupo control (sin ligadura de uréteres) al compararlos con el grupo experimental (con ligaduras de ambos uréteres)

6.2 Hipótesis Alternativa

Sí encontraremos diferencias significativas que se observaran tanto a nivel de microscopía de luz, como en la densidad de receptores de AQP1, AQP2, AQP4 en el grupo control (sin ligadura de uréteres) al compararlos con el grupo experimental (con ligaduras de ambos uréteres)

VII METODOLOGÍA

6.1 Población de referencia

Se utilizaron 8 conejos de raza albina New Zealand obtenidos del bioterio en la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá. (Fig. 11)

Grupo control cuatro conejos, sin ligadura de los uréteres

Grupo experimental cuatro conejos, con ligadura de los uréteres por 72 horas

6.2 Tipo de estudio

Experimental y prospectivo

6.3 Tamaño de la muestra

Se utilizara la formula (22)

$$N = \frac{(p_1q_1) + (p_2q_2)}{(p_1 - p_2)^2} \times f(\alpha, \text{power})$$

p_1 = porcentaje esperado en grupo 1 = 60%

p_2 = porcentaje esperado en grupo 2 = 30%

$q_1 = 1 - p_1 = 40\%$

$q_2 = 1 - p_2 = 70\%$

α = nivel de significancia = 0.05

poder = 0.8

$f = 7.9$

N = 40 conejos por grupo (Grupo control 40 y experimental 40)

Es importante mencionar que por convención internacional de la sociedad protectora de animales se utilizaron en nuestro experimento 8 conejos, cuatro en el grupo control y cuatro en el grupo experimental

6.4 Criterios de selección

6.4 (a) Criterios de inclusión

- 1) Conejos “sanos” obtenidos del bioterio
- 2) Conejos con un peso > 2.4 Kg

6.4 (b) Criterios de exclusión

- 1) Conejos enfermos
- 2) Conejos con un peso < 2.4 Kg

6.5 Materiales

Utilizaremos equipo completo de disección anatómica, mesa de disección anatómica, lámpara de luz para iluminación, gasas, algodón, jeringas de 3 ml con agujas # 21-23, bisturí con mango, alcohol xylol al 70% para vasodilatar vena marginal de la oreja del conejo, seda 0000 para ligadura de uréteres y seda 00 para suturar piel, cánulas de polietileno(PE-10) para canular vena marginal de la oreja, anestésicos (ketamina, zylaxina), lactato de ringer para hidratación I V , guantes estériles , Ceftriaxone 50 mg/ Kg de peso (antibiótico I M.), jaula para conejos con alimento y agua para hidratación oral ab-libitum del conejo

Se utilizarán frascos de formalina bufferada en donde se depositaran los riñones de los conejos sacrificados con el fin de realizar los cortes histológicos, evaluarlos en microscopia de luz y luego realizarles las pruebas de inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales (Fig 12)

6.6 Preparación de conejos

Los conejos serán pesados previamente y si el peso es > 2.4 Kg, se procederá con la aplicación de anestesia I M con Ketamina a dosis de 50 mg/Kg de peso y Zylaxina a dosis de 4 mg/Kg de peso , obteniendo anestesia profunda a los 15-20 minutos de aplicada y si el animal requiere más anestesia se le aplicara 25% de la dosis inicial por vía I V cada hora (según la duración de la cirugía)

Se procederá a rasurar el conejo en ambas orejas para exponer la vena marginal de la oreja, luego se rasurará el vientre del conejo, se realizará la cirugía vía abordaje abdominal en donde se ligarán los uréteres y luego se cateterizará la vena marginal de la oreja con una cánula PE-10 y se le conectará a una solución Lactato de Ringer a goteo lento (Fig 13) y (Fig 14)

6.6 (a) Alimentación

Previa cirugía serán alimentados por igual, el grupo control y experimental, su hidratación también será igual en ambos grupos Después de la cirugía al despertar de la anestesia ambos grupos (control y experimental) serán manejados por igual con respecto a su alimentación e hidratación ab-libitum

6 6 (b) Anestesia

Ketamina 50 mg/Kg, Zylacina 4 mg/Kg I M y luego infusión / hora por vena marginal de la oreja a una dosis del 25 % de la dosis inicial

6 6 (c) Técnica de ligadura de uréteres

Después de rasurado el abdomen y en plano profundo de anestesia, se procederá a disecar por planos el abdomen del conejo hasta llegar al sitio anatómico de ambas fosas renales, se procederá a ligar ambos uréteres con seda 0000 a nivel del 1/3 proximal de ambos uréteres y luego se procederá a cerrar el abdomen del conejo por planos con seda 00 Se realizarán dos incisiones una en cada región abdominal (derecha e izquierda) para ligar sus respectivos uréteres (Fig. 15) y (Fig 16)

6 6 (d) Recolección de muestras

Extracción de los riñones de conejos (Fig 17), (Fig 18) y (Fig 19) En la recolección de los riñones del conejo experimental al cual se le ligarán ambos uréteres se esperará 72 horas y luego se reoperarán para desligar ambos uréteres, finalmente se sacrificara el animal con inyección de KCL A los conejos del grupo control se les sacrificará al mismo tiempo, para obtener sus riñones y realizar los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos pertinentes Las muestras de los riñones del grupo control y experimental se sumergieron en un frasco con formalina bufferada.

6.7 Técnica de inmunohistoquímica

Nos ayudara a **determinar la reactividad de las AQP1, AQP2 y AQP4 en conejos New Zealand** utilizados como sujetos tanto en el grupo control y experimental, con la **intención de evaluar la expresión de estas AQP en situación normal y en una situación patológica**. Se utilizarón anticuerpos policlonales anti-AQP1, anti-AQP2 y anti-AQP4 de marca **CHEMICON INTERNACIONAL (ver anexo) (Fig 20)**

Aspectos técnicos

Se realizó control negativo sin utilizar anticuerpo policlonal anti-AQP y solamente se utilizó el anticuerpo secundario (anti-IgG o antisuero de cabra tipo **BIOTINYLATED LINK**)

Se realizó control positivo utilizando la **técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo anti-AQP** y se demostró viabilidad de los anticuerpos policlonales

Dividimos el protocolo de inmunohistoquímica en tres fases

PRIMERA FASE PREPARACIÓN DEL TEJIDO PRE-INMUNOHISTOQUÍMICA

- 1) Se corta el tejido que está en formalina bufferada (talla del tejido) no más de 2 cm cuadrados y no más de 4-5 mm de espesor
- 2) Se coloca el tejido tallado en su respectivo cassette o anillo
- 3) Se coloca la muestra, en el procesador de tejido que es un aparato que contiene formalina 10 % bufferada - alcohol 70- 80 y 95% - alcohol isopropilico (alcohol absoluto 100%) – xilol (sirve para que penetre la parafina al tejido) – parafina. Se coloca en el procesador 12 horas (overnight)

Procesador de tejido, tiene las siguientes funciones a) Fijación formalina bufferada
b) Deshidratación alcoholes en forma progresiva c) Aclaramiento se agrega xilol para que penetre la parafina. d) Infiltración con parafina para hacer más denso el tejido

4) Se hace un bloque con parafina y se orienta el tejido Se usa parafina liquido previa colocación del tejido en el cassette o anillo, luego se deja enfriar, se solidifica la parafina y luego se procede a realizar el corte en el micrótopo del tejido a un espesor de 2 micras Parafina es cuando uno hace los cortes en el microtopo y es para sostener y extender el tejido

5) Se coloca el tejido parafinado en agua destilada en el flotador de tejido a una temperatura de 39-40 grados centígrados

6) Se recoge el tejido parafinado en el flotador y se coloca en una laminilla polarizada (carga positiva para evitar el desprendimiento del tejido de las laminillas durante el proceso de inmunohistoquímica)

7) Se escurre la laminilla para eliminar el exceso de agua del tejido parafinado (30 minutos)

8) Se hornea el tejido a 58 grados centígrados durante 30 minutos a una hora.

Función de hornear es fijar el tejido a la placa y desparafinar

9) Se deja enfriar y se procede a quitar los restos de parafina con varios cambios de xilol y luego se rehidrata con cambios de alcohol absoluto (isopropilico) – alcohol al 95% - y finalmente hasta llegar al agua destilada.

SEGUNDA FASE RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA.

1) Recuperación antigénica la formalina esconde los antígenos de los tejidos por su propiedad química de aldehído que forman puentes de hidrógenos Para

desenmascarar dichos antígenos usamos un recuperador de antígenos (Epitope Retrieval Solution (ERS) (x 10) – Dako®) se prepara 25 cc ERS se afora con agua destilada hasta 250 cc

Se coloca la solución ERS preparada al 10% en el baño de agua destilada hasta una temperatura de 95 grados centígrados y luego se coloca las laminillas ya rehidratadas dentro de la solución ERS por 40 minutos

Enfriamiento Se saca el envase con ERS y las laminillas dejándolas enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente

Se realizan lavados con solución bufferada (Wash Buffer x10, Dako®) con el objetivo de mantener las laminillas en un pH óptima y a la vez lava la solución ERS (ERS es un citrato bufferado 0.1 mol/L)

TERCERA FASE PROCEDIMIENTO DE INMUNO TINCIÓN

1) Se hace un tratamiento de 5 minutos con H₂O₂ para bloquear la actividad endógena de la enzima peroxidasa. (Una característica propia de todos los tejidos es tener peroxidasa, ya que deben ser bloqueadas estas enzimas para evitar reacciones inespecíficas o falsos positivos)

2) Lavar con agua destilada

3) Lavar con el Wash Buffer Dako® por 5 minutos

4) Incubar con los anticuerpos AQP1 (CHEMICON, 1 200), AQP2 (CHEMICON, 1 300) y AQP3 (CHEMICON, 1 300) por 30 minutos

1 200 ejemplo (5 microlitros de AQP1 concentrado + 995 microlitros de Diluyente de anticuerpos Dako® con reducción de background)

1 300 ejemplo (3.3 microlitros de anticuerpo concentrado + 996.7 microlitros de Diluyente Dako®)

- 5) Lavar con el Wash Buffer Dako® por 5 minutos
 - 6) Incubar con BIOTINYLATED LINK (Biotinylated anti-rabbit, anti-mouse y anti-goat immunoglobulins en una solución salina de fosfato buferada (PBS) contiene una proteína estabilizadora y 0,015 mol/l de sodium azide, Dako) por 15 minutos
(sistema de detección que son dos El biotinilado y el streptavidina)
 - 7.) Lavar con el Wash Buffer por 5 minutos
 - 8) Incubar con STREPTAVIDIN-HRP (Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS contains stabilizing protein and an antimicrobial agent, Dako) por 15 minutos
 - 9) Lavar con el Wash Buffer Dako® por 5 minutos
 - 10) Seguido de una incubación de un substrato de peroxidasa de diaminobenzidina (DAB, Dako) por 5 minutos (cromógeno)
 - 11) Lavar con agua destilada.
 - 12) Lavar con el Wash Buffer por 5 minutos
 - 13) Contrastar con hematoxilina (Dako) por 8 minutos
 - 14) Lavar con agua destilada.
 - 15) Se deshidratan las laminillas con alcoholes degradados hasta llegar a xilol y se procede a montar con Permunt (resina para fijar bien el portaobjeto a las laminillas)
- Nota Método ABC (complejo avidina-biotina) Este método aprovecha la gran afinidad que tiene la avidina para unirse a cuatro moléculas de biotina y el complejo de tres peroxidases unidas a las avidinas

CUARTA FASE MONTAJE FINAL

Se procedió a montar las laminillas o porta objetos con sus respectivas muestras y con las tunciones inmunohistoquímicas realizadas para detectar la reactividad de los

marcadores contra las diferentes AQP (AQP1, AQP2 y AQP4) al microscopio de luz con poderes de 10x y 40x (ver anexo) (Fig 21)

Por último, es importante mencionar que las muestras renales de los conejos controles y experimentales fueron evaluadas también, con tinción de hematoxilina - eosina por medio del microscopio de luz con poderes de 4X, 10x, 20X y 40x (ver figuras 14, 15, 16 y 17) con el fin de observar los cambios estructurales presentados en los riñones sin ligadura (grupo control) y con ligadura (grupo experimental) de los uréteres

6.8 Análisis de los datos

Las variables cuantitativas se analizaron utilizando t-student por el número de muestra menor de 30

Se realizó una escala semicuantitativa a partir de una variable cualitativa como es el color marrón. Debido a que la intensidad del color marrón es variable de acuerdo a la inmunoreactividad específica del anticuerpo policlonal contra AQP1, AQP2 y AQP4

Es importante mencionar en los análisis de los datos que cada anticuerpo policlonal de conejo es tipo – específico de acuerdo a la AQP contra la cual reacciona, manifestada por un color marrón a nivel de las células involucradas que expresan los diferentes tipos de AQP renales. De manera que usamos tres tipos de marcadores en este experimento, que son los anticuerpos de conejos anti-AQP1, anti-AQP2 y anti-AQP4

Según la intensidad del color marrón asignamos la siguiente escala semicuantitativa

0 a +++ con las siguientes características

0 = ausencia de reactividad del marcador

1+ = débil reactividad del marcador

2+ = moderada reactividad del marcador

3+ = fuerte reactividad del marcador

Esta escala semicuantitativa tiene el objetivo de evaluar la reactividad de los marcadores de AQP detectados con la técnica de inmunohistoquímica, tanto a nivel de la corteza como en la médula renal

La reactividad del marcador es directamente proporcional a la intensidad del color marrón obtenido en los cortes histológicos de los riñones, en los conejos del grupo control y experimental

Los cambios estructurales se evaluaron de acuerdo a las alteraciones túbulo-glomerulares observadas en el grupo control y experimental con el microscopio de luz y con la tinción de hematoxilina-eosina.

VIII RESULTADOS

Obtuvimos los diferentes pesos de los ocho conejos sin obtener significancia estadística antes de la ligadura ureteral, entre el grupo control y el grupo experimental con una $p = 0.34$ (Cuadro VII)

Cuadro VII

PESO EN KILOGRAMOS EN LOS CONEJOS DEL GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD NACIONAL DE PANAMÁ. AÑO 2006

(a) Grupo control	Peso (Kg)	(a) Grupo experimental	Peso (kg)
Conejo 1	2.5	Conejo 1	2.42
Conejo 2	2.7	Conejo 2	2.8
Conejo 3	2.7	Conejo 3	2.7
Conejo 4	2.8	Conejo 4	2.7

(a) $p = 0.34$

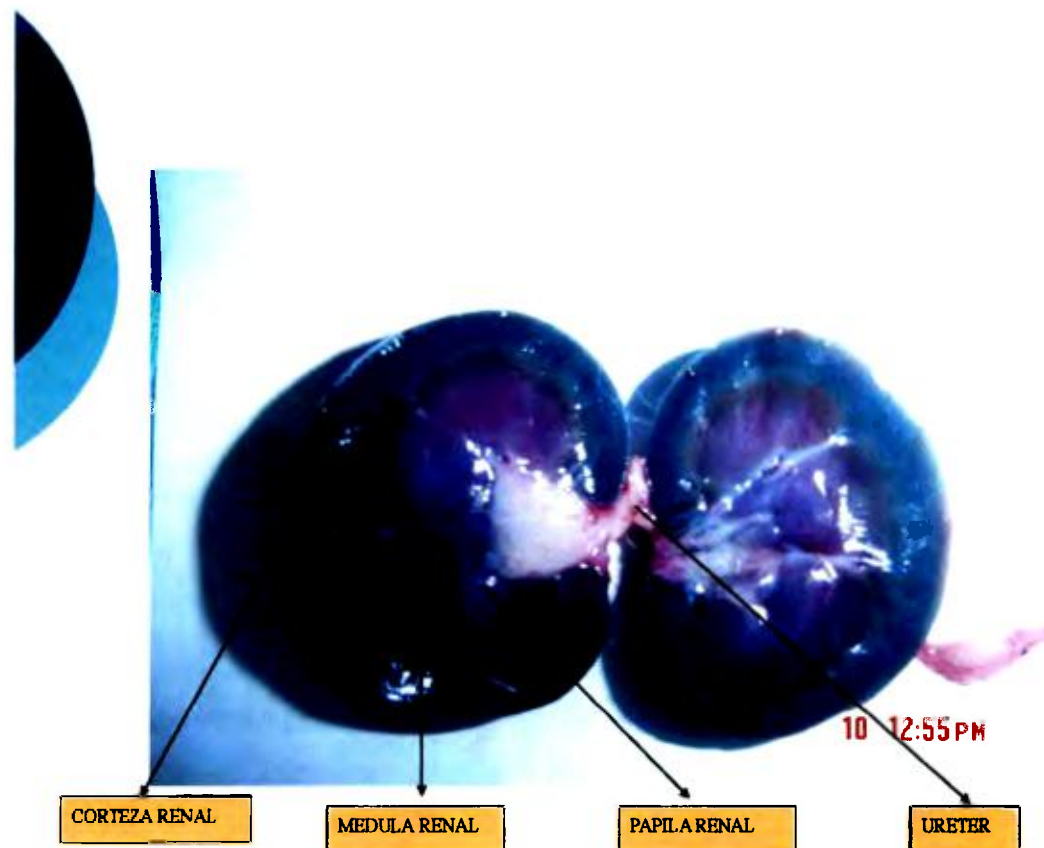
Fuente Laboratorio de Fisiología. Año 2006

En el grupo control, sin ligadura no se observó cambios morfológicos, de palidez, congestión, edema y áreas isquémicas; como se observó en el grupo experimental.

(Fig. 22).

Figura 22.

Vista macroscópica de la corteza, medula y papila renal en el conejo control (sin ligadura). Proyecto Renal. 2002.



Fuente: Foto tomada en el Laboratorio de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Panamá. Año: 2002.

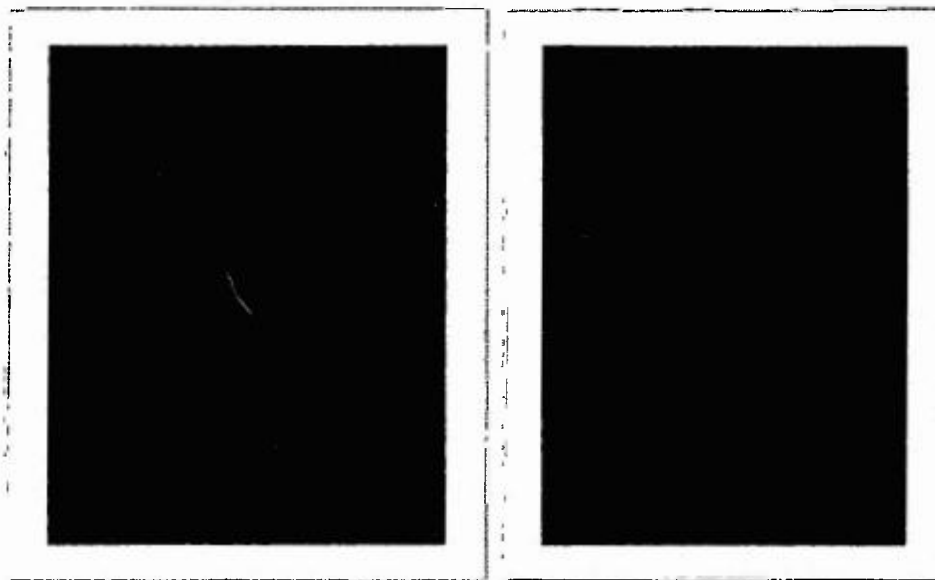
Nota: En las flechas se señalan las diferentes partes anatómicas de un riñón de conejo normal.

Los cambios macroscópicos observados en el grupo experimental fueron

- 1) **Hidronefrosis** como se pudo observar al extraer el riñón en el grupo experimental, a las 72 horas de la ligadura. (Fig 18) y (Fig 23)
- 2) **Áreas pálidas isquémicas** más acentuadas a nivel medular que cortical (Fig 23)

Figura 23

Hidronefrosis con cambios isquémicos en riñón de conejos del grupo experimental (con ligadura de 72 horas)



Fuente Foto tomada en el Laboratorio de Fisiología. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional de Panamá. Año 2006

Nota Los riñones se observan ligeramente aumentados de tamaño, edematosos y congestivos Al corte, la superficie brillante edematosa, congestiva que alterna con áreas pálidas isquémicas Se observó mayor área de isquemia a nivel medular que cortical

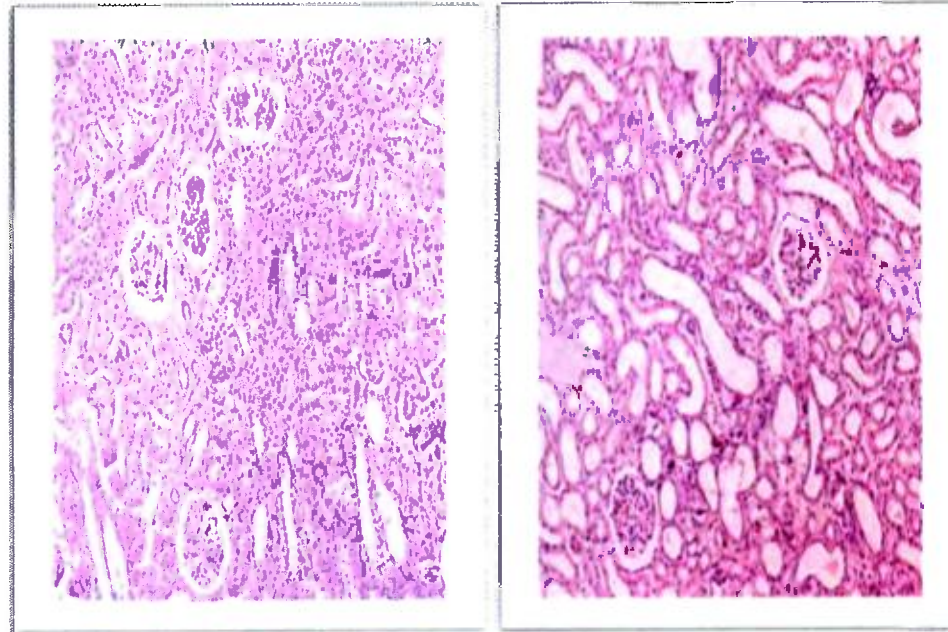
Al evaluar los cambios en microscopia de luz con tinción de hematoxilina y eosina se observaron grandes cambios y diferencias estructurales entre los riñones de los conejos del grupo control y experimental (Fig 24),(Fig 25),(Fig 26) y (Fig 27)

Figura 24.

Histología comparativa entre el grupo control y experimental a nivel de la corteza renal con un poder en microscopia de luz de 10x.

Grupo control
(no ligadura)

Grupo experimental (a)
(con ligadura)



Fuente: Fotos tomadas en el Laboratorio de Patología. CMN. Año: 2006.

(a) Observe la pérdida en la arquitectura normal de la corteza renal en los riñones del grupo experimental (con ligadura de los uréteres). Tinción hematoxilina-eosina.

Grupo control: Se reconoce corteza renal con glomérulos de tamaño normal con celularidad conservada. Los glomérulos están rodeados por túbulo proximales revestidos por células epiteliales tubulares con borde en cepillo conservado y lumen tubular de diámetro normal. Se observan además túbulo distales de apariencia normal. Túbulointersticio bien conservado sin atrofia tubular ni fibrosis intersticial. Arterias y arteriolas bien conservadas.

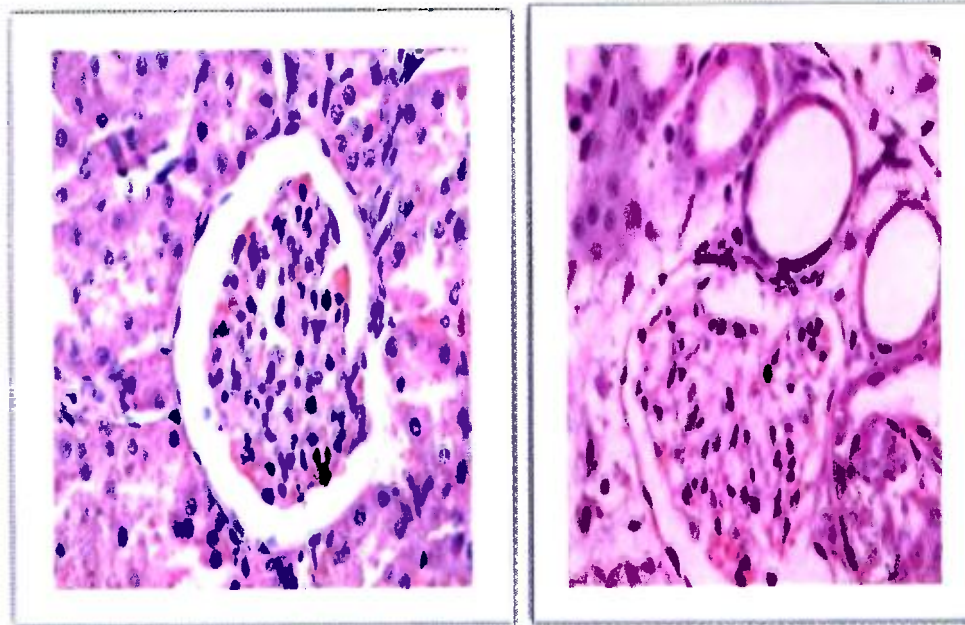
Grupo experimental: Glomérulos conservan su tamaño normal; sin embargo, se observa marcada dilatación de los túbulo distales y proximales, hallazgo histológico que sugiere obstrucción (hidronefrosis).

Figura 25.

Histología comparativa entre el grupo control y experimental a nivel de la corteza renal con un poder en microscopia de luz de 20x.

Grupo control (a)
(sin ligadura)

Grupo experimental (b)
(con ligadura)



Fuente: Fotos tomadas en el Laboratorio de Patología. CMN. Año: 2006.

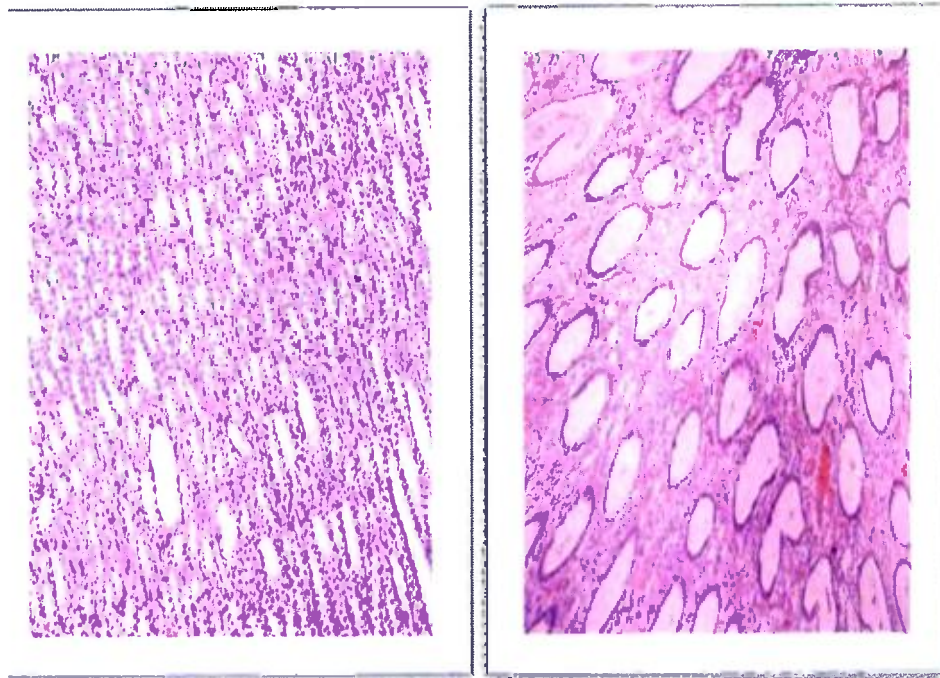
- (a) Patrón histológico normal a nivel cortical. Corteza renal con glomérulo de apariencia, tamaño y celularidad normal. Túbulos distales y proximales bien conservados.
- (b) Se observó gran dilatación de los túbulos proximales, ligero edema intersticial en el grupo experimental. Se observa cambios en el intersticio glomerular de edema.

Figura 26.

Histología comparativa entre el grupo control y experimental a nivel de la medula renal con un poder en microscopia de luz de 10x.

Grupo control (a)
(sin ligadura)

Grupo experimental (b)
(con ligadura)



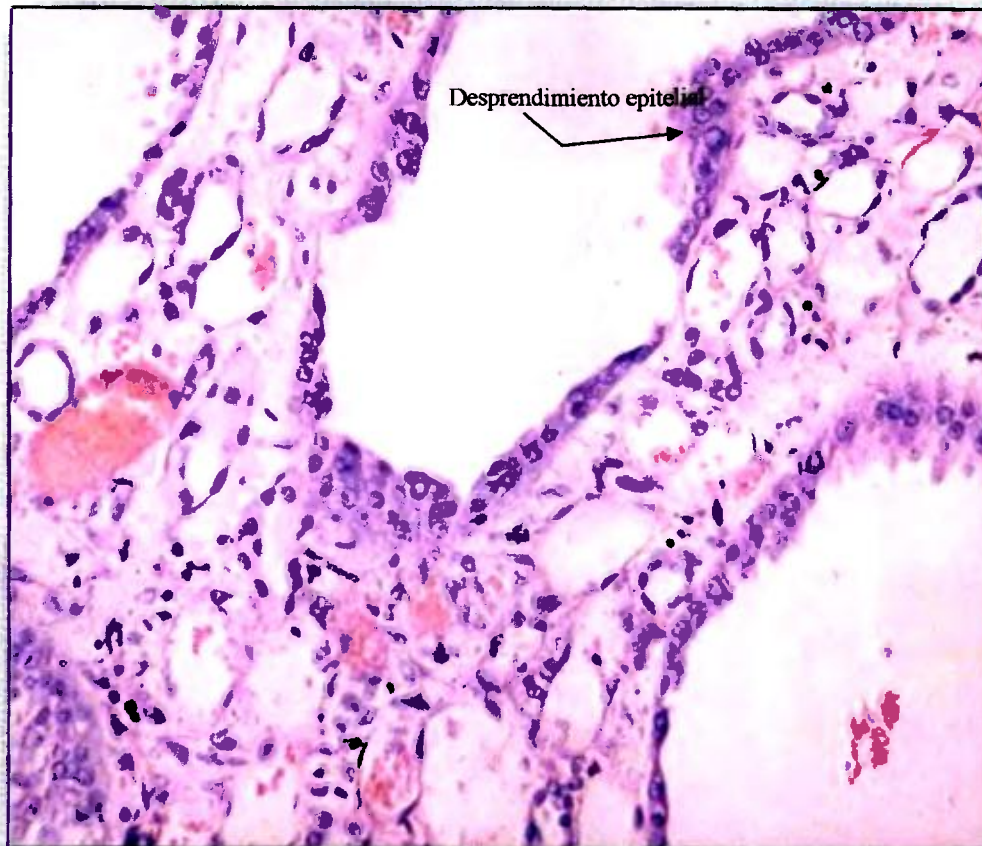
Fuente: Fotos tomadas en el Laboratorio de Patología. CMN. Año: 2006.

- (a) Patrón histológico normal a nivel medular con túbulo colectores revestidos por epitelio tubular normal. Intersticio bien conservado sin edema ni fibrosis.
- (b) Se observó la pérdida de la arquitectura normal de la medula renal con marcada dilatación de los túbulo colectores distales, edema intersticial y congestión vascular capilar.

Figura 27.

Lesión tubular aguda a nivel de la medula renal en los conejos del grupo experimental, con un poder por microscopia de luz de 40x.

Grupo experimental (a)
(con ligadura)



Fuente: Fotos tomadas en el Laboratorio de patología. CMN. Año: 2006.

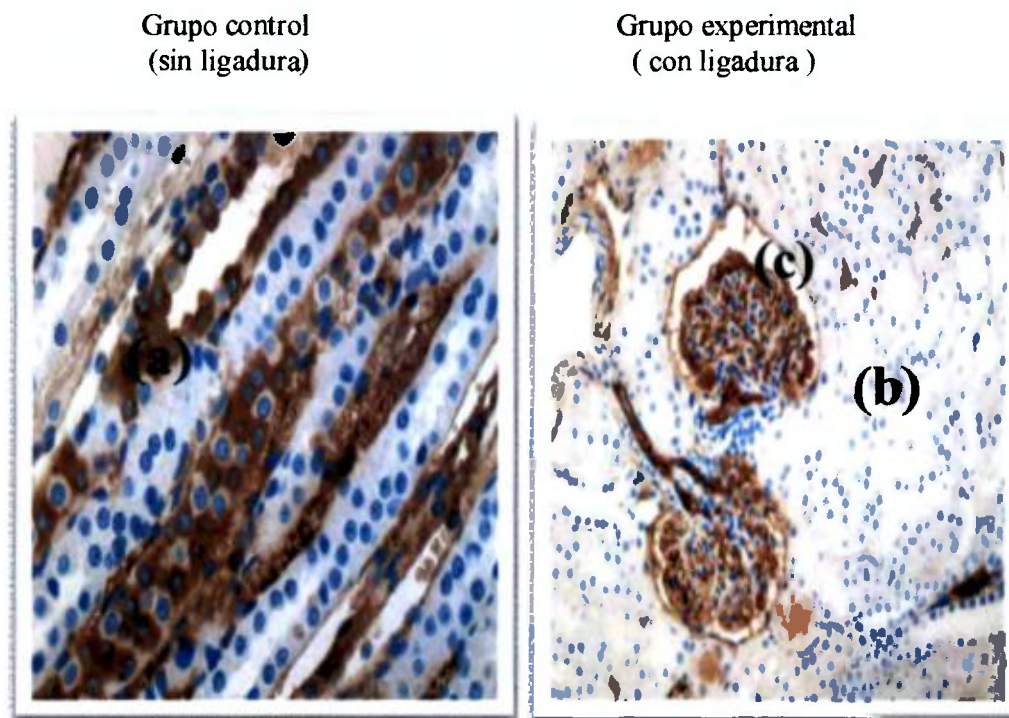
(a) Se observó marcada dilatación de los túbulos colectores medulares y de los vasos rectos. Intersticio con edema intersticial y congestión capilar. Hay desprendimiento focal del epitelio tubular a nivel de los túbulos colectores medulares (ver la flecha).

Al realizar los análisis con la técnica de inmunohistoquímica y evaluar la reactividad de los marcadores policlonales que son anticuerpos anti- AQP1, AQP2 y AQP4 en los riñones de los conejos del grupo control y experimental; observamos

diferencias significativas con respecto a la intensidad de reactividad de los marcadores dependiendo de la clase de anticuerpos policlonales utilizados y del grupo de sujetos estudiados (Fig. 28), (Fig. 29) y (Fig. 30).

Figura 28.

Reactividad inmunohistoquímica del marcador anti-AQP1 en la corteza renal de conejos a nivel de los túbulos proximales del grupo control y el grupo experimental; con un poder por microscopia de luz de 40x.

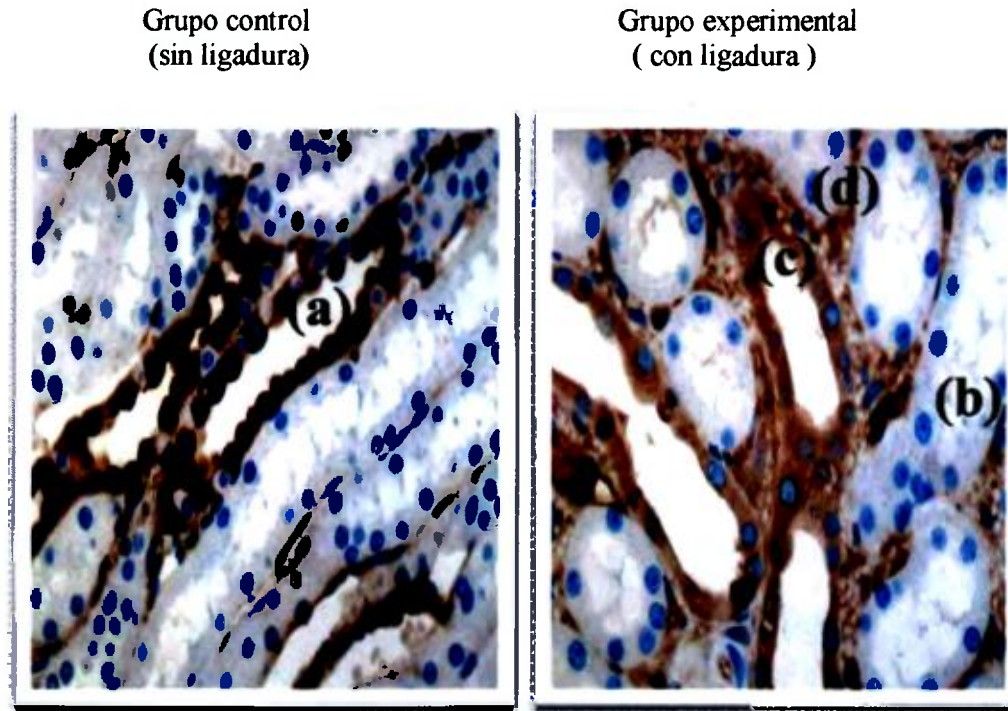


Fuente: Laboratorio de Patología del Hospital Oncológico Nacional. Año: 2006.

- (a) Observe la intensidad del marcador anti-AQP1 en los túbulos proximales (TP) del grupo control, con una escala de 3+; además se puede ver la intensidad en la MA y MB de los túbulos renales.
- (b) Ausencia de reactividad e intensidad del color marrón en el área de los túbulos proximales y TP del grupo experimental con una escala de 0 de intensidad.
- (c) Inmunoreactividad a nivel de los glomérulos renales en condiciones patológicas con una intensidad de 3+.

Figura 29.

Reactividad inmunohistoquímica del marcador anti-AQP2 en la medula renal de conejos a nivel de los túbulos colectores corticales en el grupo control y experimental; con un poder por microscopia de luz de 40x.

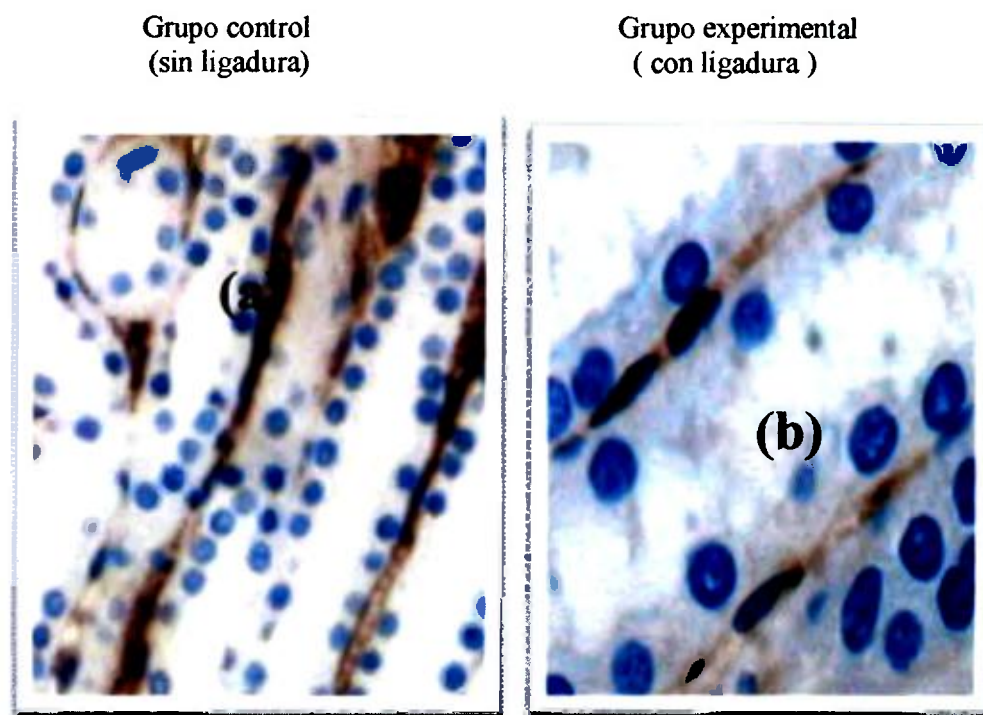


Fuente: Laboratorio de Patología del Hospital Oncológico Nacional. Año: 2006.

- (a) Observe la intensidad del marcador anti-AQP2 en los túbulos colectores corticales (TCC) del grupo control con una escala de intensidad 3+; además se puede ver la intensidad mayor en la membrana apical de los TCM.
- (b) En el grupo experimental observamos ausencia de reactividad e intensidad del color marrón en el área de los TCC con una escala de 0 de intensidad.
- (c) Inmunoreactividad a nivel de escasos TCC 3/11 con una intensidad de 1+ y sin poder diferenciar claramente el marcador a nivel de la membrana apical (MA) y membrana basolateral (MB).
- (d) Observe la tinción de fondo marrón o “background” a nivel del intersticio renal.

Figura 30.

Reactividad inmunohistoquímica del marcador anti-AQP4 en la medula renal de conejos a nivel de los túbulos colectores medulares en el grupo control y experimental; con un poder por microscopia de luz de 40x.



Fuente: Laboratorio de Patología del Hospital Oncológico Nacional. Año: 2006.

- (a) Observe la intensidad del marcador anti-AQP4 en los túbulos colectores medulares (TCM) del grupo control con una escala de intensidad 2+; además se puede ver la intensidad mayor en la membrana basolateral (MB) de los TCM.
- (b) En el grupo experimental observamos una débil reactividad e intensidad del color marrón en el área de los TCM a nivel MB con una escala de 1+ de intensidad.

Cuadro VIII

REACTIVIDAD DEL MARCADOR ANTI- AQP1, AQP2 Y AQP4 DE ACUERDO A LA LOCALIZACIÓN RENAL DE LAS AQP EN LOS CONEJOS DEL GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL DEPARTAMENTO FISIOLÓGIA UNIVERSIDAD NACIONAL DE PANAMÁ AÑO 2006 (a)

GRUPO CONTROL (4)	(b) AQP1	AQP1	AQP2	AQP4
EXPERIMENTAL (4)	(c) TP	Glomérulo	(d) TCC	TCM
1 CONTROL	3+	0	3+	3+
1 EXPERIMENTAL	0	3+ ???	0 - 1+	0 - 1+
2 CONTROL	3+	0	3+	3+
2 EXPERIMENTAL	0	3+ ???	0 - 1+	0 - 1+
3 CONTROL	3+	0	3+	3+
3 EXPERIMENTAL	0	3+ ???	0 - 1+	0 - 1+
4 CONTROL	3+	0	3+	3+
4 EXPERIMENTAL	0	3+ ???	0 - 1+	0 - 1+

Fuente Datos obtenidos del trabajo de tesis

(4) se refiere al número de población en el grupo control y experimental

(a) 0 = no reactividad, 1+ reactividad débil, 2+ reactividad moderada y 3+ reactividad fuerte

(b) AQP = abreviatura de acuaporina

(c) TP = túbulo proximal

(d) TCC = túbulo colector cortical

(e) TCM = túbulo colector medular

(f) ??? = Desconocimiento científico de este hallazgo

Los resultados del (Cuadro VIII) se interpretan de la siguiente forma

1) Al usar anticuerpos policlonales contra AQP1 en el grupo control observamos

fuerte reactividad a nivel de los túbulo proximal con una intensidad de 3+

En el grupo experimental observamos una ausencia de la reactividad de estos marcadores anti-AQP1 en los túbulos proximales (TP) con una escala de intensidad de 0 Hubo una excepción en los glomérulos renales que marcaron con anticuerpos anti-AQP1 con una intensidad de 3+ (Fig 28)

2) Al utilizar anticuerpos policlonales anti-AQP2 en el grupo control observamos fuerte reactividad en los túbulos colectores corticales (TCC) sobre todo a nivel de la membrana apical con una intensidad de 3+ En el grupo experimental se observó una ausencia o disminución de reactividad de estos marcadores anti-AQP2 con una intensidad de 0 a 1+ (Fig 29)

3) Finalmente al usar los anticuerpos policlonales anti-AQP4 en el grupo control observamos fuerte reactividad en los túbulos colectores medulares sobre todo a nivel de la membrana basolateral En el grupo experimental, se observó reactividad débil del marcador de AQP4 con una intensidad de 1+ (Fig 30)

IX DISCUSIÓN

Todos los conejos sobrevivieron durante las 72 horas necesarias del experimento. No hubo complicaciones durante la anestesia, en ninguno se desarrolló infección, ni complicaciones relacionadas al procedimiento quirúrgico de ligadura de los uréteres y por último, se extrajeron los riñones de los conejos del grupo control y experimental sin complicaciones.

Las diferencias macroscópicas observadas entre los riñones de los conejos del grupo control y experimental, se debe al aumento de la presión hidrostática intratubular secundario a la ligadura de ambos uréteres donde observamos hidronefrosis importante (edema severo del tejido renal) en los conejos del grupo experimental, mientras en el grupo control no evidenciamos edema ni hidronefrosis debido a la ausencia de ligadura de ambos uréteres. A nivel macroscópico se evidenció áreas de isquemia en el tejido renal producto de la disminución del flujo sanguíneo renal, secundario a la respuesta bifásica de la obstrucción ureteral bilateral con vasoconstricción postglomerular sostenida. Walsh (2002)

Este experimento explica científicamente las alteraciones que observamos en el estudio preliminar realizado en el año 2002 en el laboratorio de fisiología donde observamos un síndrome poliúrico en el conejo experimental luego de liberarlo de la obstrucción ureteral bilateral mantenida por 72 horas. Estas alteraciones se deben a la ausencia o disminución de los canales de agua llamados acuaporinas, tal como lo pudimos demostrar en nuestro experimento, al inducir isquemia renal debido al

aumento de la presión intratubular, secundario a la obstrucción bilateral de los uréteres, en donde la isquemia renal disminuye la síntesis celular de estas proteínas que se anclan en la membrana celular tanto a nivel apical (AQP2), como basolateral (AQP4), en las células principales de los túbulos colectores corticales y medulares, con el fin de facilitar el paso de agua a través de una vía transcelular (desde la membrana apical hasta la basolateral) y finalmente ser llevadas las moléculas del agua al capilar tubular y de aquí a la circulación sistémica. Por supuesto esto no ocurre en los conejos experimentales y se desarrollará finalmente un síndrome poliúrico al liberarlos de la obstrucción ureteral Amador y Garrido (2002) Es importante mencionar el papel de AQP1 a nivel de los túbulos proximales y segmento descendente del asa de henle en la absorción de agua, como sabemos el 65 – 80% del agua se absorbe a nivel de los túbulos proximales y esto ocurre gracias a la acción de la AQP1 que se expresa tanto a nivel de la membrana apical como la basolateral de estas células tubulares

Por lo tanto no es difícil comprender la importancia fisiológica del papel de las acuaporinas renales según lo demostrado en este experimento y es indispensable conocer el papel de las acuaporinas renales en situaciones fisiopatológicas como lo observamos en nuestro experimento al no haber reactividad significativa de los marcadores (anticuerpos policlonales) contra las AQP1, AQP2 y AQP4 en los conejos del grupo experimental La razón fisiopatológica es que la isquemia renal disminuye a nivel genómico la transcripción de proteínas que juegan un papel importante en el mecanismo de concentración de la orina (receptores V_2R , protein kinasa A, proteínas intracelulares, canales de agua, transportadores y cotransportadores, bombas ATP asas etc) Walsh (op cit)

La ausencia de reactividad se relaciona directamente a la falta de expresión del antígeno (AQP) en el epitelio renal y la falta de expresión de AQP, se relaciona directamente por la lesión isquémica inducida por los mediadores (vasoactivos) involucrados en la obstrucción bilateral ureteral Frokiaer et al (1996)

Como podemos ver la técnica utilizada mediante inmunohistoquímica nos ayudó a demostrar la reactividad de los marcadores (anticuerpos policlonales) contra AQP1, AQP2 y AQP4 en los conejos del grupo control y experimental En el grupo control siempre observamos reactividad de los marcadores expresados como un aumento de la intensidad en el color marrón, con una escala semicuantitativa de +++ (fuerte intensidad) y en el grupo experimental encontramos una ausencia o disminución importante en la reactividad de los marcadores contra AQP1, AQP2 y AQP4

Una excepción de reactividad fue el marcador anti-AQP1 en los glomérulos de los conejos experimentales registrada con una escala de intensidad fuerte 3+ La explicación de este hecho es desconocida debido a que en condiciones normales no se expresa AQP1 a nivel glomerular y nosotros encontramos este hallazgo en una situación patológica, en los conejos con ligadura bilateral de los uréteres En una revisión reciente algunos autores han encontrado este hallazgo en las enfermedades de glomérulo tales como la glomérulo-nefritis por Lupus Eritematoso Sistemico (LES) y la glomérulo-nefritis mesangial IgA y ellos también desconoce la explicación científica de este hallazgo Bedford et al (2003)

X CONCLUSIONES

- 1 - Se encontró diferencia significativa desde el punto de vista histológico en los cambios estructurales visualizado por microscopia de luz en los riñones de los conejos del grupo control y experimental
- 2 - La reactividad de los marcadores anti-AQP renales en los conejos del grupo control fue excelente en las AQP1, AQP2 y AQP4
- 3 - La reactividad de los marcadores contra las acuaporinas renales AQP1, AQP2 y AQP4 estuvo ausente o débil en los conejos del grupo experimental a excepción de los glomérulos que marcaron con anti-AQP1
- 4 - Rechazamos la hipótesis nula al concluir nuestro trabajo de tesis
- 5 - La técnica de inmunohistoquímica protocolizada, fue efectiva para determinar la presencia o ausencia de reactividad de los marcadores (anticuerpos policlonales de conejo) contra la AQP1, AQP2 y AQP4 a una dilución de 1 200 y 1 300
- 6 - Observamos que al utilizar anticuerpos policlonales de conejo contra acuaporinas de la misma especie, se obtiene demasiada tinción de fondo de color marrón “background”

7 - Demostramos que la manipulación de los conejos albinos Newzealand, fue la adecuada.

8 - Determinamos la ubicación a nivel cortical y medular de los canales de agua AQP1, AQP2 y AQP4 en el grupo control y observamos la falta o baja expresión de los mismos en el grupo experimental donde estos cambios inciden en la función del nefrón renal en el proceso reabsorción de agua a nivel tubular cortical y medular

XI RECOMENDACIONES

- 1 - Al completar este estudio experimental podemos recomendar implementar en nuestro país la técnica de inmunohistoquímica en la detección de los canales de agua llamados acuaporinas realizada en este trabajo de tesis a nivel de investigación en ciencias básicas
- 2 - El detectar estos canales de agua es de gran importancia para continuar los planes docentes en los diferentes laboratorios científicos tanto a nivel de ciencias básicas como a nivel clínico, por lo cual recomendamos la divulgación de estos resultados a través de su publicación en revistas científicas
- 3 - Recomendamos continuar con estos estudios de acuaporinas renales utilizando tejidos en humanos, a través de las biopsias renales que son realizadas con bastante frecuencia en el campo clínico y correlacionar su presencia o ausencia con las diferentes enfermedades que afectan el sistema renal
- 4 - La utilidad clínica es inmensa por la gran variedad de enfermedades relacionadas al metabolismo del agua por lo cual recomendamos realizar un seminario en el futuro sobre las acuaporinas y sus propiedades fisiológicas a nivel de los diferentes tejidos corporales
- 5 - En este estudio obtuvimos bastante tinción de fondo "Background" debido al uso de anticuerpos policlonales de conejos contra acuaporinas de conejos, es decir anticuerpos contra la misma especie; por lo tanto nuestra recomendación es que si se realiza un nuevo experimento, debemos utilizar como sujetos, población de ratas en lugar de conejos

6 - Obtuvimos reactividad del marcador anti-AQP1 a nivel glomerular en situación patológica (hallazgo no esperado) por lo cual recomendamos realizar más estudios en diferentes enfermedades glomerulares con el objetivo de encontrar una explicación científica de esta observación.

XII BIBLIOGRAFIA

AGRE, P , PRESTON G M., SMITH, B L 1993 Aquaporin CHIP: The archetypal molecular water channel Am J Physiol 265 463-476

AGRE, P 1997 Molecular physiology of water transport aquaporin nomenclature workshop mammalian aquaporin. Biol Cell 89 255-257

AGRE, P , KING, L S , YASUI, M 2002 Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine J Physiol 542 3-16

ANDERSON, V , TORRAZA, I 2007 Manual de procedimientos de inmunohistoquímica. Servicio de Patología, sección de histología. Instituto Oncológico Nacional , 13 págs

AMADOR, C E , GARRIDO, D R. 2002 Determinación de parámetros renales en conejos con obstrucción experimental de ambos ureteres Trabajo realizado en la asignatura de Fisiología Avanzada del programa de maestría. Universidad de Panamá, Panamá, Panamá 24 págs

ASHCROFT, F M 2000 Ion channels and Disease 1st ed ACADEMIC PRESS N Y , 481 págs

BEDFORD, J J , LEADER, J P , WALKER, R.J 2003 Aquaporin Expression in Normal Human Kidney and in Renal Disease. Journal of the American Society of Nephrology 14 (10) 2581-2587

BICHET, D G , RAZI, M , LONERGAN , M 1998 Hemodynamic and coagulation response to 1-desamino [6 D-arginina] vasopressin in patients with congenital nephrogenic diabetic insipidus New Engl J Med 318 880-889

BORON, W F , BOULPAEP, E L 2003 Medical Physiology 1st ed SAUNDERS Philadelphia., 1319 págs

CHEN, C F , YEH, S U , CHIEN, C T , WU, M S 2001 Renal response during acute unilateral ureteral obstruction in rats Neurorol Urodyn 20 125-137

COGAN, M G 1990 Renal effects of atrial natriuretic factor Annu Rev Physiol 52 699-708

COSTELLO-BOERRIG, L C , BOERRIGTER, G , BURNET, J C 2003 Revisiting salt and water retention new diuretics, aquaretics, and natriuretics Medical Clinics of North America 87 (2) 475-491

CURHAN, G C , ZEIDEL, M L 1996 Urinary tract obstruction. In *The Kidney*, 5th Ed., edited by BRENNER BM, WB SAUNDERS Philadelphia. USA págs 1936-1958

EWALD, G A , McKENZY, C R. 2002 *Manual of Medical Therapeutics* 29th ed LITTLE, BROWN AND COMPANY Washington USA., 641 págs

FERNÁNDEZ, V G 2003 Effect of the V1a/V2-AVP receptor antagonist, Conivaptan, on renal water metabolism and systemic hemodynamics in rats with cirrhosis and ascites *J Hepatol* 38 (6) 755-761

FRIED, T A , AYON, M A , MCDONALD, G 1987 Atrial natriuretic peptide, right atrial pressure, and sodium excretion rate in the rat *Am J Physiol* 253 969- 975

FRØKIAER, J , MARPLES, D , KNEPPER, M A., NIELSEN, S 1996 Bilateral ureteral obstruction downregulates expression of vasopressin-sensitive AQP-2 water channel in rat kidney *Am J Physiol* 270 657-668

FU, D , LIBSON, A , MIERCKE, L J W , WEITZMAN, C , NOLLERT, P , KRUCINSKI, P , STROUD, Y R. 2000 Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity *Science* 290 481-486

GARRIDO D 2002 *Fisiología del Sistema Renal Unidad de Apoyo Docente Facultad de Medicina. Universidad de Panamá.* 95 págs

GILLENWATER, J Y , WESTERVELT, F B , VAUGHAN, J R , HOWARDS, S S 1975 Renal function after release of chronic unilateral hydronephrosis in man. *Kidney Int* 7 179-186

GOLD, S R. 2005 Current Treatments and Novel Pharmacologic Treatments for Hyponatremia in Congestive Heart Failure *The American Journal of Cardiology* 95 (9A) 93-96

GULMI, F A., MATTHEWS, G J , MARION, D 1995 Volume expansion enhances the recovery of renal function and prolongs the diuresis and natriuresis after release of bilateral ureteral obstruction A possible role for atrial natriuretic peptide *J Urol* 153 1276-1283

HATAKEYAMA, S , YOSHIDA, Y , TANI, T 2001 Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun.* 287 814-819

HERNÁNDEZ, G S , GUTÉRREZ, A.M, RUÍZ, V , GONZÁLEZ, E , ECHEVARRÍA, M WHITTEMBURY, G 2002 Canales de agua (acuaporinas) y riñón. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 21 (1) 8-15

HOLMES, C L , PATEL, B M , RUSSELL, J A., WALLEY, K R. 2001 Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *The American College of Chest Physicians* 120 (3) 989-1002

JAENIKE, J R. 1972 The renal functional defect of postobstructive nephropathy The effects of bilateral ureteral obstruction in the rat *J Clin Invest* 51 2999-3006

JANEWAY, CH.A., TRAVERS, P , WALPORT, M , SHLOMCHIK, M J 2001 *Immunobiology* 5th ed GARLAND N Y , 732 págs

KANNO, K., SASAKI, S , HIRATA, Y L 1995 Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus *N Engl J med* 332 1540-1545

KNEPPER, M A. 1994 The aquaporin family of molecular water channels *Proc Natl Acad Sci USA* 91 6255-6258

KIM, S K., CHO, S H , OH, B S , YEUM, C H , CHOI, K.C , AHN, K.Y , LEE, J 2001 Diminished Renal Expression of Aquaporin Water Channels in rats with Experimental Bilateral Ureteral Obstruction *J Am Soc of Nephrol* 12 (10) 2019-2028

KWON, T H , FRØKIAER, J KNEPPER, M A , NIELSEN, S 1998 Reduced AQP1, -2, and -3 levels in kidneys of rats with CRF induced by surgical reduction in renal mass *Am J Physiol* 275 136-143

LEE, R.G , WATKINS, M L , PATTERSON, H J , GATTIS, W , ADAMS, K.F , KIRKWOOD, F , ADAMS, J R. 2003 Vasopressin a new target for the treatment of heart failure *American Heart Journal* 146 (1) 9-18

MA, T , YANG, B , VERKMAN, A.S 1997 Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver and heart *Biochem Biophys Res Commun.* 240 324-328

MOODY, T E , VAUGHAN ED, J R., GILLENWATER, J Y 1997 Comparison of the renal hemodynamic response to unilateral and bilateral ureteral occlusion. *Investig Urol* 14 455-459

MULDERS, S M , PRESTON, G M , DEEN, P M , GUGGINO, W B , VAN OS, C H., AGRE, P 1995 Water channel properties of major intrinsic protein of lens *J Biol Chem* 270 9010-9016

MURATA, K., MITSUOKA, K., HIRAI, T , WALZ, T , AGRE, P , J HEYMANN, J P , ENGEL, A , FUJIYOSHI, J 2000 Structural determinants of water permeation through aquaporin-1 *Nature* 407 599

NATIVÍ, J 2000 *Introducción a la Investigación Científica.* 1ra ed Editora Sibauste, S A Panamá., 221 págs

NIELSEN, S , AGRE, P 1995 The aquaporin family of water channels in kidney *Kidney Int* 48 1057-1068

NIELSEN, S , KWON, T H, FROKLAER J , KNEPPER, M A 2000 Key Roles of Renal Aquaporins in Water Balance and Water-Balance Disorders *News Physiol Sci* 15 136 – 144

NIELSEN, S , FROKLAER, J , MARPLES, D , KWON, T H, AGRE, P , KNEPPER, M A 2002 Aquaporins in the kidney from molecules to medicine *Physiol Rev* 82 205-244

PEÑALBA, R.M, GARRIDO, D R. 2007 Líquidos Orgánicos Unidad de Apoyo Docente Facultad de Medicina. Universidad de Panamá. 45 págs

PRESTON, G M , AGRE, P 1991 Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons member of an ancient channel family *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 11110-11114

PRESTON, G M , CARROLL, T P , GUGGINO, W B , AGRE, P 1992 Appearance of channels water in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP 28 protein. *Science* 256 385-387

REYES, A, MARTIN, D , SETTLE, S , KLAHR, S 1992 EDRF role in renal function and blood pressure of normal rats and rats with obstructive uropathy *Kidney Int* 41 403-413

ROSE, B D , POST, T W 2002 Trastornos de los electrolitos y del Equilibrio Ácido-Base Quinta edición Editorial Marbán. España., 995 págs

SANCHEZ, J C 2003 Acuaporinas proteínas mediadoras del transporte de agua *Colomb Med* 34 (4) 220-227

SELDIN, D W , GIEBISCH, G H 2000 The Kidney Physiology & Pathophysiology 3rd Edition. ed LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS págs 363-374

SIDEL, V W , SOLOMON, A K. 1957 Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient *J Gen Physiol* 41 243-257

SUI, H , HAN, B G , LEE, J K., WALIAN, P , JAP, B K. 2001 Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel *Nature*, 414 872- 878

TERRIS, J , ECELBARGER, C A , NIELSEN, S , KNEPPER, M A. 1996 Long-term regulation of four renal aquaporins in rat *Am J Physiol* 271 414-422

YASUI, M , KNON, T H , KNEPPER, M A , NIELSEN, S , AGRE, P 1999 Aquaporin-6 an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Nat Acad Sci USA* 96 5808-5813

WALSH, P C 2002 Campbell's Urology 8th ed WB Saunders St Louis págs 412-424

WALZ, T, HIRAI, T, MURATA, K., HEYMANN, J B MITSUOKA, K., FUJIYOSHI, Y, SMITH, B L, AGRE, P, ENGEL, A. 1997 The three-dimensional structure of aquaporin-1 Nature **387** 624-626

ZHANG, R., VAN HOEK, A N, BIWERSI, J, VRKMAN, A S 1993 A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28 Biochem. 32 2938-2941

XIII ANEXOS

13 1 FIGURAS

Figura 8

Descripción de los anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP1



RABBIT ANTI-AQUAPORIN 1 POLYCLONAL ANTIBODY

CATALOG NUMBER	AB3272-200UL	QUANTITY	200 µL
LOT NUMBER		CONCENTRATION	1 mg/mL (after reconstitution)
SPECIFICITY	Recognizes Aquaporin 1 (AQP1, CHIP28)		
IMMUNOGEN	Highly purified peptide corresponding to residues 242-260 of human Aquaporin 1 (SwissProt accession number P29972)		
APPLICATIONS	Western blotting 1:500-1:1,000 on rat kidney membranes Immunohistochemistry on rat kidney sections Dilutions should be made using a carrier protein such as BSA (1-3%) Optimal working dilutions must be determined by the end user		
CONTROL ANTIGEN	Included free of charge with the antibody is 40 µg of control antigen (lyophilized powder) Reconstitute with 100 µL of deionized water For negative control, preincubate 0.5 µg of purified peptide with 1 µg of antibody for one hour at room temperature Optimal concentrations must be determined by the end user		
SPECIES REACTIVITY	Human and rat Reactivity with other species has not yet been tested The epitope specific for Aquaporin 1 is identical in human, rodent, bovine and only slightly different in frog (18/19 amino acids)		
FORMAT	Purified immunoglobulin		
PRESENTATION	Lyophilized from PBS, pH 7.4, containing 5% sucrose and 0.025% sodium azide Reconstitute with 200 µL of sterile distilled water Centrifuge antibody preparation before use (10,000 x g for 5 min)		
STORAGE/HANDLING	Maintain lyophilized material at -20°C for up to 6 months after date of receipt After reconstitution maintain at -20°C in undiluted aliquots for up to 6 months Avoid repeated freeze/thaw cycles		

Fuente CHEMICON INTERNATIONAL USA (2006)

Figura 9

Descripción de los anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP2



**RABBIT ANTI-AQUAPORIN 2
(AQP2, AQP-CD, WCH-CD)
POLYCLONAL ANTIBODY**

CATALOG NUMBER:	AB3274-200UL
LOT NUMBER:	
QUANTITY:	200 μ L
CONCENTRATION:	0.8 mg/mL (after reconstitution)
SPECIFICITY:	Recognizes Aquaporin 2
IMMUNOGEN:	Highly purified peptide corresponding to residues 254-271 of rat or mouse Aquaporin 2 (SwissProt accession number P34080)
APPLICATIONS	Western blotting 1:200-1:600 using ECL on rat kidney membranes Immunohistochemistry on rat kidney sections Dilutions should be made using a carrier protein such as BSA (1-3%) Optimal working dilutions must be determined by the end user
CONTROL ANTIGEN:	Included free of charge with the antibody is 40 μ g of control antigen (lyophilized powder) Reconstitute with 100 μ L of deionized water. For negative control, preincubate 1 μ g of purified peptide with 1 μ g of antibody for one hour at room temperature. Optimal concentrations must be determined by the end user
SPECIES REACTIVITIES:	Human and rat. The epitope specific for Aquaporin 2 is identical in rat and mouse and only slightly different in human (17/18 amino acids). Reactivity with other species has not yet been tested
FORMAT	Affinity purified immunoglobulin
PRESENTATION	Lyophilized from PBS, pH 7.4, containing 1% BSA and 0.05% sodium azide. Reconstitute with 200 μ L of sterile distilled water. Centrifuge antibody preparation before use (10,000 x g for 5 min)
STORAGE/HANDLING	Maintain lyophilized material at -20°C for up to 6 months after date of receipt. After reconstitution maintain at -20°C in undiluted aliquots for up to 6 months. Avoid repeated freeze/thaw cycles

Fuente CHEMICON INTERNATIONAL USA. (2006)

Figura 10

Descripción de los anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP4



**RABBIT ANTI-AQUAPORIN 4
AFFINITY PURIFIED
POLYCLONAL ANTIBODY**

CATALOG NUMBER	AB3594-200UL
LOT NUMBER	
QUANTITY	200 µL
CONCENTRATION	0.2 mg/mL (after reconstitution)
SPECIFICITY	Recognizes Aquaporin 4 (AQP4, WCH4, Mercurial-Insensitive Water Channel)
IMMUNOGEN	GST fusion protein with residues 249-323 of rat Aquaporin 4 (SwissProt accession number P47863)
APPLICATIONS	Western blotting 1:500-1:1,000 using ECL on rat brain membranes Immunohistochemistry on rat brain sections Dilutions should be made using a carrier protein such as BSA (1-3%) Optimal working dilutions must be determined by the end user
CONTROL ANTIGEN:	Included free of charge with the antibody is 120 µg of control antigen (lyophilized powder) Reconstitute with 100 µL of PBS. For positive control, in Western blot use 20 ng of protein per Minigel lane. For negative control, preincubate 3 µg of purified peptide with 1 µg of antibody for one hour at room temperature. Optimal concentrations must be determined by the end user.
SPECIES REACTIVITIES:	Rat. Reactivity with other species has not yet been tested. It is expected that the antibody may also react with mouse (73/75), bovine (71/75), human (69/75) and rabbit (64/75) due to sequence homology.
FORMAT	Affinity purified immunoglobulin
PRESENTATION:	Lyophilized from PBS, pH 7.4, containing 1% BSA, 5% sucrose and 0.025% sodium azide. Reconstitute with 200 µL of sterile distilled water. Centrifuge antibody preparation before use (10,000 x g for 5 min).
STORAGE/HANDLING.	Maintain lyophilized material at -20°C for up to 6 months after date of receipt. After reconstitution maintain at -20°C in undiluted aliquots for up to 6 months. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

Fuente CHEMICON INTERNATIONAL USA (2006)

Figura 11.

Población de estudio: conejos Albinos New Zealand



Fuente: Conejos del Bioterio de la Facultad de Medicina.
Universidad de Panamá. Año: 2006.

Figura 12.

Materiales utilizados



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 13.

Rasurado de oreja y exposición de la vena marginal en conejo



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 14.

Incisión vía abordaje abdominal



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 15.

Exposición del uréter antes de su ligadura con seda 00.



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 16.

Cierre de herida quirúrgica, luego de la ligadura de uréteres en los conejos del grupo experimental.



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 17.

Extracción renal a las 72 horas de la ligadura en el grupo experimental.



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 18.

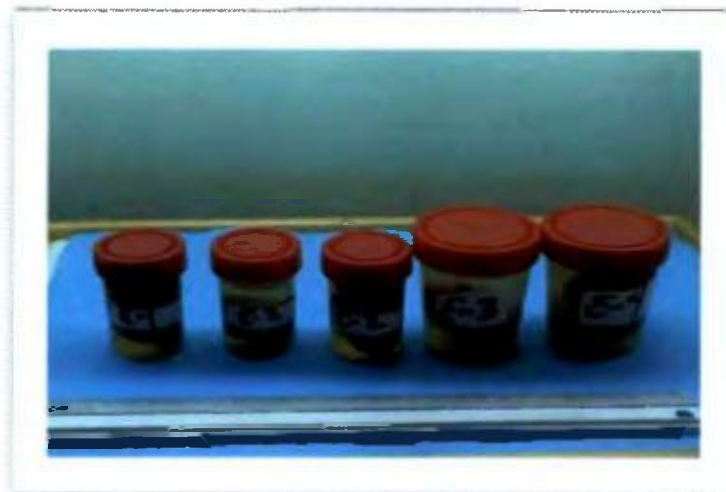
Vista macroscópica de la hidronefrosis a las 72 horas de ligadura en el conejo del grupo experimental.



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 19.

Muestras de los riñones extraídos en el grupo experimental al cumplirse las 72 horas de la ligadura.



Fuente: Laboratorio Fisiología. Año: 2006.

Figura 20.

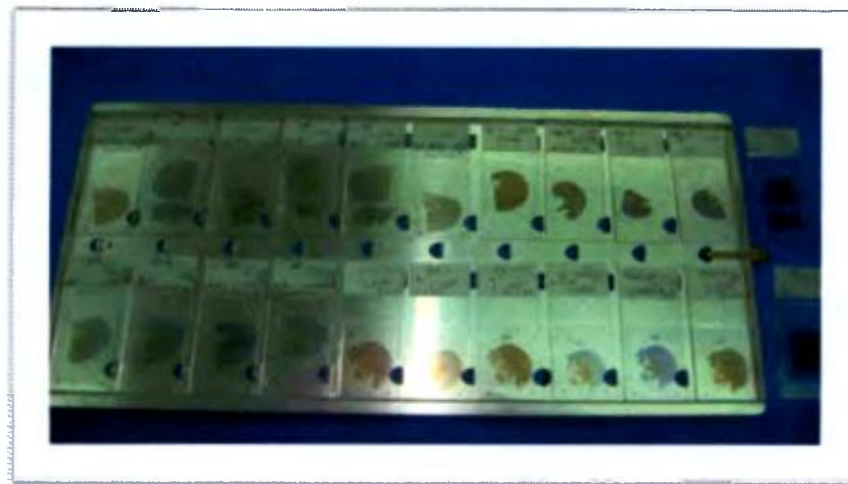
Frascos de anticuerpos policlonales de conejos anti-AQP, proporcionados por los laboratorios CHEMICON INTERNATIONAL – USA. Utilizados en nuestro experimento.



Fuente: Laboratorio de Patología del Hospital Oncológico Nacional. Año: 2006.

Figura 21.

Portaobjetos con el montaje de la técnica de inmunohistoquímica en los riñones de los conejos del grupo control y experimental.



Fuente: Laboratorio de Patología del Hospital Oncológico Nacional. Año: 2006.