

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Zoología y Fisiología Animal



TESIS DOCTORAL

Papel del hígado en la regulación renal del volúmen extracelular : mediación de un mecanismo humoral

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mercedes Zubiaur Marcos

DIRECTOR:

José Miguel López Novoa

Madrid, 2015

TP
1983
232

Mercedes Zubiaur Marcos



* 5 3 0 9 8 6 2 5 9 2 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-616562-6

**PAPBL DEL HIGADO EN LA REGULACION RENAL DEL VOLUMEN EXTRACELULAR.
MEDIACION DE UN MECANISMO HUMORAL.**

Departamento de Fisiología Animal y Zoología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 232/83

© Mercedes Zubiaur Marcos
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-34875-1983

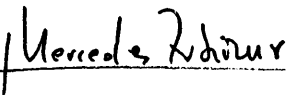
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y FISIOLÓGIA ANIMAL

**PAPEL DEL HIGADO EN LA REGULACION RENAL DEL VOLUMEN
EXTRACELULAR.**

MEDIACION DE UN MECANISMO HUMORAL.

Memoria que, para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas, presenta

MERCEDES ZUBIAUR MARCOS



Director:
Dr. D. JOSE MIGUEL LOPEZ NOVOA
Doctor en Ciencias Biológicas
Adjunto del Servicio de Nefrología y
Medicina Experimental.
Fundación Jiménez Díaz.

Ponente:
Dr. D. ARSENIO FRAILE OVEJERO
Catedrático de Fisiología Animal.
Departamento de Zoología y Fisiología Animal.
Facultad de Ciencias Biológicas.

Madrid, Abril 1982.

A Jaime
y
A mis padres
y hermanos.

FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

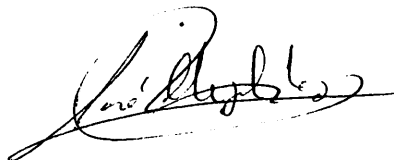
CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION
Avda Reyes Católicos, 2 - Ciudad Universitaria
MADRID-3

TELEFONOS
244 18 00 - 244 17 00
244 49 00 - 244 01 00

Don José Miguel López Novoa, Doctor en Ciencias Biológicas,
Jefe Adjunto del Servicio de Nefrología y Medicina Experimental
de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

CERTIFICA: Que Dña. Mercedes Zubiaur Marcos, Licenciada en
Ciencias Biológicas ha realizado bajo su dirección en el Labora-
torio de Fisiopatología Renal de la Fundación Jiménez Díaz de
Madrid, las experiencias conducentes a la realización de su Tesis
Doctoral.

Y para que conste ante quien proceda, firmo la presente en Ma-
drid a doce de abril de mil novecientos ochenta y dos.



Fdo. Dr. J.M. López Novoa



INDICE

Agradecimientos.	vi
Abreviaturas más utilizadas.	viii
A. INTRODUCCION.	1
A.1. Naturaleza general del control del volumen de los fluidos del espacio extracelular.	1
A.1.a. Consideraciones y conceptos acerca de los fluidos corporales.	2
1. Plasma.	2
2. Fluido linfo-intersticial, fluido intersticial.	2
3. Fluido transcelular.	2
4. Tejido conectivo denso, cartílago, hueso.	3
A.1.a.1. Composición de electrolitos del fluido extracelular.	3
A.1.a.2. Distribución de los fluidos del espacio extracelular.	3
A.1.a.3. El intercambio externo.	4
A.1.b. Interdependencia del control osmótico y del control del volumen.	4
A.1.b.1. Papel de los receptores de volumen en el control de la secreción de ADH.	4
A.1.b.2. La sed y el apetito de sal.	5
A.1.c. Regulación del volumen extracelular frente a variaciones en el balance de sodio.	5
A.1.c.1. Variaciones en la ingesta de sodio.	5
A.1.c.2. Infusiones de Aldosterona y Mineralocorticoides.	5
A.1.c.3. Expansión del volumen extracelular mediante sobrecargas salinas.	6
A.1.d. Rama aferente del control del volumen extracelular.	6
A.1.d.1. Receptores de volumen.	6
A.1.d.2. Localizaciones extrarrenales de los receptores de volumen.	7
A.1.d.2.a. Circulación arterial.	7
A.1.d.2.b. Receptores de volumen del sistema de baja presión central.	7
A.1.d.2.c. Papel del hígado en la rama aferente del control del volumen.	8
A.1.d.2.d. Receptores para los cambios en la concentración de sodio en el fluido cerebroespinal.	9
A.1.d.3. Mecanismos aferentes intrarrenales en el control del VEC.	9
A.1.e. Mecanismos eferentes del control del VEC.	9
A.1.e.1. Sistema nervioso simpático.	9
a) Inervación simpática renal.	9
b) Efecto sobre la resorción tubular.	9
A.1.e.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.	10
A.1.e.2.a. Aldosterona.	10
A.1.e.2.b. Angiotensina II.	11
A.1.e.3. Prostaglandinas.	11
A.1.e.3.a. Prostaglandinas y el sistema renina-angiotensina.	11
A.1.e.3.b. Prostaglandinas y el balance de agua y de sodio en el organismo.	11
A.1.e.4. Sistema de las calicreínas-kininas renales.	12
A.1.e.5. Hormona natriurética.	12
A.1.f. Mecanismos efectores en el control del VEC.	12
A.1.f.1. Filtración glomerular. Balance glomerulo-tubular.	12
A.1.f.2. Factores físicos.	13
A.1.g. Resumen.	13

A.2. Manejo del agua y de los electrolitos por los distintos segmentos de la nefrona.	15
A.2.a. Partes de la nefrona.	15
A.2.b. Túbulo proximal.	15
A.2.b.1. Primera parte del túbulo contorneado proximal (S_1).	15
A.2.b.2. Segmento S_2 del túbulo proximal.	16
A.2.b.3. Segmento S_3 del túbulo proximal.	17
A.2.c. Rama delgada del asa de Henle.	17
A.2.d. Segmentos distales.	18
A.2.d.1. Rama ascendente gruesa del Asa de Henle.	18
A.2.d.2. Túbulo distal.	18
A.2.e. Tubos colectores.	19
A.2.e.1. Túbulo conector.	19
A.2.e.2. Tubos colectores corticales.	19
A.2.e.3. Tubos colectores medulares.	19
A.3. Papel del hígado en la homeostasis del volumen extracelular.	20
A.3.a. Sistema gastrointestinal. Posición del hígado dentro de este sistema.	20
A.3.a.1. Situación anatómica del hígado en el SGI.	20
A.3.a.2. Funciones sensoras del hígado.	20
A.3.b. La enfermedad hepática y el manejo renal del agua y del sodio.	21
A.3.c. Papel del hígado en la osmorregulación.	22
A.3.d. Papel del hígado en la regulación de la excreción renal de sodio.	25
A.3.d.1. Papel de la circulación hepática.	25
A.3.d.2. Respuestas a alteraciones de la concentración de sodio en la sangre portal, mediante infusiones intravenosas.	25
A.3.d.3. Respuesta a la administración oral e intragástrica de soluciones salinas.	28
A.4. Hormona natriurética.	29
A.4.a. Situaciones fisiológicas y fisiopatológicas en las que se ha postulado la mediación de una hormona natriurética (HN).	30
A.4.a.1. Presencia de la hormona natriurética en situaciones de expansión del volumen extracelular.	30
A.4.a.1.a. Presencia de un factor natriurético circulante.	30
A.4.a.1.b. Presencia de la HN en la expansión aguda del volumen extracelular con salino.	32
A.4.a.1.c. Papel de la HN en el escape a la retención de sodio inducida por mineralocorticoides.	32
A.4.a.1.d. Papel de la hormona natriurética en la respuesta renal a la inmersión.	33
A.4.a.2. Presencia de la hormona natriurética en la uremia crónica.	34
A.4.a.3. Papel de la hormona natriurética en la hipertensión.	35
A.4.a.4. Papel de la hormona natriurética en la patogenia de la retención de sodio en la cirrosis y en la insuficiencia cardíaca.	36
A.4.a.5. Presencia de la hormona natriurética en condiciones normales y su relación con la ingesta de sodio.	37
A.4.b. Naturaleza de la hormona natriurética.	37
A.4.b.1. Materiales biológicos de donde se ha podido aislar la hormona natriurética.	37
A.4.b.2. Bioensayos de actividad natriurética.	38
a) Efecto sobre la excreción urinaria de sodio.	38
b) Efecto sobre el transporte de sodio en membranas epiteliales.	38
c) Efecto sobre la actividad del enzima $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ asa.	38
d) Efecto sobre la actividad del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.	38
e) Competencia con la acción de otros inhibidores del transporte de sodio.	38
f) Efecto sobre el transporte renal de PAH.	39
g) Efecto sobre el transporte de sodio en los túbulos renales.	39

A.4.b.3. Metodología para el aislamiento de la hormona natriurética.	39
A.4.b.4. Características físico-químicas de la hormona natriurética.	40
A.4.b.5. Propiedades biológicas de la hormona natriurética.	40
A.4.c. Posibles lugares de secreción de esta hormona.	41
A.4.c.1. Origen cerebral.	41
A.4.c.2. Origen renal.	42
A.4.c.3. Origen hepático.	42
B. OBJETIVOS.	44
C. METODOS.	46
C.1. Experiencias de aclaramiento o depuración renal.	46
C.1.a. Concepto de aclaramiento urinario.	46
C.1.b. Medida de la función renal: tasa de filtración glomerular.	46
C.1.b.1. Aclaramiento de inulina.	47
C.1.b.2. Técnica de infusión constante.	48
C.1.c. Valoración del flujo plasmático renal.	48
C.1.c.1. Fracción de extracción. Concepto.	49
C.1.c.2. Fracción de filtración.	49
C.1.d. Aclaramiento osmolar y aclaramiento de agua libre.	49
C.1.e. Experiencias de aclaramiento corto en perros y en ratas.	50
C.1.e.1. Estudio de la función renal en perros.	50
C.1.e.2. Valoración de la tasa de filtración glomerular en ratas.	50
C.2. Experiencias en perros.	50
C.2.a. Cuidados preoperatorios y durante la cirugía.	50
C.2.b. Preparación quirúrgica general.	51
C.2.c. Valoración del flujo sanguíneo renal mediante flujometría electromagnética.	51
C.3. Aislamiento de una hormona natriurética en el plasma y en la orina.	52
C.3.a. Recogida y preparación de las muestras de plasma y de orina de perros.	52
C.3.b. Técnicas de filtración en gel en columna.	52
C.3.c. Fraccionamiento de las muestras de plasma y de orina.	53
C.4. Estudio de la actividad natriurética.	54
C.4.a. Experiencias en perros.	54
C.4.a.1. Preparación de los animales y técnicas quirúrgicas.	54
C.4.a.2. Esquema de la experiencia y valoración de la actividad natriurética.	54
C.4.b. Experiencias en ratas despiertas.	54
C.4.b.1. Preparación de los animales.	54
a) Nefrectomía unilateral.	54
b) Mantenimiento en cajas metabólicas	54
C.4.b.2. Bioensayo en ratas despiertas.	55
a) Técnicas quirúrgicas.	55
b) Esquema de la experiencia.	55
c) Valoración de la actividad natriurética.	56
C.5. Métodos de valoración química.	56
C.5.a. Valoración de la concentración de inulina.	56
C.5.b. Determinación de inulina radioactiva.	57
C.5.c. Valoración de la concentración de ácido para-aminohipúrico (PAH).	57
C.5.d. Valoración de la concentración de proteínas plasmáticas.	58
C.5.e. Valoración de la concentración de electrolitos en plasma y en orina. Excreción urinaria de electrolitos.	59

C.5.f. Otras determinaciones.	60
C.6. Análisis de los resultados y métodos estadísticos.	60
D. GRUPOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS.	61
D.1. Respuestas renales a los cambios en la concentración de electrolitos en el lecho vascular portal. Especificidad a distintos electrolitos.	61
D.1.a. Procedimiento general.	61
D.1.b. Infusión en el sistema porta de una solución de ClNa hipertónico (855 mmol/l). Comparación con la infusión sistémica de la misma solución.	61
D.1.c. Papel específico del sodio: Infusión intraportal de una solución de SO_4Na_2 hipertónica (430 mmol/l).	62
D.1.d. Papel específico del cloro: infusión intraportal de una solución de monoclóhidrato de L-Arginina (855 mmol/l).	64
D.2. Respuestas renales a cambios en la osmolaridad de la sangre de la vena porta mediante la infusión de una solución hiperosmolar de azúcares.	66
D.3. Papel de un factor humoral en el aumento específico de la excreción de sodio, causado por la infusión de soluciones hiperosmolares de electrolitos en la vena porta.	67
D.3.a. Estudio de la actividad natriurética en el plasma suprahepático después de la infusión intraportal de ClNa hipertónico.	67
D.3.b. Caracterización de una sustancia humoral con actividad natriurética en relación con la infusión de ClNa 855 mM en la vena porta.	69
D.3.b.1. Preparación de dicha sustancia a partir de plasma suprahepático, plasma arterial sistémico y de orina. Características físico-químicas.	69
a) Experiencias en perros.	69
b) Fraccionamiento de las muestras. Pm de la sustancia humoral.	69
D.3.b.2. Actividad biológica de esta sustancia. Bioensayo en ratas uninefrectomizadas y despiertas.	70
D.3.b.2.a. Efecto de los extractos F IV obtenidos de plasma suprahepático pre y post-infusión salina hipertónica en la vena porta:	70
1. Extractos F IV de plasma -SH recogido después de la infusión portal.	70
2. Extractos F IV de plasma -SH recogidos previamente (basal) a la infusión intraportal.	70
3. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis.	71
4. Parámetros generales de las ratas.	71
D.3.b.2.b. Efecto de los extractos F IV obtenidos de plasma arterial sistémico pre y post-infusión salina hipertónica en la vena porta:	71
1. Extractos F IV de plasma arterial post-infusión.	71
2. Extractos F IV de plasma arterial basal.	71
3. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis.	72
4. Parámetros generales de las ratas.	72
D.3.b.2.c. Efecto de los extractos F IV de orina recogida pre y post-infusión de ClNa hipertónico en la vena porta.	72
1. Extractos F IV de orina post-infusión.	72
2. Extractos F IV de orina basal.	72
3. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis.	72
4. Parámetros generales de las ratas.	73
D.3.b.2.d. Efecto de los extractos F IV de orina recogida después de la infusión de ClNa 855 mM en una vena cubital.	73
1. Extractos F IV de orina post-infusión cubital.	73

2. <i>Bioensayos positivos y modelo de natriuresis.</i>	73
3. <i>Parámetros generales de las ratas.</i>	73
D.4. <i>Comparación de las características biológicas de la sustancia humoral obtenida en el apartado D.3.b., con las de otras hormonas natriuréticas.</i>	74
D.4.a. <i>Aislamiento de un factor humoral de bajo Pm en la orina de perros con expansión crónica del VEC.</i>	74
D.4.a.1. <i>Experiencias de aclaramiento corto en perros pretratados con 9 α-fluorhidrocortisona y con 258 mM de sodio al día.</i>	74
D.4.a.2. <i>Cromatografía de las muestras de orina.</i>	74
D.4.b. <i>Actividad biológica de los extractos F IV de orina de los perros con expansión crónica de VEC.</i>	74
D.4.c. <i>Comparación de los porcentajes de bioensayos positivos y de los modelos de respuesta natriurética.</i>	75
E. DISCUSION.	76
F. CONCLUSIONES.	85
G. BIBLIOGRAFIA.	87

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido, directa o indirectamente, a la realización de esta Tesis y a mi iniciación dentro del mundo de la investigación científica.

A mi director Dr. J.M. López Novoa por su ayuda y estímulo, así como por su contribución a mi formación durante estos cuatro años en el Laboratorio de Fisiología Renal del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz.

Al Profesor D. Arsenio Fraile Ovejero, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, por su supervisión.

Al Dr. D. Luis Hernando Avendaño, Jefe del Servicio de Nefrología, hilo conductor de este equipo de Investigación y al que he tenido el honor de pertenecer durante estos años.

A María Teresa Mombiela, Inmaculada Millás, Dolores Fernández Muñoz, Ramón Peces y Miguel Frutos, que por su amistad y su ayuda desinteresada a lo largo de estos años en el Laboratorio de Fisiología Renal, han contribuido directamente a la realización de esta Tesis doctoral.

A José Emilio Martín Oar, Luz Lozano, M^a Eugenia Ramírez, Blanca Ramos, Vicente Martín Paredero, Diego Rodríguez Puyol, así como a todas las compañeras y compañeros del Laboratorio de Nefrología.

A la Dra. Isabel Valverde y al Dr. José M^a Mato, Jefe Asociado y Adjunto, respectivamente, del Servicio de Metabolismo, Nutrición y Hormonas. Al Dr. Fernando Ortiz Masllorens, Jefe del Servicio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz. Al Dr. Alfonso Merchante Iglesias, Subdirector de Investigación y Docencia y al Dr. José Perianes Carro, Director de la Clínica de la Concepción.

A Fernanda Romero y Josefa del Castillo del Servicio de Medicina y Cirugía Experimentales por su ayuda.

A Guillermo del Olmo Mingo y al Departamento de Fotografía de la Fundación Jiménez Díaz.

Esta Tesis ha sido realizada con la ayuda de una beca de Ciencias Biomédicas de la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid y las ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto Nacional de la Salud (INSALUD), número 179/80 y número 21/81.

Abreviaturas más utilizadas.

A II:	Angiotensina II.
aa:	Aminoácido.
A. de H.:	Asa de Henle.
ADH:	Hormona antidiurética.
AN:	Actividad natriurética.
Arg:	Arginina.
ARI:	Arteria renal izquierda.
C _{H₂O}	Aclaramiento de agua libre.
C _{In}	Aclaramiento de inulina.
Cosm:	Aclaramiento osmolar.
C _{PAH}	Aclaramiento de ácido p-aminohipúrico.
DOCA:	Desoxycorticosterona.
E _s :	Fracción de extracción.
F IV:	Fracción IV.
FE _{Cl}	Excreción Fraccional de cloro.
FE _{Na}	Excreción Fraccional de sodio.
FF:	Fracción de Filtración.
FG:	Filtración Glomerular.
9- α -FHC:	9- α -fluorhidrocortisona.
FPR:	Flujo Plasmático Renal.
FSR:	Flujo Sanguíneo Renal.
G-6 PD:	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.
GPS:	Glomerulopresina.
Hct:	Hematocrito.
HN:	Hormona Natriurética.
i.g.:	Intragástrica.
In:	Inulina.
i.v.:	Intravenosa.
Lys:	Lisina.
PA:	Presión Arterial.
PAH:	Acido p-aminohipúrico.
P _{Cl}	Concentración Plasmática de cloro.
P _{CO₃H}	Concentración Plasmática de bicarbonato.
PG:	Prostaglandinas.
P _K	Concentración Plasmática de potasio.
P _{Na}	Concentración Plasmática de sodio.
P _{osm}	Osmolalidad Plasmática.
ref.:	Referencia.
RVP:	Resistencias Vasculares Periféricas.
SA:	Sangre Arterial.
SGI:	Sistema Gastrointestinal.
SH:	Sangre suprahepática.
TD:	Túbulo Distal.
TP:	Túbulo Proximal.
U _{Cl V}	Excreción urinaria de cloro.
U _{K V}	Excreción urinaria de potasio.
U _{Na V}	Excreción urinaria de sodio.

v:	vena.
VC:	Vena cubital.
VEC:	Volumen Extracelular.
VP:	Vena porta.
VSH:	Vena suprahepática.
\dot{V}_u :	Volumen urinario.



A. INTRODUCCION

A.1 Naturaleza general del control del volumen de los fluidos del espacio extracelular.

La regulación del volumen de los fluidos del espacio extracelular (VEC) es un hecho muy importante dentro de la homeostasis (28, 123, 322). A pesar de que existe una discontinuidad y una gran variabilidad en el contenido de sodio de la ingesta diaria, el volumen de plasma y el volumen extracelular total son mantenidos de una manera sorprendentemente constante. Por otro lado, aumentos o pérdidas en el volumen, que pueden ocurrir en situaciones fisiológicas o patológicas, son reparados de un modo rápido y preciso, siempre y cuando la causa que originó estas alteraciones no continúe o bien las alteraciones no fueran de extrema gravedad o irreversibles. El concepto de regulación del volumen del espacio extracelular expresa, de forma implícita, la idea de que el volumen es controlado en función de unos determinados estados de capacidad del espacio vascular y del espacio intersticial. De acuerdo con Gauer y Henry (123), cuando se habla del control de volumen de sangre esto no implica un mantenimiento homeostático rígido en un volumen determinado, sino un continuo ajuste de dicho volumen de sangre, frente a cambios en el tamaño del lecho vascular, de tal modo que se consiga un llenado adecuado del mismo por parte del corazón. Nosotros vamos a considerar en este trabajo que la capacidad que posee, tanto el espacio vascular como el intersticial es constante, y por tanto que la regulación del VEC va a estar en relación directa con las pérdidas o ganancias de fluido hacia dentro y hacia fuera de este espacio. Sin embargo, conviene no olvidar que en muchas situaciones tanto fisiológicas (embarazo y ortostatismo prolongado), como patológicas (fístulas arterio-venosas, o disfunción del sistema nervioso autónomo), los cambios en el volumen extracelular son secundarios a esta alteración inicial de la capacitancia del sistema vascular. El aumento de volumen extracelular así originado, es claramente apropiado y no constituye una expansión de volumen, en el sentido en el cual nos vamos a referir aquí (46).

Al hablar del control del volumen extracelular, ha de quedar claro que la función crítica de este control es la regulación del volumen de plasma, así como el mantenimiento constante (suficiencia) de la circulación. Esta regulación se lleva a cabo mediante tres mecanismos principales:

1) Control del intercambio entre los compartimentos vascular y extravascular del espacio extracelular.

2) Control de la excreción renal de agua y de electrolitos.

3) Control de las resistencias vasculares periféricas.

Los factores relacionados con el intercambio entre los compartimentos que forman el espacio extracelular son importantes en los ajustes rápidos que tienen lugar en la circulación, pero juegan un papel pequeño en la regulación a largo plazo del VEC. Por otro lado, variaciones en el volumen de plasma pueden tener lugar sin cambios en el volumen extracelular total. Asimismo, cambios en ambos compartimentos –intra y extravascular–, pueden ir conjuntados, con tal de que el equilibrio de las fuerzas de Starling en el lecho capilar no se altere (322). En este trabajo nos centraremos, principalmente, en el estudio del control de la excreción renal de agua y sal y no profundizaremos en los otros dos mecanismos mencionados.

Desde hace mucho tiempo resulta evidente el papel central que ocupa el riñón dentro del control del volumen de los fluidos del espacio extracelular (9, 271, 312). A principios de siglo Starling (321, 322), planteó que el riñón era el órgano cuya función, de modo general, era la regulación de la cantidad y de la composición del conjunto de los fluidos del organismo y dicha regulación era capaz de llevarla a cabo debido a que monitorizaba constantemente los cambios en la composición y en la cantidad de la sangre que circulaba a través de sus vasos.

Puesto que la osmolaridad de los fluidos intra y extracelular es idéntica y, puesto que el principal soluto osmóticamente activo en el espacio extracelular es el sodio y sus aniones concomitantes, se puede concluir que, mientras la osmolaridad permanezca constante, cambios en el volumen extracelular podrían reflejar primeramente, cambios en el contenido total de sodio en el organismo

(197). Si el contenido de solutos permanece constante, cambios en la osmolaridad podrían reflejar primeramente, alteraciones en el balance de agua. En los mamíferos, la forma principal de regulación del VEC es mediante alteraciones en la excreción renal de sodio. Así, una situación cualquiera (diferente de la pérdida de sales por el riñón directamente), que dé lugar a una reducción del VEC provoca un descenso en la tasa de excreción de sodio (46). Por el contrario, aumentos en el VEC dan lugar a incrementos en la excreción de sodio (9, 312). Esta respuesta puede ocurrir independientemente de que la concentración de sodio en plasma pueda verse afectada, p.e., por una administración continuada de ADH (198), en estas circunstancias, la expansión del VEC por retención de agua, bajo influencia directa de la ADH, conduce secundariamente a un aumento en la tasa de excreción de sodio, a pesar de la reducción en la concentración plasmática del mismo, que acompaña al proceso. Inversamente, grandes pérdidas de agua que deplecionen el volumen extracelular podrían reducir rápidamente la excreción renal de sodio (198), a pesar de la subsiguiente hipernatremia (Fig. A.1.).

A.1.a. Consideraciones y conceptos acerca de los líquidos corporales.

Más de la mitad del peso corporal está constituido por una especie molecular, el agua. El agua es esencial para el desarrollo de la vida de los seres vivos. Es el solvente en el cual están disueltos buena parte de las especies moleculares que integran el organismo (95). El agua está compartimentalizada en el organismo de forma que estos compartimentos están separados por membranas, la mayoría de estas membranas son altamente permeables al agua, y las que no lo son, representan un pequeño porcentaje. El agua corporal se le puede considerar dividida en dos compartimentos o espacios principales (50):

- El líquido intracelular (FIC).
- El líquido extracelular (FEC).

La barrera limitante entre estos dos espacios son las membranas celulares consideradas en su conjunto (Fig. A.1.a.1.).

Los líquidos del espacio extracelular están compuestos, según Edelman y Leibman (95), por cuatro subdivisiones, tres de ellas separadas totalmente o en parte por membranas —plasma sanguíneo, líquido linfo-intersticial y líquido transcelular—, mientras que la cuarta está separada más vagamente. Dicha separación está basada en el tamaño de las moléculas, de los iones y de la velocidad con que pueden tener acceso a este subespacio —parte del fluido del tejido conectivo denso, cartílago y hueso— (95).

1. **El plasma:** lo constituye toda la sangre excepto los elementos celulares de la misma: células sanguíneas, plaquetas. El volumen aproximado es de 7,5% del volumen total del agua corporal. Está rodeado de las membranas endoteliales de los distintos vasos sanguíneos: arterias, venas, capilares, etc.... El endotelio de los capilares representa una gran proporción de superficie del compartimento vascular. La pared capilar es altamente permeable a los distintos tipos de moléculas que hay en el plasma, menores que las proteínas (95).

2. **Líquido linfo-intersticial, líquido intersticial:** Está formado por las moléculas que atraviesan las membranas de los capilares, y limitado por dichas membranas, por un lado, y por las membranas celulares por otro y, por las subdivisiones del tejido conectivo denso, en tercer lugar. En condiciones normales, el tejido linfático constituye la mayor parte del líquido linfático intersticial, salvo en situaciones patológicas, en las cuales se acumula líquido en una serie de espacios potenciales contiguos; y que se incluyen en la cavidad pleural, en la cavidad peritoneal, en la cavidad pericárdica y en las cavidades de las articulaciones, y en el espacio intersticial (edemas). Constituye el 20% del total del agua del organismo (95).

3. **Líquido transcelular:** Es el que ha sido secretado a través de varias membranas epiteliales (líquido gastrointestinal, orina, líquido cerebroespinal, sudor, líquido ocular, y otras secreciones menores). Los líquidos pertenecientes a esta subdivisión están separados del resto del organismo, al menos, por una capa de células epiteliales. Su volumen es el 1,5% del peso corporal, o el 2,5% del volumen

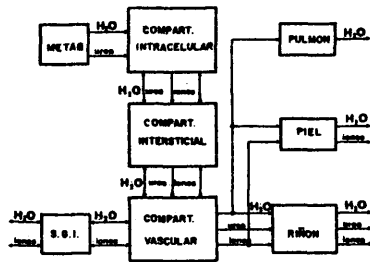


Fig. A.1.— Se presenta en forma de diagrama de flujos el sistema de regulación renal de los fluidos corporales. Se pueden ver los principales compartimentos de fluidos del organismo, así como las vías principales de entrada y salida de agua y de distintos electrolitos (tomado de ref. 188).

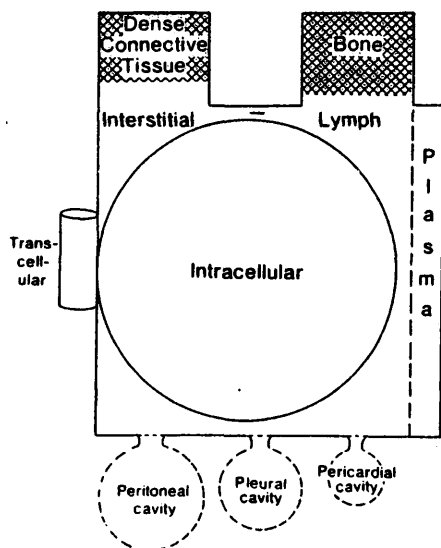


Fig. A.1.a.1.— Distribución del agua corporal. El fluido intracelular contiene la mayor parte del agua del organismo. El resto está formando parte del fluido extracelular. Las membranas de los capilares son altamente permeables al agua y los solutos, con excepción de las proteínas. Los tres círculos representan tres espacios potenciales del fluido extracelular. Las áreas rayadas representan zonas no accesibles a las moléculas utilizadas habitualmente como marcadores del VEC. El fluido transcelular representa a los fluidos del tracto urinario y gastrointestinal (tomada de ref. 95).

total de agua del organismo (95).

4. Partes del tejido conectivo, cartílago y hueso también contienen líquidos que no pertenecen a los líquidos intracelulares, pero tampoco comunican libremente con el líquido linfo-intersticial, que está contiguo a ellos. Parece que el agua y pequeños iones del espacio linfo-intersticial pueden penetrar en estas áreas libremente, pero moléculas de mayor tamaño como la inulina, glucosa, sacarosa, etc., tienen dificultado su acceso (Fig. A.1.a.1.). Este espacio representa el 15% del agua corporal (95).

A.1.a.1. Composición de electrolitos del líquido extracelular.

Dicha composición se presenta en la tabla A.1.a.1. Como se puede observar, el catión predominante es el Na^+ , y el anión principal el Cl^- , los siguientes electrolitos más importantes, en base a su concentración, son el bicarbonato, y en el plasma, las proteínas. En concentraciones mucho menores, están el K^+ , el Ca^{++} , Mg^{++} y los aniones PO_4H^- , PO_4H_2^- y SO_4^- . Los ácidos orgánicos están presentes en el espacio extracelular en forma de aniones —lactato, piruvato, citrato, y otros ácidos provenientes del metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como una serie de aminoácidos—, pero habitualmente su concentración es baja (<1 meq/l), excepto en el caso del láctico. Todo lo mencionado puede alterarse en situaciones patológicas.

La mayor parte del sodio intercambiable del organismo se encuentra localizado en el espacio extracelular. El Na^+ se encuentra en el plasma en solución, siendo muy pequeña la proporción ligada a proteínas (74). En el hueso, sin embargo, hay una gran cantidad de Na^+ que está firmemente ligada a la matriz del mismo y que se intercambia muy lentamente, este Na^+ , es aproximadamente el 30% de la cantidad total del organismo, y no parece participar en el intercambio con el conjunto de sodio del cuerpo, ni en condiciones de depleción extrema o hiponatremia (95). Sin embargo, la mayor parte del K^+ está en el compartimento intracelular. Cerca del 90% de todo el potasio corporal es intercambiable, este conjunto se mantiene relativamente constante. Su distribución está sujeta a considerables variaciones en caso de enfermedad (p.e.: acidosis metabólica).

El Ca^{++} y el Mg^{++} están unidos en una gran proporción a las proteínas plasmáticas y a las celulares (7, 154, 250, 348, 349). El H^+ es el catión que se puede considerar más ligado a otras moléculas en el organismo. Hay muy poca cantidad de H^+ libre en los líquidos corporales, si se excluyen los líquidos potencialmente ácidos, como la orina y el jugo gástrico (347). Así, en el contenido medio de agua corporal de un adulto (40 litros), solamente hay un total de ≈ 40 mEq $\times 10^{-4}$, H^+ libre. Una importante cantidad está unida a OH^- (como H_2O), a proteínas y a ácidos. El anión extracelular que está presente en mayor concentración es el Cl^- , está libre en solución y en una pequeña cantidad ligada a proteínas plasmáticas y también en algunas proteínas del tejido conectivo denso (95, 292). El CO_2H^- también aparece libre en solución, en los líquidos del espacio extracelular, pero su caracterización resulta difícil a causa de su interconversión, vía H^+ , en CO_2 y H_2O (95).

A.1.a.2. Distribución de los líquidos del espacio extracelular.

La adecuada distribución de líquido entre los distintos compartimentos que forman el espacio extracelular es crítica para el mantenimiento de la vida del animal, debido principalmente a la naturaleza esencial del volumen de plasma. La sangre es el principal vehículo entre las células del organismo y su entorno. Las células tienen que recibir sustancias imprescindibles para la vida —oxígeno, sustratos energéticos, materiales para síntesis—, y deben eliminar metabolitos —dióxido de carbono, agua y compuestos nitrogenados— en dicho entorno. El transporte por la sangre, a su vez depende de la circulación, y a su vez ésta depende de un adecuado volumen de dicho líquido. Por lo tanto, el mantenimiento del volumen de plasma es una imperiosa prioridad del organismo (18, 148, 321, 354). Para el organismo es un problema importante el mantenimiento del volumen de un líquido bajo presión en un compartimento, cuyas paredes son altamente permeables al agua y a los distintos solutos. Si la

TABLA A.1.a.1. CONCENTRACIONES MEDIAS DE LOS ELECTROLITOS EN EL VEC. EN HUMANOS

IONES:	PLASMA		FLUIDO INTERSTICIAL	
	mEq/L	mEq/kg H ₂ O*	mEq/kg H ₂ O**	mEq/kg H ₂ O**
Na ⁺	141	150	144	144
K ⁺⁺	4.6	5	4.6	5
Ca ⁺⁺	5	5	3	3
Mg ⁺⁺	2	2.5	1.5	1.5
H ⁺	4x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁵
Total de Cationes	152	161		153
CL ⁻	103	110	114	114
CO ₃ H ⁻	26	27	28	28
PO ₄ H ⁻ y PO ₄ H ₂ ²⁻	2	2	2	2
SO ₄ ²⁻	1	1	1	1
Proteinas	16	17	4	4
Acidos orgánicos	4	4	4	4
Total de aniones	152	161		153
AGUA:				
Volumen por unidad medida:	940 ml/L	1000 ml/kg H ₂ O	1000 ml/kg H ₂ O	1000 ml/kg H ₂ O
Concentración(osmo- laridad).		289 mOsm/kg H ₂ O	289 mOsm/kg H ₂ O	288 mOsm/kg H ₂ O

Valores tomados de Altman y col. (7)

* Valores de la primera columna están divididos por 0,94 para corregir el volumen de la fracción acuosa del plasma.

**Calculada a partir de la columna anterior, factor de Donnan es 0,96(iones univalentes) y 0,92 (iones divalentes) (7,154,250,348).

presión hidrostática impuesta por el corazón no contase con ninguna fuerza oponente, el plasma podría fluir rápidamente hacia el espacio intersticial y desaparecer. El mecanismo por el que esto no ocurre en el organismo fue apuntado primeramente por Starling (321), y es por la existencia de la presión oncótica, es decir, la presión osmótica generada por las grandes moléculas de proteínas, cuyo movimiento a través de las paredes capilares está muy restringido por su tamaño. Por esta causa, al existir un gradiente de presión hidrostática a lo largo de los capilares (necesario para el mantenimiento del flujo), hay una presión neta que favorece el flujo de salida de líquido al exterior del capilar en los extremos arteriales y, una presión neta que favorece la entrada de fluido al interior de los extremos venosos de los capilares (18, 148).

A.1.a.3. El intercambio externo.

El organismo comunica con el medio exterior, con la sangre como intermediaria en tres puntos concretos (Fig. A.1.a.3.): Los pulmones, para el intercambio de CO_2 y O_2 , el tracto gastrointestinal, para la ingesta de solutos y de agua, y el riñón para la excreción de electrolitos y de otros solutos. Igualmente hay pérdidas de agua por medio de los pulmones; de agua y de solutos mediante la piel y en más pequeña cantidad por medio del tracto gastrointestinal. Las pérdidas pueden incrementarse en estados patológicos, o en condiciones ambientales extremas (18, 321).

A.1.b. Interdependencia del control osmótico y del control del volumen.

El control del volumen extracelular debe ser coordinado con el control de la presión osmótica de los fluidos corporales. Mientras el primero se considera, generalmente, en términos de la regulación del balance de sodio en el organismo, el control de la osmolaridad del espacio extracelular puede considerarse en términos de la regulación del balance de agua (123). Es interesante comparar algunas características de estos dos sistemas de control. La capacidad para el control de la presión osmótica de los fluidos corporales parece ser más precisa que la capacidad para el control de volumen del espacio extracelular. Así, por ejemplo, ante la administración de volúmenes equivalentes de agua o de salino, el organismo responde más rápidamente a la administración de agua y lleva a cabo una eliminación más completa del exceso de volumen, que frente a la infusión de salino (123, 285). Esta capacidad del organismo para desprenderse de una sobrecarga de agua tan rápidamente, muestra dos cosas, la sensibilidad de los mecanismos osmorreceptores para responder frente a pequeños cambios en la presión osmótica de los fluidos corporales, y también la gran capacidad del riñón para excretar orina diluida en ausencia de hormona antidiurética (123).

A.1.b.1. Papel de los receptores de volumen en el control de la secreción de ADH.

Parece claro que en ciertas circunstancias, distinciones simplistas entre el sistema de control del volumen y de la osmolaridad como las mencionadas anteriormente, no pueden sostenerse. Por ejemplo, como resultado de una serie de trabajos entre ellos, los de Gauer y Henry, es evidente que uno de los factores que regulan la secreción de ADH es el grado de tensión de los barorreceptores, situados en las paredes del atrio cardíaco (123, 122, 304). Así, pequeños aumentos en el volumen de sangre, que no se asocien con ningún cambio perceptible en la PA, dan lugar a aumentos en la actividad de las fibras aferentes del atrio que se insertan en el nervio vago (9, 161, 162), produciendo una acción inhibitoria sobre la secreción de la ADH. En apoyo de esto, Johnson, Moore y Segar (168), han demostrado una correlación inversa significativa entre cambios en la presión transmural del atrio izquierdo y la concentración de ADH en el plasma. Igualmente se ha encontrado estos aumentos en situaciones de pérdidas importantes de sangre, con descensos en la PA (308, 311).

Más evidencia acerca de la importancia de los receptores de volumen en el control de la se-

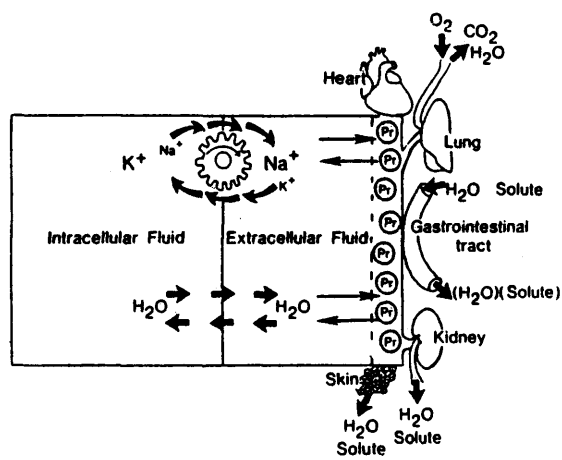


Fig. A.1.a.3.— Representación integrada de los fluidos corporales. Descripción en el texto (cf. C.1.a.3.), "Pr", corresponde a las proteínas plasmáticas (tomado de ref. 7, 188).

creción de ADH, puede obtenerse de las respuestas del lóbulo posterior de la hipófisis frente a cambios simultáneos en el volumen y en la osmolaridad de los líquidos corporales, Verney ha observado que una hemorragia puede abolir una diuresis producida por una sobrecarga de agua, a pesar de que se produzca un descenso en la osmolaridad del espacio extracelular (346). También (30) se ha demostrado que incluso una hemorragia modesta (6% del volumen sanguíneo), basta para inhibir la diuresis producida por una infusión de agua en el seno carotídeo de perros anestesiados en ausencia de cambios en la PA y en el ritmo cardíaco. Los estudios de Dunn y colaboradores (92) muestran que la concentración en plasma de la hormona arginina-vasopresina aumenta de forma exponencial tras la depleción de un 8% del volumen de plasma. En este sentido, los trabajos de Andersson (8) muestran evidencia de que el control de la concentración de sodio en el volumen extracelular forma parte de las actividades de los receptores cerebrales que regulan la secreción de ADH incluso de forma tan importante o más que el del control de la osmolaridad del espacio extracelular.

A.1.b.2. La sed y el apetito de sal.

La sed como respuesta a una situación de depleción de volumen es un fenómeno claro y comprobado por cualquiera que lo haya podido sentir. El estímulo exacto que desencadena este mecanismo permanece aún sin determinar (8, 113, 114). Hay evidencia que une la sed con la secreción de ADH (8, 216). Aumentos en la osmolaridad del VEC, así como descensos isotónicos en el VEC estimulan la sed (8, 11). Por otro lado, el control del apetito de sal está menos estudiado que el de la sed (363). Parece que este mecanismo está más desarrollado en una serie de especies animales, que en el hombre (9). Hipovolemia e hipoosmolaridad estimulan el apetito de sal (57). Ambos fenómenos biológicos son de gran interés dentro del control del VEC, pero una revisión detallada del tema se escapa del objetivo de esta Tesis.

A.1.c. Regulación del volumen extracelular frente a variaciones en el balance de sodio.

A.1.c.1. Variaciones en la ingesta de sodio.

En la figura A.1.c.1. se representa de un modo esquemático, la respuesta de un individuo normal frente a un cambio rápido en la ingesta diaria de sodio (94). Cuando la ingesta de sodio aumenta, la excreción aumenta gradualmente durante varios días hasta alcanzar un estado estacionario que coincide con la ingesta. Durante esta fase se produce un pequeño balance positivo de sodio, y se retiene agua en proporciones isotónicas, manteniéndose constante la osmolaridad de los líquidos corporales. Esta ganancia de agua y de sal en el espacio extracelular, se traduce en un aumento del peso del individuo. Inversamente, cuando la ingesta de sodio elevada se reduce, hay un período de varios días, durante el cual la excreción de sodio es superior a la ingesta del mismo, produciéndose como resultado un pequeño déficit del contenido de agua y de sal, que da lugar a una pérdida de peso (94, 285).

A.1.c.2. Infusiones de aldosterona y mineralocorticoides.

La relación entre el volumen del espacio extracelular y la excreción de sodio ha sido demostrada en la respuesta a la administración continuada de hormonas que inducen la retención de sodio (Fig. A.1.c.2). La administración de aldosterona conduce a un descenso inicial de la excreción de sodio, que va seguido de un retorno gradual a los niveles basales de excreción del mismo, aunque se continúe con la administración de esta hormona, dicha administración se acompaña de una progresiva expansión del volumen extracelular. Esta respuesta a la administración continuada de mineralocorticoides es denominada como el "fenómeno de escape" (17, 185). Cuando se deja de administrar la hormona se produce un rápido aumento en la excreción de sodio, y el peso y el volumen extracelular vuelven a sus valores normales.

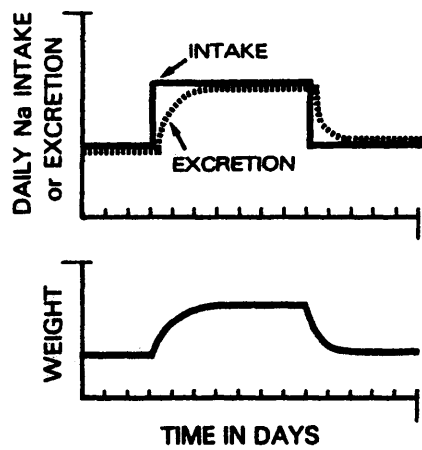


Fig. A.1.c.1.— Respuesta a cambios en la ingesta diaria de sodio. Cuando hay un aumento brusco en la ingesta de Na^+ , la excreción urinaria de sodio presenta una fase de retraso, durante la cual hay un pequeño balance positivo de sodio y agua, que se asocia con un aumento del peso (tomado de ref. 94). Seguidamente se establece una fase estacionaria de la excreción de sodio a niveles superior y correspondiendo con los aumentos de la ingesta.

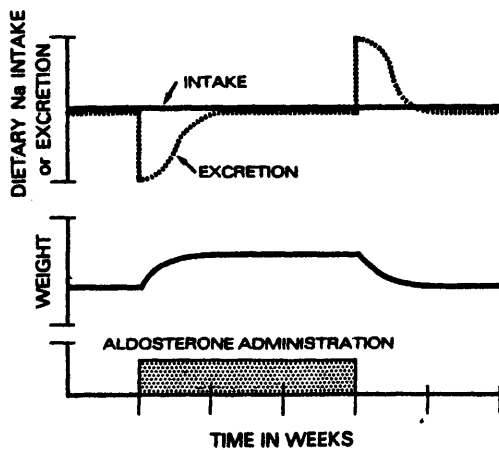


Fig. A.1.c.2.— Respuestas a la administración continuada de aldosterona: Hay una fase inicial de retención de agua y de sal. Transcurridos una serie de días el peso corporal aumenta y la excreción de sodio aumenta hasta alcanzar valores basales, produciéndose el denominado fenómeno del "escape". Si se deja de administrar la hormona, se produce una rápida natriuresis y el VEC y el peso corporal vuelven a sus valores basales (tomado de ref. 17).

A.1.c.3. Expansión del volumen extracelular mediante sobrecargas salinas.

La infusión intravenosa de importantes cantidades de cloruro sódico isotónico da lugar a un rápido e importante aumento de la tasa de excreción de agua y de sal –“diuresis salina”–. A pesar de las condiciones, a veces poco fisiológicas, que conllevan, estas experiencias han ayudado grandemente a la investigación de los factores responsables de estas respuestas diuréticas y natriuréticas (83, 87, 204, 233, 282, 300, 368).

Después de esta revisión sobre la importancia del control del volumen extracelular en el organismo, se puede esperar que los factores responsables de controlar dichos cambios en el VEC sean múltiples y complejos y se debe considerar que hay varias vías en la regulación del balance de sodio, en las que interactuarán los distintos factores.

En resumen, el volumen de los flúidos del espacio extracelular, y de sus compartimentos principales están estrechamente regulados en el organismo, para un determinado estado de capacidad de los espacios vascular e intersticial. Siempre que la presión osmótica de los flúidos corporales se mantenga constante, por medio de la regulación del balance de agua, –mediante los mecanismos osmorreceptores y la secreción de ADH– el control del volumen extracelular se realiza básicamente mediante la regulación de la excreción renal de sodio. Este esquema, que simplifica toda la formulación general de la regulación del VEC, se va complicando cada vez más, a medida que se investiga cómo valora el organismo exactamente los distintos estados de volumen en el espacio extracelular, y cómo esta información es transmitida a los receptores centrales, los cuales la transmitirán a su vez al riñón, con objeto de que se lleven a cabo los cambios oportunos en el manejo renal de agua y de sal.

En base a esto, nos planteamos comentar tanto los mecanismos encargados de conocer el estado del VEC: RAMA AFERENTE DEL CONTROL DEL VOLUMEN EXTRACELULAR. Como los mecanismos efectores, encargados de regular la excreción renal de sodio: RAMA EFERENTE DEL CONTROL DEL VOLUMEN EXTRACELULAR. Conviene tener presente que ambas clasificaciones son conceptos fisiológicos, necesarios para el abordaje del estudio del control del VEC, aunque parte de las estructuras físicas, órganos, etc., incluidos en alguna de estas ramas, cumplan a la vez, una misión aferente y eferente, como es el caso del riñón.

A.1.d. Rama aferente del control del volumen extracelular.

A.1.d.1. Receptores de volumen.

Tal y como se ha indicado anteriormente, aumentos en el VEC dan lugar a aumentos en la excreción renal de sodio, mientras que una disminución en el VEC producen descensos en la excreción de sodio. Strauss y col. (326) señalaron de modo concluyente que la alteración en el VEC es el único estímulo para que el riñón responda a pequeños cambios en el contenido total de sodio en el espacio extracelular. Este punto de vista ha sido apoyado en trabajos posteriores y por las investigaciones realizadas por Mc Cance (228) en personas a las cuales les induce una deplección de sodio mediante el aumento de la sudoración y les mantiene con una dieta de bajo contenido en sodio. Estas personas no respondieron a una sobrecarga intravenosa de sodio, con un aumento de la excreción del mismo, hasta que el déficit de sodio en el organismo no se restituyó. Estas experiencias demuestran claramente que hay un período de retraso necesario antes de que se lleven a cabo los reajustes en la excreción de sodio, frente a cambios en la ingesta diaria del mismo, y ese retraso es para que se efectúen los cambios necesarios en el VEC. Estos hechos ponen de manifiesto que los receptores para el volumen forman parte de la rama de control que regula la excreción de sodio (96, 123, 316, 356).

En la tabla A.1.d.1, se resumen algunos de los posibles lugares extrarrénales en los que se pueden localizar los receptores de volumen. También se incluyen una serie de mecanismos intrarrénales, que pueden actuar como unos receptores “de volumen”; este concepto se discutirá posteriormente.

CINA

TABLA. A.1.d.1. MECANISMOS AFERENTES IMPLICADOS EN EL CONTROL DEL VEC.

EXTRARRENALES:

Barorreptores arteriales: Arco aortico, senos carotideos.

Receptores intratoracicos de baja presión: Atrio, grandes venas.

Reptores del hfgado y del lecho vascular portal.

Receptores para los cambios en la concentración de sodio en el fluido cerebroespinal.

INTRARRENALES:

Barorreceptores: Aparato yuxtglomerular.

Quimiorreceptores: Macula densa.

Mecanorreceptores: Alteraciones en la presión intersticial.

Mecanismo de retroalimentación de la macula densa: Alteraciones en la tasa de filtración glomerular en respuesta a cambios en el volumen de plasma.

Alteraciones en la fracción de filtración, influenciando el entorno peritubular.

Sensibilidad tubular frente a alteraciones en factores hemodinamicos intrarenales, en la composición del plasma, o en otros factores.

A.1.d.2. Localizaciones extrarrenales de los receptores de volumen.

A.1.d.2.a. Circulación arterial.

Hay bastante evidencia de que los receptores de volumen, situados en el circuito arterial de alta presión, son capaces de sentir las variaciones en el llenado de la circulación y de acuerdo con ello, modular la excreción renal de sodio (97). Más concretamente, se ha postulado que el riñón parece ser capaz de responder mejor frente a aumentos del llenado efectivo del árbol arterial, que frente a una disminución del llenado de los lechos vascular y pulmonar. Esto sugeriría que el volumen efectivo de la sangre arterial es, de algún modo, un factor esencial en el control de todo el conjunto del volumen extracelular (164). Esto ha hecho postular a los fisiólogos el concepto de "volumen de sangre arterial efectivo", (VSAE)(305), que se refiere a la parte del sistema arterial que es capaz de estimular a los receptores de volumen que modulan la excreción renal de sodio. Ninguno de los dos —receptores de volumen y VSAE— son estructuras físicas, sino conceptos fisiológicos. Por otro lado, está claro que el VSAE no puede separarse de las consecuencias de los cambios en la presión de perfusión en sí.

Es posible que cambios en la circulación arterial extrarrenal influyan en la excreción renal de sodio, a través de cambios reflejos en las acciones neuroles y humorales, mediadas por los barorreceptores del circuito arterial. Sin embargo, cambios en la adecuación del llenado vascular —mediados posiblemente por alteraciones en el retorno venoso, en la función del ventrículo izquierdo, o en las resistencias vasculares periféricas— pueden influir directamente en la presión de perfusión renal y alterar la función renal a través de cambios en los factores físicos (Fig. A.1.d.2.a.).

La perfusión del riñón con un aporte adecuado de sangre, depende del gasto cardíaco (A) y de las resistencias vasculares periféricas (B). Un descenso en el gasto cardíaco (A), o un aumento o descenso en RVP —dependiendo de las circunstancias fisiológicas— puede conducir a una retención de sodio en el túbulo renal. Por lo tanto, resulta muy problemático el concepto de que el volumen de sangre efectivo (VSAE) pueda reducirse sin un descenso concomitante de la presión de perfusión renal. Se puede concluir que si hay evidencia sólida de la presencia de barorreceptores en el árbol arterial, que influyen en la secreción de ADH (299), pero no la hay en igual medida que relacione la presencia de estos barorreceptores y el control de la excreción de sodio.

A.1.d.2.b. Receptores de volumen del sistema de baja presión central.

El 85% del volumen de sangre circulante está en la circulación venosa. El lecho vascular venoso es un espacio altamente distensible, y está bien preparado para detectar pequeños cambios en el volumen de sangre, los cuales pueden sentirse mediante variaciones en la tensión de las paredes —por ejemplo: mecanorreceptores, como existen en el tórax— (121, 122). De las estructuras del tórax, que pertenecen al sistema de circulación de baja presión, la más distensible es el atrio auricular cardíaco (121). El atrio está poblado de numerosas terminaciones nerviosas; se han descrito varios tipos de receptores: Receptores B (Paintal) (262) —terminaciones no encapsuladas— sensibles a pequeños cambios en la distensión pasiva. Receptores A (Ardnt), que responden a cambios activos en la tensión de la pared del atrio (303). Otro tipo de receptores son los situados en los capilares pulmonares y en el tejido intersticial de este órgano (Receptores J. de Paintal) (262). Reaccionan frente a cambios de volumen en el intersticio, de cara a prevenir la formación del edema pulmonar. Según han señalado Gauer y Henry (122), para que estos receptores realicen su función con efectividad, se deben cumplir ciertas condiciones:—

1.— Que la presión de llenado de las venas pertenecientes a la circulación de baja presión, y situadas cerca del corazón, debe ser un reflejo directo del volumen de sangre.

2.— Que estos receptores deben ser capaces de influir apropiadamente sobre los mecanismos neurohormonales, que pueden actuar sobre el control del VEC, tales como la sed, la secreción de

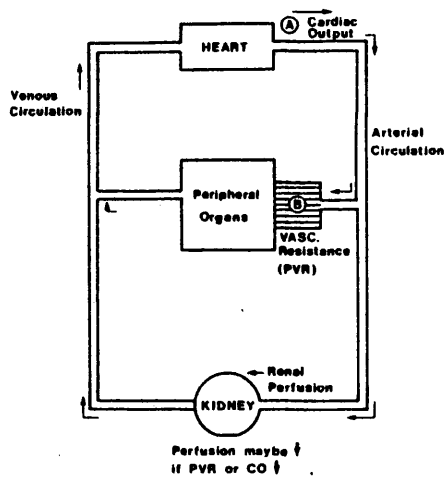


Fig. A.1.d.2.a.— La perfusión del riñón con un aporte adecuado de sangre depende del gasto cardíaco (A) y de las resistencias vasculares periféricas (B). Un descenso de (A), o un aumento o un descenso de (B) (dependiendo de las circunstancias fisiológicas) puede conducir a una retención de sodio en el túbulo renal. Resulta problemático el concepto de que el volumen de sangre efectivo puede reducirse sin un descenso concomitante de la presión de perfusión renal (tomado de ref. 305).

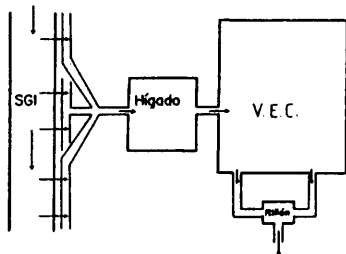


Fig. A.1.d.2.c.— Situación circulatoria estratégica del hígado: Diagrama de flujos entre el hígado, el SGI, la circulación general en su conjunto (VEC) y el riñón.

ADH, las reacciones simpáticas, la excreción de sodio y el tono de los esfínteres pre y post capilares. Hay bibliografía reciente que apoya el papel esencial de estos receptores en el control del VEC (122, 256).

De acuerdo con esto, un aumento en el volumen del compartimento vascular torácico debe venir asociado a un aumento de la diuresis y en la natriuresis, mientras que un descenso en el volumen de sangre de este espacio debe estar asociado con antidiuresis y antinatriuresis. Esto ha sido demostrado ampliamente mediante una serie de manipulaciones experimentales. Entre las situaciones que aumentan el volumen venoso central están:

- Presión negativa respiratoria (de inspiración)
- Permanencia en cama.
- Ingravidez.
- Inmersión en agua.
- Exposición al frío.
- Hiperbaria (aumento de presión sobre el organismo).

Todas ellas, cabe esperar que produzcan aumentos en la excreción urinaria de sodio y en la diuresis (121, 122).

Entre las situaciones que disminuyen marcadamente el volumen sanguíneo central están:

- Posición vertical (bipedestación humana).
- Presión positiva de respiración.
- Aplicación de torniquetes en venas de las extremidades inferiores.

Todas ellas están asociadas a reducciones en el flujo urinario y en la excreción de sodio.

Entre las experiencias que han demostrado recientemente de modo claro la influencia de las alteraciones en el volumen de sangre intratorácica sobre la excreción renal de sodio, están las realizadas por M. Epstein y col. (98) utilizando la técnica de inmersión en agua a temperatura corporal. La inmersión de una persona en estas condiciones hasta el cuello, produce una redistribución del volumen de sangre desde la periferia al tórax —que retiene unos 700 – 800 ml. de sangre—. Esto es un estímulo importante y similar al que produciría una infusión de salino isotónico, del orden de un 3% del peso corporal (98). La inmersión en agua se acompaña de un claro aumento en la excreción de agua y de sal, que se correlaciona con el aumento de volumen de sangre central. También se ha demostrado que la amplitud de la respuesta urinaria está en función del estado de hidratación previo del individuo.

A.1.d.2.c. Papel del hígado en la rama aferente del control del volumen.

El papel del hígado dentro del conjunto de los receptores sensibles a los cambios en la composición y en el volumen del espacio extracelular ha sido postulado por un buen número de investigadores (120, 150, 291). Asimismo, estudios de neurofisiología muestran al hígado como un órgano muy innervado. Si se tiene en cuenta que el hígado está situado anatómicamente en una posición estratégica (Fig. A.1.d.2.c.) de tal modo que todo el flujo esplácnico es conducido por medio de la vena porta hacia el interior del mismo antes de regresar al corazón (150). Y conocida la existencia de grandes variaciones temporales en la ingesta diaria, no es arriesgado pensar que la sangre que drena los intestinos pueda mostrar, al menos transitoriamente, cambios importantes en la osmolaridad y en la concentración de Na. Por lo tanto, se podría decir que el hígado está situado idealmente para poder sentir y analizar estas variaciones fisiológicas y poder actuar como un posible receptor (1, 291). Por otro lado, la enfermedad hepática se complica frecuentemente con alteraciones en la función renal y particularmente en el manejo de agua y de sal (75, 150, 291). Sin embargo, el papel del hígado y sus territorios anejos, (plexos, mesentéricos, zona esplácnica, sistema porta, etc.), en la regulación del volumen extracelular, se desconoce todavía la mayoría de sus aspectos básicos (291). Al ser precisamente el objetivo de esta Tesis Doctoral, la investigación del papel del hígado en la regulación renal del VEC, se ha realizado en el apartado A.3., de esta Introducción, una revisión bibliográfica sobre el tema.

A.1.d.2.d. Receptores para los cambios en la concentración de sodio en el líquido cerebroespinal.

Se ha demostrado hace tiempo el papel de los receptores cerebrales en el control del balance de agua en el organismo (9, 11). Sin embargo, la demostración de la existencia de un sistema aferente similar, para el control del balance de sodio, no se ha logrado totalmente. Hay abundante evidencia del papel que los cambios en la concentración de sodio del líquido cerebroespinal ejercen sobre la excreción renal del mismo (30, 91, 329). La infusión local de soluciones hiperosmolares de Cl Na en la arteria carótida producen un aumento mayor y más rápido en la natriuresis, que la infusión de idénticas soluciones en una vena sistémica (30). Similares resultados se obtienen si la infusión hipertónica se realiza en el tercer ventrículo (91, 329).

En sentido opuesto, la disminución de la concentración de sodio en el líquido cerebroespinal parece asociarse a descensos en la excreción de sodio (241).

A.1.d.3. Mecanismos aferentes intrarrenales en el control del VEC.

Según se puede observar en la tabla A.1.d.1., además de los distintos mecanismos reflejos que provienen del sistema venoso central y de los más importantes sistemas arteriales, hay gran evidencia que sugiere, que el riñón puede llevar a cabo funciones aferentes, además de seguir siendo el principal órgano efector en el control del VEC (322). El riñón es capaz de responder directamente, frente a alteraciones de la presión de perfusión, con cambios en la secreción de renina y en la función de los túbulos renales (9, 288, 322) por medio de factores hemodinámicos, y posiblemente factores hormonales intrarrenales.

A.1.e. Mecanismos eferentes del control del volumen del espacio extracelular.

A.1.e.1. Sistema nervioso simpático.

Hay cada vez más evidencia que sugiere que el sistema nervioso simpático juega un papel importante más que el que hasta ahora se le atribuía (28, 315) en el control de la función renal y en la regulación del VEC a través de su participación en el arco reflejo renal-cardio-pulmonar. Este papel se va aclarando a medida que se amplía el conocimiento sobre las fibras nerviosas simpáticas en el riñón, así como sobre su influencia en las resistencias vasculares renales, en la secreción de renina y en el transporte de electrolitos.

a) Inervación simpática renal.

Los vasos de la corteza renal poseen un buen número de terminaciones nerviosas simpáticas. También se ha demostrado que los túbulos renales tienen una inervación simpática directa (23, 246). Las terminaciones nerviosas se encuentran en el músculo liso de las paredes de las arteriolas, en las células glomerulares, así como en las células de los túbulos proximal y distal.

b) Efecto sobre la resorción tubular.

Hay evidencia que sugiere que, aparte de las acciones, ya conocidas, del sistema nervioso simpático sobre la resistencia vascular de la corteza renal, parece ejercer una acción sobre los túbulos renales aumentando la tasa de resorción de sodio (88). Hay cambios reflejos en la actividad del sistema nervioso simpático, que provienen de los barorreceptores del sistema de baja presión de la circulación. La alteración en el llenado de la circulación se puede afectar inmediatamente al manejo renal de sodio y además producir cambios reflejos en la secreción de ADH. Un hecho que se ha puesto de manifiesto es que el bloqueo del sistema nervioso adrenérgico afecta a la función renal —por ejemplo: el bloqueo del SN simpático con guanidina, produce un descenso de la excreción de sodio (142). La denervación cardíaca, suprime la respuesta natriurética a la expansión de volumen, mientras que, la denervación simpática renal, produce un efecto opuesto (130, 265). Sin embargo, hay autores como Weaver (351) que sugieren que “las influencias humorales y nerviosas sobre el riñón pueden ser

redundantes y, que una podría compensar a la otra en caso de que falte alguna de ellas”.

A.1.e.2. El sistema renina-angiotensina-aldosterona.

En 1898 Tigersted y Bergman (330) identificaron y dieron el nombre de renina a un componente de un extracto crudo de riñón, que ellos habían demostrado que producía aumentos en la presión sanguínea, pero estos resultados llamaron poco la atención hasta 1934, cuando Goldblatt y col. (137) describieron que la isquemia renal en perros estaba asociada a aumentos en la secreción de renina y a presencia de hipertensión. A partir de estos estudios, este factor humoral tiene gran importancia en las investigaciones sobre la patogenia de la hipertensión, y dentro del papel del riñón en la regulación del balance de los líquidos y de los electrolitos (78, 149, 273, 328).

La renina es una enzima glicoproteica que actúa sobre una α_2 globulina, (el sustrato de la renina) denominado angiotensinógeno, biosintetizada en el hígado y liberada a la circulación (249). De esta reacción se produce angiotensina I. Sobre esta última actúan una serie de enzimas convertasas y producen la pérdida de dos aminoácidos C-terminales, dando lugar a la angiotensina II, que es una sustancia presora muy potente y un estimulante específico de la biosíntesis de la aldosterona en la zona glomerulosa de las adrenales. Los principales puntos de control de este ciclo implican el control de la secreción de renina, y son las alteraciones en la presión y en la sensibilidad de las adrenales a la angiotensina II. Por último, hay bastantes revisiones sobre la bioquímica de este sistema (78, 238, 260).

A.1.e.2.a. Aldosterona.

El papel de la hormona de la corteza adrenal en el control del balance de sodio ha sido investigado ampliamente desde su identificación y aislamiento, en los comienzos de la década de los 50 (314). Hay varias revisiones sobre la biosíntesis de esta hormona (245, 359). La importancia de esta hormona en este control aumentó al conocer el papel de la angiotensina II, modulando la secreción de aldosterona (264). En este sentido, parecía que el sistema renina-angiotensina-aldosterona formaba una unidad funcional, capaz de responder de forma apropiada frente a cambios en el volumen del espacio extracelular. Cuando hay un déficit de la concentración de sodio o una contracción del VEC, la renina es secretada en el riñón, bajo influencia del aumento de la actividad nerviosa simpática, y el aumento de los niveles de renina dan lugar a un aumento de la secreción de aldosterona, vía aumentos en la Angiotensina II. En una situación de una ingesta suficiente de sodio, la retención de sodio inducida por la aldosterona reestablecería el volumen de los fluidos del espacio extracelular y se inhibiría la secreción de renina. Inversamente, un exceso de sodio y una expansión de VEC, suprimiría la concentración plasmática de renina, angiotensina II y aldosterona, permitiendo que el exceso de sodio se excretase libremente por el riñón y se reestableciera VEC (264, 359). Sin embargo, a pesar de lo razonable de este esquema, hay que tener en cuenta las condiciones siguientes: la fracción de la carga de sodio filtrada que parece estar bajo control de la aldosterona es pequeña; las células sobre las que actúa esta hormona de la corteza adrenal, están localizadas en los segmentos distales de la nefrona (83). Además, la natriuresis, observada tras una expansión aguda de volumen, tiene lugar en presencia de elevadas concentraciones de aldosterona en plasma (83, 185). Por otro lado, el organismo parece “escapar” a los efectos de la administración continuada de altas dosis de aldosterona y de otras hormonas mineralocorticoides (17, 185).

Además, hay trabajos que demuestran que las personas y los animales adrenalectomizados, que reciben unas dosis fijas de mineralocorticoides, pueden responder perfectamente a cambios en la ingesta de sodio, siempre y cuando el contenido del mismo no les sea restringido severamente (290). Se puede decir que la importancia tan elevada que en un principio parecía jugar la aldosterona, ha ido disminuyendo a medida que se conoce mejor su papel (369). Se han llevado a cabo numerosos estudios para ver el control del VEC en ausencia de aldosterona, y frente a cambios en la ingesta de sodio, con o sin administración de mineralocorticoides sustitutivos (290, 369). De estos estudios se

puede concluir que en ausencia de un mecanismo normal de retroalimentación que inhiba a la aldosterona, o bien, durante la administración de dosis muy altas de mineralocorticoides, se consigue mantener el balance de sodio frente a las variaciones en el contenido del mismo en la ingesta (83, 185, 369). Esto es una evidencia clara de la multifactorialidad del control del VEC, de tal modo que en ausencia de aldosterona se ponen en acción otros mecanismos sustitutivos.

A.1.e.2.b. Angiotensina II.

Es un octapéptido muy importante para el mantenimiento del VEC y de la suficiencia de la circulación, mediante dos funciones principales: la estimulación de la secreción de aldosterona, y la acción vasoconstrictora en la circulación periférica.

La angiotensina II (A II) parece actuar sobre distintas áreas del sistema nervioso central, dichas acciones se cree que están mediadas por receptores en los órganos circunventriculares –neurohipófisis, eminencia media,...–, actuando sobre uno o varios de estos órganos, A II parece estimular la sed y aumenta la ingesta de líquidos (216) y por estimulación del sistema nervioso simpático puede producir aumentos en la P.A. (118). A II parece estimular la secreción de ADH y ACTH. A II también ejerce una acción directa sobre el transporte de sodio en los túbulos renales. La administración de pequeñas dosis de A II produce antinatriuresis, descenso en la FG y en el FPR, sugiriéndose que estos cambios son secundarios a los efectos hemodinámicos de A II. A dosis farmacológicas, A II produce natriuresis (156). En trabajos recientes sobre túbulos aislados de conejos, se sugiere que A II estimula la resorción de sodio y que sólo la inhibe en dosis farmacológicas (156, 169).

A.1.e.3. Prostaglandinas.

Constituyen una familia de lípidos ácidos con una gran variedad de acciones. En el riñón, pueden modular el flujo sanguíneo renal y la secreción y los efectos de otras hormonas renales (12, 93). La bioquímica y la fisiología de estos lípidos vasoactivos ha sido estudiada ampliamente (12, 93, 160). En este apartado vamos a comentar el papel de las prostaglandinas en el control de la excreción renal de sodio (93). Las prostaglandinas son sintetizadas a partir del ácido araquidónico por la acción de un grupo de enzimas denominadas "prostaglandinas sintetetas". Las endoperoxidasas intermediarias se transforman a su vez en tres productos principalmente: Prostaglandina E₂ (PGE₂), Tromboxano A₂ (TXA₂) y Prostaciclina (PGI₂). Parece ser que el riñón forma también dos compuestos adicionales: PGF_{2α} y PGD₂ (93, 303). Otros tejidos también tienen capacidad para formar PG.

A.1.e.3.a. Prostaglandinas y el sistema renina-angiotensina.

Parecen estar implicados de una manera compleja. Esta relación ha sido esquematizada recientemente (160) (Fig. A.1.e.3.a.). Un hecho importante es que son antagonistas de la acción de A II, produciendo un efecto protector, en situaciones agudas, de la circulación (12). Las prostaglandinas (PG) pueden estimular directamente la secreción de renina (93, 124, 126, 165), y parecen ser un paso intermediario en la acción de los barorreceptores sobre la secreción de renina, pero no ocurre lo mismo con la acción del sistema nervioso β adrenérgico sobre esta última, al menos en el hombre y en el perro (303). Sin embargo, en la rata (160) y en el gato (160) las PG modulan la acción de los mecanismos β-adrenérgicos sobre la renina. También hay evidencia reciente del papel modulador de los PG en los mecanismos de la mácula densa que afectan a la secreción de renina (303). La localización del AMP_c en el esquema funcional PG-renina no está del todo aclarada (160, 303).

A.1.e.3.b. Prostaglandinas y el balance de agua y de sodio en el organismo.

El papel de las PG en el balance de agua ha sido estudiado y confirmado ampliamente (93,

303). Hay evidencia que apoya el papel de las PG modulando la secreción de ADH (126). Parece ser que ejercen un efecto antagónico al de la ADH, los mecanismos celulares de esta acción no se conocen, aunque se postula que las PG disminuyen el efecto de las ADH estimulando el AMPc del tejido renal (160).

Las PG contribuyen también a la regulación del balance de sodio, aunque hay resultados muy divergentes en la investigación de este papel. Parecen facilitar la excreción de una sobrecarga salina, bien por acción directa sobre el túbulo, o bien por sus efectos vasodiladores y por tanto, mediante la acción sobre los factores físicos. Hay poca evidencia de su papel en la regulación de la excreción renal de sodio en condiciones normales (93, 160, 303).

A.1.e.4. Sistema de las calicreinas-kininas renales.

Las Kininas son un conjunto de hormonas polipeptídicas biológicamente activas (203, 232). Hasta el momento se conocen tres kininas principales: Bradiquinina (nonapéptido), Lys-bradiquinina (decapéptido), y la Met-Lys-bradiquinina (undecapéptido). Las kininas son biosintetizadas a partir de una α_2 globulina (kininógeno) específica, mediante la acción de la peptidasa calicreina. Esta enzima se puede encontrar en el plasma, en granulocitos circulantes o bien en glándulas y órganos. Las kininas son destruidas fácilmente por peptidasas. El riñón es particularmente rico en kininasa II. Esta enzima es responsable también de la conversión de A I en A II. Las calicreinas renales parece que se forman en el túbulo contorneado distal y son secretadas en la orina y posiblemente a la linfa (302). El papel del sistema de calicreinas y kininas en la regulación de la respuesta renal, frente a cambios en el VEC, no está totalmente aclarado (303). Las kininas parecen tener efectos vasodiladores y natriuréticos potentes cuando se administran sistémicamente (252, 303), y ello podría ser debido, en parte, a un aumento de la producción de prostaglandinas (33, 303). No hay una evidencia demasiado firme que relacione cambios en el sistema de calicreinas renales, con cambios en la ingesta de sodio y en el VEC (234, 303), y su papel fisiológico exacto está por aclarar.

A.1.e.5. Hormona natriurética.

La regulación de la excreción renal de sodio está mediada en parte por la acción de un agente humoral, que se secreta y/o activa en situaciones de aumento del VEC. Diversos autores han demostrado la presencia en plasma y en orina de un factor natriurético de bajo Pm en situaciones como la uremia crónica, y en respuesta a sobrecargas salinas unidas a mineralocorticoides y no se ha encontrado en estados de retención de sodio, como en la cirrosis hepática con presencia de edema. Una revisión amplia acerca de qué es esta hormona, sus características, sus acciones y su papel biológico, se desarrolla en el apartado A.4. de la Introducción (82,84,194,210).

A.1.f. Mecanismos efectores en el control del VEC.

A.1.f.1. Filtración glomerular, balance glomerulo-tubular.

La excreción de sodio está determinada fundamentalmente por la tasa relativa de resorción tubular de sodio, con respecto a la cantidad de sodio filtrada (42, 303). Hay un buen número de trabajos en los que se demuestra que la alteración en la excreción de sodio, en respuesta a cambios en el VEC, tiene lugar independientemente de variaciones en la tasa de FG y/o en la secreción de hormonas de la corteza adrenal (87, 233, 282). Aunque otros investigadores explican los resultados anteriores en base a pequeñas alteraciones en la FG, no detectables técnicamente (42, 303). Esta última hipótesis se apoya en la observación de determinadas situaciones —constricción de la arteria renal, hemorragia, oclusión parcial del ureter, o de la vena renal— en las que la FG y la excreción de sodio descienden conjuntamente (42, 303). Asimismo, se han relacionado expansiones de salino

(orales o i.v.), con aumentos paralelos en la excreción de sodio y en la FG (42, 303). Sin embargo, a estos resultados se le oponen los trabajos de De Wardener (87, 233) y otros autores (204), que muestran respuestas natriuréticas a la expansión de VEC asociadas a descensos en la carga de sodio filtrada.

En conclusión, cambios en la tasa de FG pueden o no ser acompañados de cambios en la excreción de sodio, dependiendo de las condiciones en las que se produzca la alteración de la FG (303). Mientras que el VEC se mantenga constante, aumentos en la tasa de filtración glomerular pueden producir pocos o ningún aumento en la excreción de sodio. En este sentido, diferentes investigaciones han mostrado que cambios en la FG producen cambios paralelos en la resorción tubular de sodio (174). Este efecto ha sido estudiado ampliamente en el túbulo proximal (TP) de la nefrona, dichas alteraciones son proporcionales, de tal modo que, la resorción fraccional de sodio al finalizar el TP permanece relativamente constante. Este fenómeno se ha denominado "Balance glomerulotubular (43, 45). Este mecanismo es influenciado por varios factores: a) Los cambios en la concentración de sodio en el túbulo; b) La presencia en el filtrado de solutos poco resorbibles, como manitol, urea, sulfato, ...; c) Cambios hemodinámicos en la circulación sistémica, como consecuencia de una expansión de VEC, y d) Alteraciones en las fuerzas de Starling, principalmente, en la sangre glomerular y de las arteriolas post-glomerulares (42, 43, 45). Es decir, la FG puede alterarse por factores lumbales (a y b) y factores peritubulares (c y d). También se ha sugerido que los segmentos tubulares distales pueden responder de modo similar al TP, variar la tasa de resorción con respecto a variaciones en el volumen de fluido, proveniente del TP (42, 303). Por el contrario, la expansión de volumen extracelular da lugar invariablemente a grandes aumentos en la excreción de sal, y esta respuesta tiene lugar aunque la FG se mantenga constante o disminuya.

A.1.f.2. Factores físicos.

Se denomina así a los factores hemodinámicos intrarenales y a las características físico-químicas del plasma. Ambas son las principales variables en la regulación de la excreción renal de agua y de electrolitos.

La importancia de las variables hemodinámicas fue reconocida tempranamente (303), postulándose que la resorción tubular era totalmente pasiva, y guiada por un descenso en la presión hidrostática y un aumento en la presión oncótica de los capilares post-glomerulares. Esto no corresponde al mecanismo real (303). También se planteó la relación directa entre cambios en la presión de perfusión renal y en la excreción de sodio (322, 346). Pero hoy se sabe que la FG y el flujo sanguíneo renal (FSR), se mantienen constantes para un amplio margen de presiones de perfusión (87, 233). Además la diuresis salina puede tener lugar asociada a descensos en la presión de perfusión y del FSR (42, 127, 298, 303). Hay gran evidencia experimental indicando que alteraciones en las presiones hidrostática y oncótica (40, 41) de la microcirculación peritubular pueden modificar las tasas netas de resorción de agua y de sal en el túbulo proximal (42). Estas variables median la inhibición de la resorción proximal tras la expansión del VEC con salino isotónico (40, 41, 44). Además, se ha demostrado que este tipo de alteraciones también tienen lugar en los segmentos más distales de la nefrona, contribuyendo de forma importante a los cambios resultantes en la excreción urinaria de sodio (42).

La disociación del concepto que relacionaba cambios en la resorción de sodio en el túbulo proximal con cambios en la excreción urinaria de sodio, ha sido demostrada mediante una serie de experiencias. Por ejemplo, la natriuresis que se observa durante la administración crónica de sobrecargas salinas se puede correlacionar con inhibiciones en la resorción a nivel del túbulo distal, mientras no se observan alteraciones de la resorción de sodio en el túbulo proximal (42). Asimismo, una respuesta natriurética puede inducirse agudamente mediante una infusión i.v. de pequeñas cantidades de salino isotónico, sin que se observen alteraciones en la

15

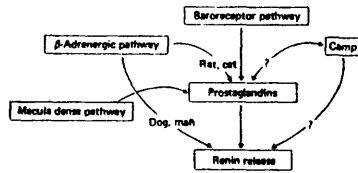


Fig. A.1.e.3.a.— Descripción esquemática de la relación entre el sistema de las prostaglandinas y la liberación de renina (ver apartado A.1.e.3.a.) (tomado de ref. 160).

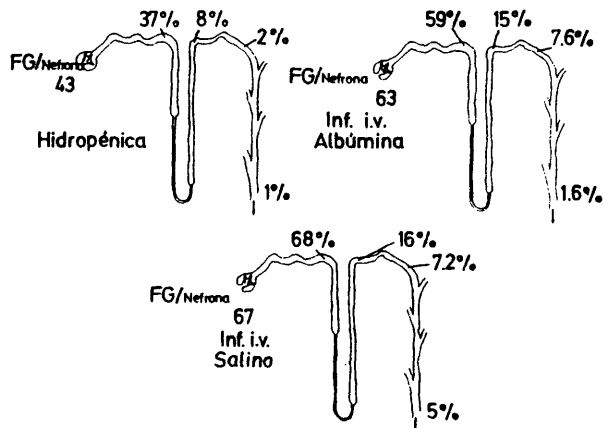


Fig. A.1.f.2.— Tasa de filtración glomerular por nefrona y porcentaje de sodio filtrado en varios puntos a lo largo de la nefrona, en la rata hidropénica, antes y después de la administración i.v. de albúmina o salino. (cf. A.1.f.2.) (Tomado de ref. 83, 323).

resorción proximal (42). Por otro lado, se conoce desde hace unos años que grandes infusiones de salino, de albúmina hiperoncótica, o de sangre completa, cada una independientemente, producen descensos similares en la resorción proximal de sodio, pero las respuestas natriuréticas son muy diferentes entre sí (323).

En la infusión (Fig. A.1.f.2.) de salino y en la de albúmina, la proporción de sodio filtrado en el glomérulo que llega hasta el túbulo colector es aproximadamente la misma (7%), pero la cantidad de sodio en la orina es mayor tras la expansión con salino. Los factores responsables de este manejo del sodio en el túbulo colector, no están totalmente aclarados, existiendo diferentes hipótesis. Unas sugieren que el transporte de sodio de las nefronas más profundas está más inhibido en situaciones de expansión del volumen extracelular que el de las nefronas más superficiales (323). Sin embargo, Sonnenberg (318) sugiere que en el caso de grandes infusiones intravenosas de salino, podría existir una secreción de sodio a lo largo de los tubos colectores medulares. Esta última posibilidad resulta poco probable como se ha demostrado recientemente (42). En resumen, hay evidencia concluyente que indica que alteraciones en los factores físicos intrarenales pueden modificar significativamente la tasa de resorción de agua y de sal en los túbulos renales (42). Se ha comprobado que la natriuresis, que tiene lugar tras la expansión del volumen extracelular, no se debe exclusivamente a los cambios que tienen lugar en la resorción de sodio en el túbulo proximal, sino que está originada principalmente por alteraciones en la resorción de sodio en segmentos más distales de la nefrona. Hay también evidencia reciente que sugiere que la heterogeneidad internefronal está involucrada en el control de la excreción renal de sodio (42, 303, 323).

A.1.g. Resumen.

De todo lo expuesto, se puede ver que son muy variados los mecanismos mediante los cuales el riñón puede responder frente a cambios en el volumen extracelular (tabla A.1.g.). Resulta muy difícil asignar un orden de prioridades entre dichos mecanismos, por dos razones principalmente: 1) Por el número tan elevado de los mismos; tanto aferentes como eferentes, lo que obliga a atribuir a cada uno de ellos una importancia relativa. 2) Porque su estudio se ha realizado en situaciones fisiológicas extremas, con lo que una extrapolación esquemática hacia una situación normal ha de ser cuidadosa.

Hay evidencia a favor de la existencia de un arco reflejo, mediante el cual los receptores de volumen, situados en la zona de baja presión de la circulación, a través de sus conexiones en el sistema nervioso central, pueden influir en la secreción de ADH y de las descargas simpáticas, las cuales a su vez modulan las respuestas del sistema renina-angiotensina-aldosterona. También se ha observado que modestos cambios en el volumen no están asociados con cambios en la presión de perfusión sistémica. Por otro lado, los receptores —barorreceptores— arteriales (aórticos, carótidos y renales), pueden jugar un papel en situaciones de grandes cambios en el volumen extracelular, siendo menor su papel en caso de pequeños cambios, p.e. debidos a la ingesta diaria. El concepto de un control reflejo en la homeostasis del VEC, puede ser también confuso por varias razones. Los efectos de una expansión de volumen pueden ser sentidos directamente por el riñón, mediante cambios en los factores físicos y en la hemodinámica renal, de tal modo que el balance de agua se reestablece, sin que se necesite un control reflejo basado exclusivamente en los receptores de volumen.

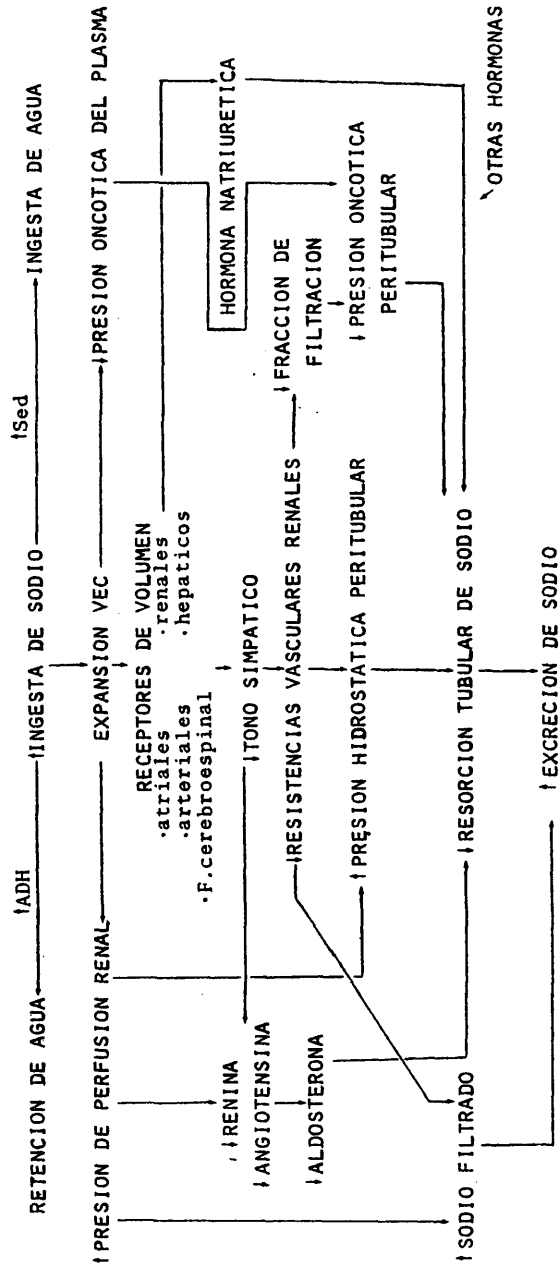


TABLA. A.1.g. ESQUEMA QUE SINTETIZA LA INTERVENCION DE LOS POSIBLES MECANISMOS AFERENTES Y EFERENTES QUE INTERVIENEN EN LA REGULACION DEL VEC EN RESPUESTA A CAMBIOS EN LA INGESTA DE SODIO.

A.2. Manejo del agua y de los electrolitos por los distintos segmentos de la nefrona.

A.2.a. Partes de la nefrona.

La unidad funcional del riñón es la nefrona, cuyo número es aproximadamente de un millón y cuarto por riñón, en los mamíferos. Un esquema de la nefrona se puede ver en la fig. A.2.a.1., y de un modo muy sintético podríamos diferenciar en ella dos partes funcionales muy distintas:

I) El corpúsculo renal o glomérulo-renal, comprende el ovillo de capilares glomerulares y la cápsula de Bowman.

II) El túbulo renal, que se puede subdividir en cuatro segmentos: Proximal; la rama delgada del asa de Henle (descendente y parte de la ascendente); parte distal (rama ascendente medular del asa de Henle, rama ascendente cortical del asa de Henle, túbulo contorneado distal) y colector (túbulo conector, tubo colector cortical, medular y de la papila). (Fig. A.2.a.2.) (331).

Hay dos poblaciones principales de nefronas en el riñón de los mamíferos, unas situadas en la parte exterior de la corteza (331), que son las llamadas nefronas corticales y otras localizadas cerca de la frontera córtico-medular, denominadas nefronas yuxtamedulares. Las nefronas corticales poseen asas de Henle cortas, incluso a veces no poseen el segmento delgado y frecuentemente no penetran en la médula. Las nefronas yuxtamedulares poseen asas de Henle largas y bien desarrolladas. Hay que comprender que estos son dos prototipos de dos modelos diferentes, pero hay una serie de diferentes gradaciones entre estos dos tipos de nefronas, dependiendo de su posición relativa en la corteza. Así, por ejemplo, en humanos hay siete veces más nefronas cortas que largas (331), en la rata el 28% de las nefronas tienen asas de Henle largas (294).

A.2.b. Túbulo proximal.

El túbulo proximal puede a su vez subdividirse en tres partes, según sus características anatómicas y funcionales: S_1 : primera parte del túbulo proximal (TP). S_2 : segmento contorneado del TP, y S_3 : la parte recta del TP, la cual se introduce en la médula renal (58).

Estos segmentos resorben la mayor parte del filtrado glomerular. El proceso básico en ellos es el transporte activo de sodio, sin embargo, el transporte de sodio está acoplado de manera compleja al transporte de una serie de solutos acompañantes, agua, aniones y solutos orgánicos (58, 59, 361).

A.2.b.1. Primera parte del túbulo contorneado proximal (S_1)

El líquido de perfusión de esta parte del túbulo proximal es el ultrafiltrado glomerular del plasma. La composición de este fluido tubular cambia rápidamente. La concentración de cloro aumenta. La concentración de otros solutos, como el bicarbonato, la glucosa, los aminoácidos y el lactato disminuye. Todo ello sucede sin cambios en la osmolaridad o en la concentración de sodio del fluido tubular que va quedando, el cual (sodio) permanece a igual concentración que el ultrafiltrado del plasma. La resorción del fluido es isoosmótica (128). La resorción de fluido en los segmentos del TP es directamente proporcional a la de sodio (58). Cuando se reemplaza al sodio por otros cationes, como el litio, tetrametilamonio o colina, la resorción disminuye (Fig. A.2.b.1.).

El transporte de sodio es el principal proceso activo en los túbulos proximales, y está totalmente acoplado al transporte de bicarbonato, de cloro, de glucosa, de aminoácidos y de lactato. El principal anión que se resorbe en S_1 del TP es el bicarbonato. La resorción de sodio depende de la de bicarbonato y viceversa (58, 128, 229). La resorción de sodio en el TP también depende del transporte asociado de otros solutos orgánicos. El mecanismo de interacción de la glucosa y los aminoácidos con el sodio está relacionado con el transporte de no electrolitos, más que con su metabolismo (289). Las interacciones del sodio con estos solutos se creen debidas a la media-

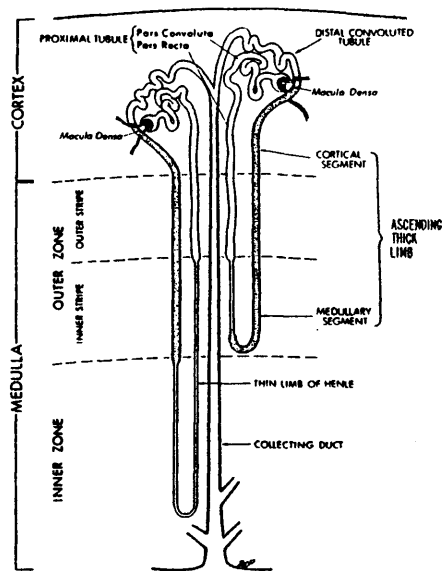


Fig. A.2.a.1.— Diagrama de la organización estructural de la nefrona, en el que se muestra la relación existente entre los distintos segmentos de la nefrona y las zonas del riñón, especialmente la médula (Tomado de ref. 331).

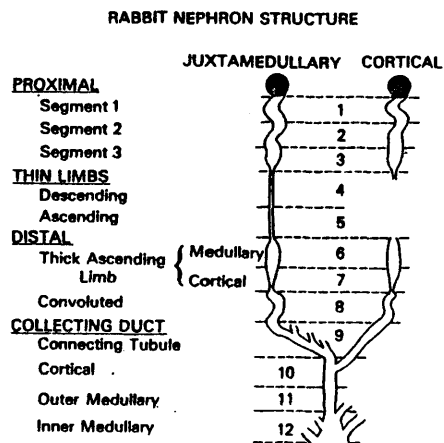


Fig. A.2.a.2.— En la nefrona de los mamíferos se pueden distinguir al menos 12 segmentos con características morfológicas y funcionales diferentes (Tomado de ref. 58).

ción de una gran variedad de transportadores. Cada tipo distinto de transportador, posiblemente, facilita el transporte de sodio acompañado por un soluto orgánico específico —o una clase de ellos—. Parece que el transportador es menos eficiente para el sodio que para el soluto específico. En experiencias con vesículas de membranas del “borde en cepillo” y sin fuentes metabólicas de energía, la fuerza de arrastre de solutos hacia el interior, desaparece cuando lo hace la diferencia de concentración de sodio, entre el interior y el exterior de la vesícula (58).

La interdependencia del transporte de sodio y de bicarbonato tiene lugar mediante un transportador, que intercambia sodio del fluido tubular por iones hidrógeno de la célula. El hidrógeno secretado dentro del tubo reacciona con el bicarbonato, dando lugar al transporte de éste al interior de la célula. Así, la diferencia de concentración de sodio da lugar al transporte de H^+ y viceversa, consecuentemente con la presencia de un transportador de intercambio entre el Na^+ y el H^+ (fig. A.2.b.1.1.).

Un resumen de los mecanismos de transporte que tienen lugar en S_1 se esquematizan en la fig. A.2.b.1.2. (58). El transporte de sodio tiene lugar en dos pasos, localizados en las membranas peritubular y de la luz tubular de la célula, respectivamente. En la membrana peritubular se sitúa el principal transporte activo de sodio que aporta la fuerza motriz, que es en último caso responsable del resto de los procesos de transporte.

El principal transporte activo de sodio hace disminuir la concentración de sodio en el interior de la célula; ésto da lugar a la diferencia de concentración de sodio entre la luz tubular y el interior de la célula propiamente. Esta diferencia de concentración impulsa el transporte pasivo de sodio hacia dentro de la célula desde el fluido tubular. El transporte de otros solutos está acoplado al del sodio en la membrana tubular. Este transporte activo de sodio da lugar, asimismo, a un voltaje negativo en el interior de la célula. El voltaje resultante al otro lado de la membrana de la luz tubular constituye una fuerza adicional que guía a aquellos procesos de transporte acoplados al sodio que son electrogénicos (transferencia neta de carga). El transporte activo secundario de glucosa y de aminoácidos está complado al transporte de sodio en la membrana de la luz tubular. A resultas de este transporte activo secundario, las concentraciones intracelulares de glucosa y de aminoácidos se mantienen elevadas. Ello produce una salida pasiva de los mismos, desde el interior de la célula al lado peritubular (58).

El epitelio del TP es altamente permeable (128), se cree que esta alta permeabilidad es debida a las uniones intercelulares. Estas vías de unión están formadas por las uniones estrechas de entre las células, el espacio lateral intercelular y la membrana basal, en la base del espacio lateral (fig. A.2.b.1.3.).

A.2.b.2. Segmento S_2 del túbulo proximal (última parte del túbulo contorneado proximal y primera parte recta del túbulo).

Hacia la mitad de la parte contorneada del TP la anatomía de las células del túbulo cambian gradualmente (fig. A.2.b.2.). Esto se asocia con cambios funcionales. El segmento S_2 del TP absorbe bicarbonato y glicina más lentamente que S_1 . Los cambios principales en la composición del fluido tubular, que han tenido lugar cuando alcanza el final del segmento S_1 del TP son que las concentraciones de Cl^- y de H^+ están aumentadas y que las concentraciones de bicarbonato, glucosa, aminoácidos, lactato y otros solutos, están disminuidas. Debido a estos cambios, el voltaje transepitelial “in vivo”, cambia de negativo, en la luz tubular al principio de S_1 , a positivo en la luz del segmento S_2 , al menos en las nefronas superficiales (58).

El voltaje negativo en S_1 depende de los procesos de transporte de sodio asociados a la glucosa y los aminoácidos a la luz tubular, y este voltaje va cambiando cuando las concentraciones de éstos solutos disminuyen por resorción (116). Las diferencias de concentración transepiteliales del cloruro y del bicarbonato producen una fuerza que lleva a la resorción de agua y de sales y que se presenta al tiempo que el fluido tubular deja el segmento S_1 y entra en S_2 (252).

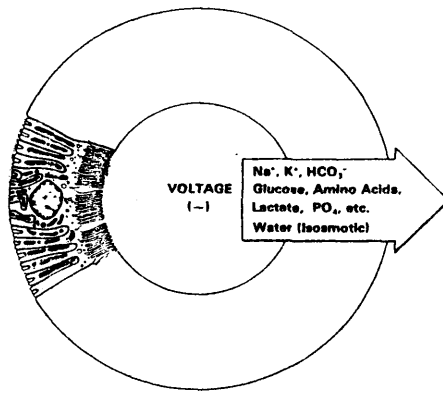


Fig. A.2.b.1.— Procesos de transporte principales en la primera parte del túbulo contorneado proximal (S₁), donde inicialmente la solución que hay en el túbulo es el plasma ultrafiltrado (Tomado de ref. 58).

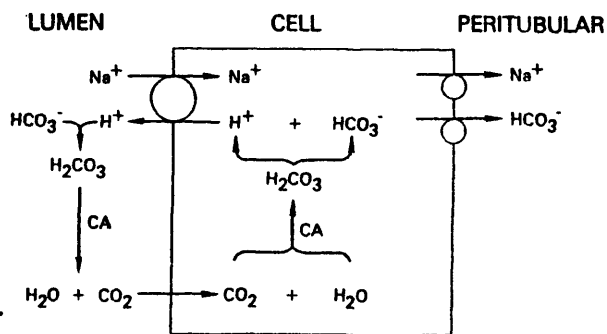


Fig. A.2.b.1.1.— La interdependencia del transporte de sodio y de bicarbonato tiene lugar, en la primera parte del túbulo contorneado proximal (S₁), mediante un "transportador", que intercambia sodio del fluido tubular por iones hidrógeno de la célula (Tomado de ref. 58).

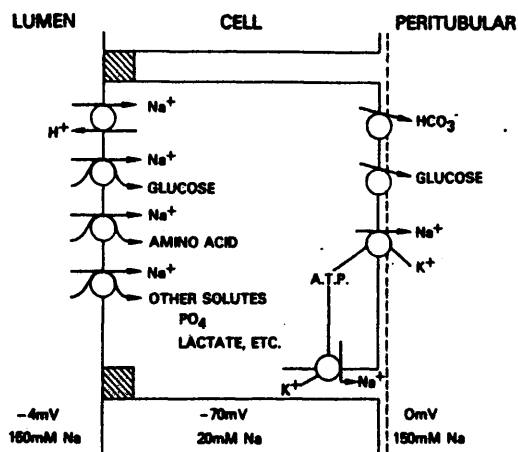


Fig. A.2.b.1.2.— Esquema de las interacciones del transporte de sodio y los de otros solutos, que tienen lugar en la primera parte del TP (S₁) (Tomado de ref. 58).

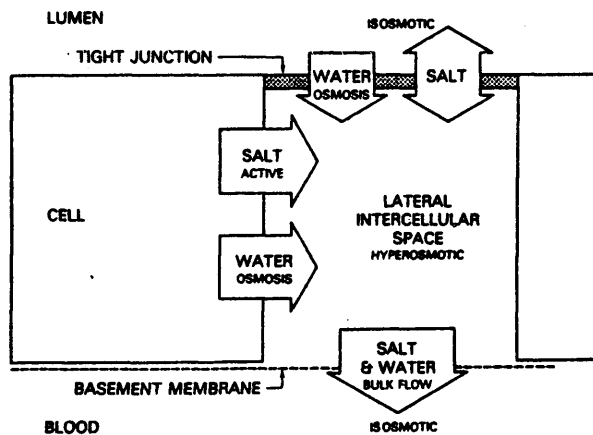


Fig. A.2.b.1.3.— Representación del modelo de transporte de fluidos, que se ha postulado que tiene lugar a través de los espacios intercelulares laterales en el túbulo contorneado proximal, y que están compuestos por la unión estrecha, el espacio intercelular lateral, y la membrana basal, en la base del espacio lateral (Tomado de ref. 58).

Esta diferencia produce la absorción de fluido por ósmosis —aunque la osmolaridad total del fluido tubular y de la sangre es igual—. Sin embargo, la presión osmótica efectiva es mayor en la sangre, lo que induce un movimiento de agua y de solutos, y siendo más permeable el cloruro sódico que el bicarbonato sódico, se produce una resorción neta del primero. Como resultado, el voltaje en la luz tubular de S_2 se vuelve positivo (58, 144).

En resumen, hay al menos tres procesos en el segmento S_2 de los túbulos proximales, que contribuyen a la resorción de fluidos y de sal (58).

- 1) Resorción pasiva por medio de gradientes de aniones.
- 2) Transporte de sodio acoplado al de aminoácidos, glucosa o cualquier otro soluto orgánico, que esté presente en el líquido de perfusión (como el segmento S_1 del TP).
- 3) Transporte activo "independiente" de sodio.

A.2.b.3. Segmento S_3 del túbulo proximal.

Comprende todo el túbulo proximal recto de las nefronas yuxtamedulares y la parte terminal de los túbulos rectos de las nefronas superficiales (366). Su anatomía celular es más sencilla que la de S_2 (Fig. A.2.b.3.). La función característica que se le conoce es la secreción de ácido p-aminohipúrico, aunque a una tasa mucho más lenta que S_2 (366). Pueden existir diferencias en la resorción de fluido, pero no se conocen bien.

A.2.c. Rama delgada del asa de Henle.

La resorción de agua y de sal en el Asa de Henle juega un papel importante dentro de los mecanismos de concentración de la orina. En estudios *in vitro*, no se ha encontrado evidencia de un transporte activo de sal, ni en la rama descendente, ni en la ascendente del Asa de Henle (166, 186). En base a esto, se ha propuesto que el transporte de agua y de sal en el segmento delgado no es un proceso activo, sino totalmente pasivo; o bien, que si existe algún tipo de proceso activo no es el principal (186).

La permeabilidad al agua es elevada en la rama delgada descendente del Asa de Henle y muy baja en la ascendente. La permeabilidad para el sodio y para la urea es menor que la permeabilidad para el agua. Hay dos aspectos de la permeabilidad para el sodio y para la urea que son importantes con vistas al transporte pasivo de agua y de sal. Primero, la permeabilidad para el sodio y para la urea es mayor en la rama delgada ascendente que en la rama descendente. Segundo, en la rama ascendente, la permeabilidad para el sodio supera a la de la urea. La permeabilidad para el cloro a lo largo de la rama ascendente es también muy elevada y cuatro veces más que para el sodio (58, 166, 186).

El proceso principal de transporte en la rama delgada descendente del Asa de Henle en conejos (fig. A.2.c.1.) es la resorción de agua. El fluido intersticial que rodea a la rama descendente es hiperosmolar y como la permeabilidad al agua es muy elevada, el agua es resorbida por ósmosis. Por otro lado, debido a que la permeabilidad a la urea y al sodio es baja, no se resorben. Por lo tanto, el fluido tubular se concentra, produciendo un aumento en su osmolaridad.

El fluido tubular en el codo del Asa de Henle, es hiperosmótico con respecto al plasma sistémico, y su concentración es similar a la del intersticio que le rodea. Aunque hay una diferencia importante entre la composición del fluido tubular y la del líquido intersticial. El fluido tubular es un concentrado del ultrafiltrado glomerular y por tanto, relativamente rico en cloruro sódico y no en urea. El fluido intersticial es relativamente rico en urea, obtenida de la resorción de la misma desde los tubos colectores hacia la médula (58).

La permeabilidad de la parte delgada del asa ascendente de Henle es elevada para la sal (Cl y Na) y algo menor para la urea. El proceso principal de transporte en este segmento de la nefrona, es la resorción pasiva de sodio y la secreción de urea (fig. A.2.c.2.). El resultado es un transporte neto de solutos hacia el exterior del fluido tubular. Y debido a que este segmento tubular es prácticamente impermeable al agua, se produce seguidamente la dilución del fluido tubular. Hay diversos

PROXIMAL TUBULE
"LATE" CONVOLUTED/"EARLY" STRAIGHT
(S₂)

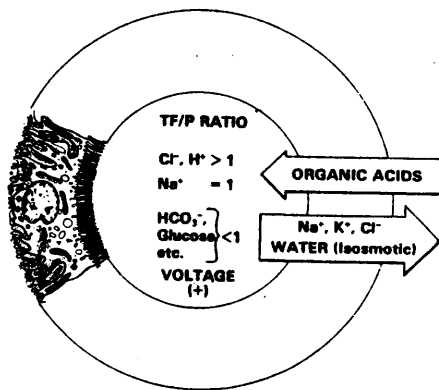


Fig. A.2.b.2.— Principales procesos de transporte en el segmento S₂ del túbulo proximal. La composición del fluido tubular que le llega a este segmento, está modificada por los procesos de transporte que han tenido lugar en el segmento S₁ del TP, lo cual es responsable, en parte, de las funciones que tienen lugar en S₂ (TP/P es la relación entre las concentraciones de los distintos solutos, en el fluido tubular y en el plasma) (Tomado de ref. 58).

PROXIMAL STRAIGHT TUBULE
(S₃)

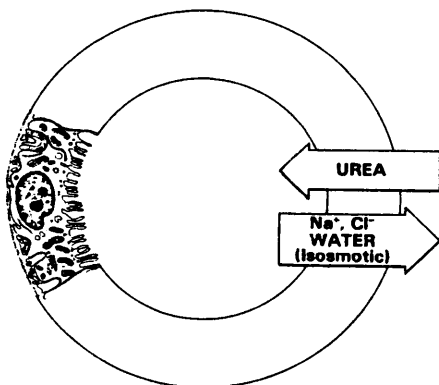


Fig. A.2.b.3.— Principales procesos de transporte en el segmento S₃ del túbulo proximal. Aún no está claro si hay o no diferencias entre los procesos que tienen lugar en S₂ y en S₃. (Tomado de ref. 58).

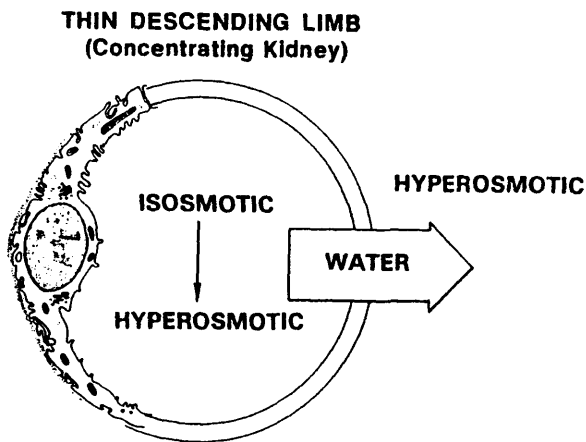


Fig. A.2.c.1.— El principal proceso de transporte que tiene lugar en la rama delgada descendente del A. de H. en conejos, es la resorción de agua. El fluido intersticial que rodea a este segmento es hiperosmótico, y puesto que la permeabilidad para el agua es elevada, ésta se resorbe por ósmosis, sin embargo, es baja para los electrolitos y la urea, luego el fluido tubular aumenta su osmolaridad (Tomado de ref. 58).

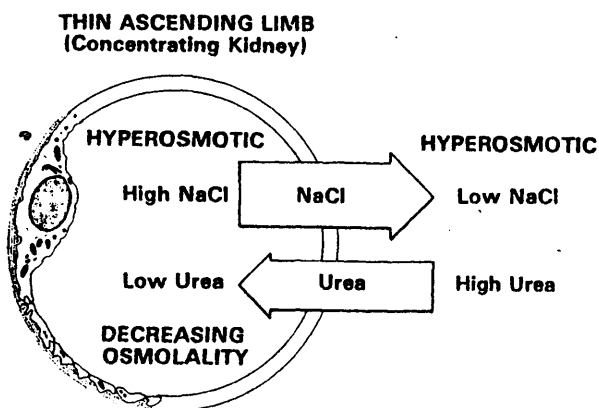


Fig. A.2.c.2.— El principal proceso de transporte en la rama delgada ascendente del A. de H. en conejos es la resorción pasiva de ClNa y la secreción de urea. (Tomado de ref. 58).

autores (225) que sugieren la existencia de un transporte activo de sodio en este segmento en unión con el transporte pasivo, pero esta cuestión está aún siendo sometida a debate y a la espera de pruebas concluyentes (13, 58).

A.2.d. Segmentos distales.

A.2.d.1. Rama ascendente gruesa del Asa de Henle.

El epitelio de este segmento en su parte situada en la médula, difiere del de la parte del mismo segmento situado más en la corteza, desde el punto de vista microscópico. Las células del segmento medular son más gruesas que las del segmento cortical (fig. A.2.d.1.).

La función de la rama ascendente gruesa del Asa de Henle (A de H.), se ha estudiado por micropunción y micropersusión de túbulo aislado. Así se encontró que el fluido tubular está diluido y contiene concentraciones relativamente bajas de sodio (58). Esta dilución se atribuye a la resorción de sal en exceso de agua, en el interior (fig. A.2.d.1.). En la rama ascendente gruesa de la zona medular se puede resorber el ClNa más rápidamente que el segmento de la zona cortical. Pero éste último puede mantener una diferencia de concentración transepitelial de ClNa mucho mayor (58).

La resorción de cloro tiene lugar contra un gradiente electroquímico. Debido a ello, el transporte de este anión es activo y el voltaje es positivo en la luz tubular. El transporte de sodio es pasivo, a favor del voltaje positivo del lumen. La permeabilidad de la rama ascendente gruesa del A. de H., al sodio y al cloro, es relativamente elevada. El alto voltaje positivo de la luz tubular no es sólo una fuerza que conduce a la resorción pasiva de sodio, sino también a la de otros cationes, como el calcio y el potasio. (58).

Hay una cuestión importante sin resolver que es si el transporte activo de cloro es el principal transporte activo, o es un transporte activo secundario. Es decir, mediante una bomba de cloruros, ligada directamente al metabolismo, o bien acoplada al transporte de otros solutos. Sin embargo, no hay aún evidencia esclarecedora de este mecanismo (58).

A.2.d.2. Túbulo distal.

La parte de la nefrona situada entre la mácula densa y los tubos colectores se denomina túbulo distal (fig. A.2.d.2.). En el túbulo distal hay una continua resorción de cloruro sódico, cuya concentración disminuye, siendo menor que la del fluido recién salido de la rama ascendente gruesa del Asa de Henle (181, 362). En este segmento el voltaje transepitelial es negativo en la luz tubular, ya que el sodio se resorbe contra una diferencia electroquímica de concentración, su transporte, es por definición, activo. Este transporte se cree que se lleva a cabo por medio de la acción de la sodio-potasio ATP asa, la cual se localiza en las membranas peritubulares de las células. La resorción de cloro es fundamentalmente pasiva y está impulsada por el voltaje negativo (367).

Cuando los niveles plasmáticos de la hormona antidiurética (ADH) son bajos, el conjunto del túbulo distal es poco permeable al agua, y el fluido tubular permanece diluido a lo largo de este segmento. Si la hormona antidiurética está presente, la permeabilidad del agua aumenta hacia el final del túbulo distal, dando como resultado una resorción de agua por ósmosis, y un aumento de la osmolaridad del fluido tubular (362, 365).

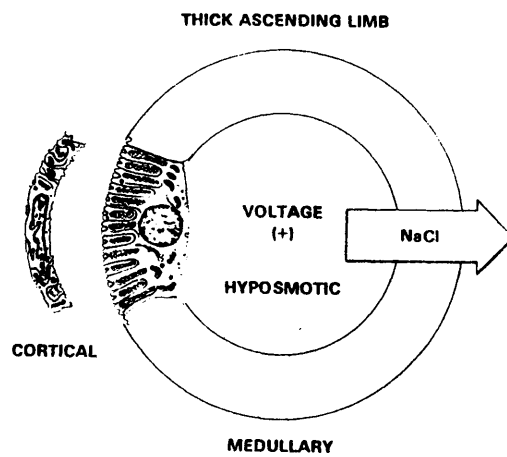


Fig. A.2.d.1.— El proceso principal en la rama ascendente gruesa del A. de H. es la resorción activa de cloro y la resorción pasiva de sodio, que tiene lugar por el voltaje positivo causado por el transporte de Cl^- . Este segmento es impermeable al agua, que unido a lo anterior hace que el fluido tubular se diluya. (Tomado de ref. 58).

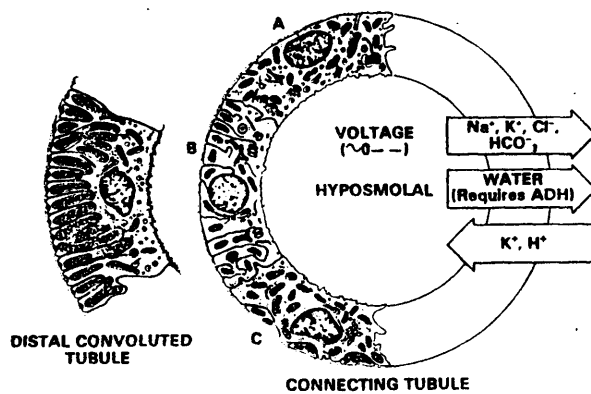


Fig. A.2.d.2.— En los segmentos de la nefrona que componen el túbulo distal (ver cf. A.2.d.2.) el proceso principal de transporte es la resorción activa de sodio que origina un voltaje negativo en la luz tubular. La resorción de cloro es pasiva, y llevada por el voltaje. La ADH aumenta la permeabilidad al agua. (Tomado de ref. 58).

A.2.e. *Tubos colectores.*

A.2.e.1. *Túbulo conector.*

Morfológicamente, es una parte de los tubos colectores, pero se distingue de estos por una serie de células características que posee (fig. A.2.d.2.), las cuales son diferentes de las células predominantes en los tubos colectores (58, 294). También posee diferencias bioquímicas con respecto a los tubos colectores.

A.2.e.2. *Tubos colectores corticales.*

Los tubos colectores comienzan a partir de los túbulos conectores situados en las proximidades de la superficie renal (fig. A.2.a.1.). La permeabilidad para el agua de este segmento es baja, pero está aumentada en presencia de ADH (143). Hay una resorción neta de sodio y de cloro, que en ausencia de ADH da lugar a una mayor dilución de la orina (143). Sin embargo, en presencia de ADH el tubo colector cortical es permeable al agua, de tal modo que se produce una resorción neta de agua por ósmosis, y tiene lugar la concentración del fluido tubular. Así, el fluido tubular que sale de este segmento puede ser iso o hiposmótico con respecto a la sangre, dependiendo de que esté presente la ADH o no (fig. A.2.e.2.). En el tubo colector cortical, así como en la parte final del túbulo contorneado distal, el voltaje en la luz tubular es negativo (324). El sodio se resorbe mediante un proceso activo y el cloro es transportado probablemente de forma pasiva a favor de un gradiente eléctrico (324). El sistema de transporte activo para el sodio en el tubo colector cortical opera a una tasa relativamente lenta, pero aún así es capaz de producir grandes diferencias de concentración de sodio a un lado y a otro del epitelio. Hay que señalar que la tasa absoluta de la resorción de sodio *in vitro*, en este segmento tubular, es sólo aproximadamente de un 25% de la que tiene lugar en el túbulo proximal (301).

A.2.e.3. *Tubos colectores medulares.*

Es a menudo totalmente arbitraria la clasificación de los tubos colectores en corticales, tubos colectores de la médula más externa y tubos colectores de la médula más interna o papila, ya que los cambios en la morfología celular en estos tres segmentos son graduales (fig. A.2.e.2. y fig. A.2.e.3). Por otro lado, la tasa de resorción de sodio es aparentemente la misma, para los tubos colectores de la médula exterior que para los tubos colectores corticales (110).

Los tubos colectores, situados en la parte más interna de la médula (papila), forman unas uniones centrales, donde se van imbricando los tubos colectores que están en una parte más externa de la médula, cuyos extremos se vacían en la pelvis renal (fig. A.2.a.1.). Al igual que en los tubos colectores corticales, hay una resorción activa de sodio en el tubo colector de la médula más interior (336), lo que produce un voltaje negativo en la luz tubular. Al menos en parte, la resorción de cloro es pasiva a favor del voltaje de la luz tubular. No ha sido valorada la posibilidad de un transporte activo para el cloro (90). A pesar de la lentitud de la tasa de transporte que tiene lugar en este segmento tubular, la resorción en él es la que produce el descenso mayor en la concentración de sales en la orina, concretamente de sodio (90). La concentración de cloro disminuye en el mismo orden que la de sodio. Ahora, la resistencia eléctrica transepitelial es elevada (281) y la permeabilidad al cloruro sódico se cree que es baja, pero hay una gran eficiencia para el transporte de sales contra grandes diferencias de concentraciones. En ausencia de ADH, la permeabilidad de los tubos colectores de la zona más profunda de la médula es baja (240) y durante la diuresis acuosa, la resorción de agua está restringida, en estas últimas condiciones, el fluido tubular se diluye aún más, debido a una resorción adicional de sales (317). La ADH aumenta la permeabilidad al agua (240) y se produce la concentración de la orina (170).

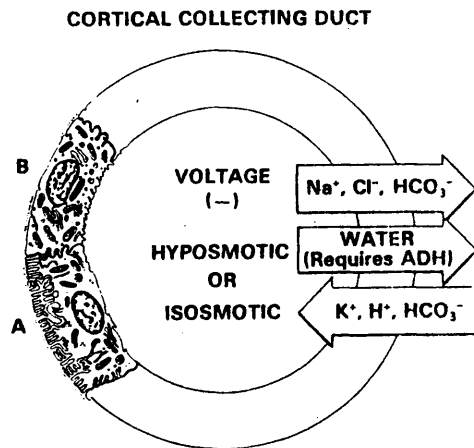


Fig. A.2.e.2.— Morfología celular y principales procesos de transporte que tienen lugar en los tubos colectores corticales de conejo. Hay un transporte activo de sodio que origina un voltaje negativo en la luz tubular. El cloro se transporta pasivamente a favor del voltaje. Tanto el transporte de sodio como el voltaje dependen de la acción de los mineralocorticoides. (Tomado de ref. 58).

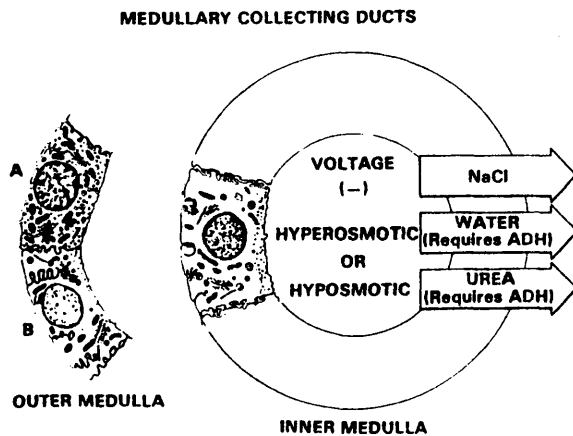


Fig. A.2.e.3.— Morfología y función de los tubos colectores medulares del conejo. La primera varía con respecto a la de los tubos colectores corticales. En la médula más interna tiene lugar la resorción de ClNa . El agua y la urea también se resorben en presencia de ADH. El fluido tubular varía desde hiper hasta hiposmótico dependiendo del estado diurético. (Tomado de ref. 58).

A.3. Papel del hígado en la homeostasis del volumen extracelular.

A.3.a. Sistema gastrointestinal, posición del hígado dentro de este sistema.

Aunque su papel sea primordial, el riñón no es el único órgano que interviene en la homeostasis del líquido extracelular, sino que también otros sistemas como el cardiocirculatorio, gastrointestinal, nervioso y endocrino juegan papeles muy importantes (188).

El sistema gastrointestinal (SGI) aparte de ser la ruta más importante de entrada de líquidos al organismo, es así mismo una vía normal de pérdidas de líquidos y solutos, mediante las heces y los distintos procesos de absorción a lo largo del intestino. En condiciones patológicas, por ejemplo: fistulas gástricas, diarreas, vómitos, o cualquier otra situación, una pérdida excesiva de líquidos por este sistema GI puede poner en un serio riesgo al balance general de agua y de electrolitos del organismo, pudiendo producirse una reducción en el volumen extracelular (deshidratación y, en cambios agudos, una alteración en el balance de ácido-básico (9, 46, 123, 158, 188).

A.3.a.1. Situación anatómica del hígado dentro del SGI.

Dentro del SGI, el hígado posee una situación circulatoria estratégica, el flujo sanguíneo en la vena porta más el de la arteria hepática son un 29% del gasto cardíaco total, y además todo el flujo esplácnico es conducido por medio de la vena porta hacia el interior del hígado antes de regresar al corazón (1, 150, 188, 291, 303). Si tenemos presentes las grandes variaciones diarias de la ingesta, sin contar con otras situaciones anormales, la sangre que drena el sistema gastrointestinal presentará, al menos transitoriamente, alteraciones importantes, en la osmolaridad y en la composición de electrolitos. Esto permite decir a priori que el hígado ocupa una posición ideal para sentir y analizar los posibles cambios en el SGI, antes de que estas informaciones lleguen a los receptores centrales, actuando como un receptor avanzado, en la frontera entre los espacios enteral y parenteral del organismo, y contribuyendo así a la regulación del VEC (1, 150, 291) (fig. A.1.d.2.c.).

A.3.a.2. Funciones sensoras del hígado.

Hay evidencia abundante del papel que juega el hígado en la función de homeostasis. Este órgano lleva a cabo el mantenimiento de la constancia del conjunto de constituyentes metabólicos circulantes, asimismo regula la composición de la sangre mediante sus numerosas funciones de depuración, desintoxicación e inactivación de hormonas, y realiza funciones de almacenamiento de sustancias (291). Más recientemente se han ido investigando nuevas funciones de este órgano que son probablemente complementarias a las ya conocidas. Estas últimas se correlacionan con la existencia en el interior del hígado de diversos receptores neurales. Estos receptores parece ser que activan un buen número de respuestas fisiológicas y de comportamiento, encaminadas a corregir imbalances en la homeostasis, muchas de las cuales se asocian a cambios en la ingesta. Existen en la literatura científica varias revisiones que resumen los conocimientos de esta función enteroreceptora hepática (199, 262, 291). A pesar de toda la evidencia de las diferentes funciones sensoras hepáticas, estas siguen apareciendo para un número de investigadores como poco convincentes. Por otro lado es difícil extraer conclusiones firmes acerca de la existencia y de la función de los receptores hepáticos mediante una simple aproximación al problema. La innervación del hígado ha mostrado ser especialmente resistente al estudio mediante las técnicas histológicas normales, así como a la caracterización de los enteroreceptores, mediante las técnicas electrofisiológicas habituales (291).

La mayor parte de las investigaciones sobre la función sensora del hígado se han llevado a cabo mediante estudios sobre las respuestas renales, nerviosas, etc., frente a la infusión, por distintas vías, de soluciones de contenido diverso, así mismo mediante estudios de comporta-

miento. Parte de estos estudios a menudo tampoco han aportado resultados concluyentes (291). A pesar de esto las aproximaciones funcionales van conformando una evidencia que apoya la existencia de una sensibilidad específica en las terminaciones nerviosas hepáticas. Teniendo en cuenta este tipo de análisis, el problema es conocer cual es el estímulo crítico que activa los receptores hepáticos, y como estos estímulos se traducen en señales nerviosas y/o humorales, que a su vez influirán en las distintas respuestas eectoras nerviosas, renales, metabólicas, etc. El término receptor, en base a lo expuesto anteriormente, se utiliza en todos estos estudios en el sentido menos restrictivo, sin implicar por ello un sustrato morfológico específico responsable de ninguna de las respuestas mencionadas (291).

A.3.b. La enfermedad hepática y el manejo renal del agua y del sodio.

Es conocido desde hace bastante años que la enfermedad hepática se acompaña frecuentemente de una gran variedad de alteraciones en la función renal, entre ellas el manejo del agua y de los electrolitos (99, 100). Estos hechos vienen a resaltar la imbricación del hígado dentro de los mecanismos de control del VEC. Algunas de estas complicaciones tienen poco significado clínico, mientras que otras tienen una gran importancia (22). El curso clínico de los pacientes que presentan una cirrosis hepática descompensada, está frecuentemente complicado por un empeoramiento progresivo de la excreción de sodio, el cual se retiene ávidamente (22, 140, 356), y de la capacidad de excreción de agua, que tiene como expresión clínica la hiponatremia (239, 358). Estos dos hechos conducen a la formación de ascitis y de edemas periféricos (99, 205, 206). Se han llevado a cabo numerosas investigaciones para caracterizar las anomalías en el manejo renal del agua y de la sal, algunas de ellas mediante el estudio de la respuesta renal frente a administraciones agudas de sobrecargas acuosas y de cloruro sódico (206, 242). Estos estudios mostraron que muchos pacientes cirróticos son incapaces de excretar una sobrecarga de sal tal y como lo hace una persona sana (206, 242), aunque había un cierto número que sí podía excretarla. Los cirróticos que presentaban ascitis y edemas y daban una respuesta anormal a la sobrecarga acuosa, estando incapacitados para eliminar orina muy diluida, mientras que, los que no presentaban ascitis ni edemas sí se desprendieron de la sobrecarga de agua (99). En otra serie de trabajos se ha demostrado que en la cirrosis descompensada hay ausencia o total inversión del ritmo diario de excreción de sodio. (172).

Es frecuente plantear, que las anomalías en el manejo renal del sodio están limitadas principalmente a pacientes con cirrosis descompensada (por ejemplo, presencia demostrable clínicamente de ascitis y/o edema). Pero hay pocos datos firmes que apoyen esta consideración. Según ha valorado recientemente M. Epstein (104), una revisión cuidadosa de los estudios que intentan correlacionar el manejo renal del sodio con el grado de descompensación de la cirrosis, no apoya el concepto de que haya realmente una relación entre ambos. Se puede concluir que no es posible predecir la presencia o la magnitud del empeoramiento del manejo del sodio por el riñón en el paciente cirrótico, basándose simplemente en la presencia o ausencia de ascitis y/o edema. (104, 206). A pesar del buen número de estudios que hay en la actualidad sobre este tema, las bases de las alteraciones en el manejo renal del sodio en la cirrosis no están del todo aclaradas. Actualmente, hay dos teorías que tratan de relacionar estas alteraciones con la formación de ascitis. Una de ellas es la denominada "clásica", que plantea que la hipertensión portal, la formación de ascitis y la reducción de la volemia efectiva dan lugar a la retención de sodio en el riñón (313). La otra teoría, propuesta por Lieberman y Reynolds (215), se denomina del "overflow"; plantea que la previa expansión del VEC, originada por una retención de sodio primaria y a partir de un lecho vascular esplácnico aumentado, son los mecanismos que llevan al desarrollo de la ascitis.

Con respecto a la patogenia del empeoramiento del manejo renal de agua en el cirrótico, se cree que hay tres mecanismos implicados. Un aumento de la actividad de la ADH, un descenso del fluido tubular que llega a los segmentos distales de la nefrona (206), y un aumento de la difu-

sión de agua en segmentos distales de la nefrona, no mediada por la ADH (206, 342).

Todo lo anteriormente expuesto refuerza la hipótesis central de que el hígado juega un papel clave en el control del volumen extracelular modificando la función renal.

A.3.c. *Papel del hígado en la osmorregulación.*

Desde los primeros trabajos de Verney (346) y basándose en ellos, la regulación de la osmolaridad de los fluidos corporales es explicada habitualmente, como una operación que comprende un mecanismo de retroalimentación, en el que están implicados el eje hipotálamo-hipofisario y los riñones. En el cerebro, los osmorreceptores tienen bajo su control la secreción de la hormona antidiurética (ADH), para actuar frente a aumentos en la osmolaridad de la sangre arterial (11, 120, 327). También se ha propuesto la participación de otros osmorreceptores, que no tienen bajo su control directo la secreción de ADH, y que pueden estar localizados en el cerebro (10, 34, 267). Por otro lado han sido encontrados osmorreceptores periféricos en el hígado (1, 150, 291) y en el páncreas (167) que sí pueden influenciar la secreción de ADH. Gauer y col. (120) han sugerido que los osmorreceptores hepáticos constituyen un mecanismo primario por el cual la osmolaridad del plasma es regulada puntualmente. La presencia de osmorreceptores en la vena porta o en el hígado, que pueden activarse antes que los osmorreceptores centrales, ha sido puesta de manifiesto, en primer lugar, mediante los trabajos de Haberich (150), en sus primeros estudios, llevados a cabo en ratas despiertas, mostró que la infusión de agua en la vena porta producía un rápido aumento del volumen de orina, a pesar de que la osmolaridad de la sangre portal variaba menos de un 1%, mientras que la misma infusión en la vena cava no causaba aumentos significativos en la diuresis (150).

Con la intención de que los cambios osmolares se centraran sólo en el hígado, empleó la técnica de la "doble-infusión" que posteriormente ha sido utilizada numerosas veces en este tipo de estudio. Para ello infundió a la vez agua en la vena porta y una solución de ClNa 300 mM en la vena cava, considerando que la solución global introducida en el conjunto de la circulación era isotónica. El resultado fue que la respuesta diurética se produjo igualmente (151, 152). Si añadía salino a la infusión portal, la respuesta diurética disminuía (81) y si la "doble infusión" se invertía, se observaba una pequeña antidiuresis (81, 150). No observaba diferencias entre las dos vías, cuando la infusión administrada era una solución salina isotónica (150). En otros experimentos, utilizando soluciones sin electrolitos de glucosa y de manitol obtuvo unos resultados muy similares, lo que le llevó a apoyar aún más la hipótesis de que el estímulo osmótico era el desencadenante de las respuestas renales que obtuvo después de la infusión portal y no los cambios en las concentraciones de electrolitos (19). Haberich postuló que el hígado actuaba como un sensor de las variaciones observadas en el SGI y debidas fundamentalmente a la ingesta, también observó que debido a estas variaciones se producían cambios en la diuresis adelantándose a cambios en la osmolaridad de la sangre arterial (150). En la fig. A.3.c., se representa un diagrama explicativo del posible papel sensor del hígado, según Haberich (150, 196). La ingesta de agua puede causar un movimiento de electrolitos -Na-Cl, CO_2 , H - desde la sangre portal al intestino. Con ello, la osmolaridad de la sangre portal disminuye rápidamente y como reacción a este estímulo osmótico, el hígado aumenta su contenido de agua (150). De este modo, actúa como un "buffer", previniendo y/o retrasando posibles descensos en la osmolaridad de la sangre sistémica. No detectó cambios en la osmolaridad de la sangre arterial hasta unos 20 min. después de la infusión. Como explicación, estos resultados no se podían atribuir a cambios en el flujo sanguíneo portal, ya que las tasas de infusión eran muy bajas (50-100 $\mu\text{l./min.}$).

No tuvieron éxito las experiencias de circulación cruzada en ratas, llevadas a cabo con el objeto de detectar la presencia de un factor humoral, con capacidad de inducir diuresis y que estuviese en relación con las respuestas renales que se observaban al infundir soluciones hipotónicas en la vena porta (150). Sin embargo, encontraron que (81) las respuestas diurética y antidiurética, según los casos, en las experiencias de "doble infusión", se inhibían cuando seccionaban una pequeña rama del nervio vago, que iba del estómago al hígado (150). Estos autores postularon que la información de

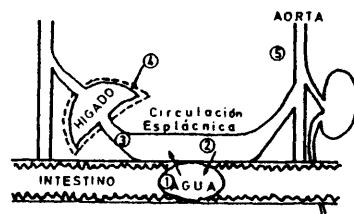


Fig. A.3.c. (1) Agua en el intestino.
 (2) Intercambio de electrolitos desde la sangre portal: Na^+ , Cl^- , CO_3H^- .
 (3) Descenso de la osmolalidad de la sangre de la vena porta.
 (4) Aumento del contenido del agua del hígado: a) Estímulo osmótico. b) Función osmoreceptora.
 (5) Efectos: a) Previene o retrasa los cambios en la osmolalidad de la sangre sistémica.
 b) Estimula la diuresis.

(Tomado de ref. 150).

los cambios en la osmolaridad portal, se pueden transmitir vía los nervios aferentes vagales a los núcleos hipotalámicos, que avisarían a los osmorreceptores centrales con objeto de impedir cambios dilucionales, produciendo eventualmente una respuesta adecuada de la ADH y de la función renal (81, 150).

Trabajos de electrofisiología han venido a apoyar los resultados de Haberich y de sus colaboradores. Nijima (253), en experiencias en hígado aislado de cobaya, demostró una correlación directa entre los cambios en la osmolaridad del líquido de perfusión y las descargas aferentes de las distintas unidades de filamentos del nervio vago hepático. Estas experiencias las realizó variando la concentración de ClNa en el medio y comparando las respuestas con soluciones hiperosmolares de mono y disacáridos. Sin embargo, en este primer trabajo no aclara si las fibras nerviosas son sensibles cualitativamente o cuantitativamente a los estímulos. En otros estudios se han implicado a los nervios simpáticos como posibles mediadores de la antidiuresis encontrada por Haberich (150), tras la infusión de salino hipertónico en la porta, ya que la sección de una rama de los mismos atenúa estas respuestas (4, 295). En hígado aislado y perfundido de conejo se han descrito por Andrews y Orbach (16), diferentes poblaciones de terminaciones del nervio vago hepático, sensibles a cambios en la presión osmótica, oncótica y a cambios en la concentración de electrolitos (15, 16). Los resultados de estos estudios les llevaron a sugerir que los nervios que responden durante la perfusión de moléculas de elevado Pm, son diferentes de aquellos que tienen una función osmorreceptora. Añaden que, estos últimos son sensibles a los desequilibrios de la concentración de sodio respecto a la de otros cationes (15 y 16). Dentro de los trabajos de electrofisiología acerca de los receptores del área portohepática, se encuentran los realizados por los investigadores soviéticos Velikanova (344), Finkinstein (111), Aizman (4). Entre los últimos trabajos están los de Tyryshkina (333-335); muestran la existencia de fibras en las terminaciones aferentes del vago hepático del gato, sensibles a la estimulación de este área con gradientes osmóticos y sugieren que los osmorreceptores hepáticos están localizados en el intersticio y no en el interior de los vasos sanguíneos, de tal modo que una alteración del mismo se transformaría en una señal nerviosa, postulando un mecanismo de acción similar al de los mecanorreceptores.

En un trabajo mixto, electrofisiológico y de estudio de comportamiento, Adachi y col. (2) en hígado perfundido de rata describen que hay dos tipos de fibras aferentes en el nervio vago hepático, unas que responden al aumentar la presión osmótica con aumentos de los picos de descargas y las otras que hacen lo mismo al disminuir dicha presión. Cuando a unas ratas a las que han realizado una vagotomía, les someten a deshidratación observaron que disminuye su capacidad para concentrar la orina y responden con retraso frente a una sobrecarga intragástrica de agua (2). Los resultados de Adachi apoyan lo sugerido por Haberich, y añaden que el hígado puede jugar un papel en los mecanismos de concentración de orina y en la retención renal de agua (150). Dentro de este último punto, Perlmutt y col. (269) estudiaron la capacidad de concentración y dilución renal en situaciones de hepatectomía en ratas despiertas. Estas experiencias demuestran que al poco tiempo de una hepatectomía parcial, la capacidad de concentración renal es defectuosa, pero la de excreción de agua, frente a una sobrecarga acuosa i.v., no está del todo empeorada.

En las experiencias llevadas a cabo en perros, no hay tanta unanimidad respecto al papel del hígado en la osmorregulación. Lydtin (222) ha descrito que la administración de una solución de ClNa hipotónica (0,45%), en la vena porta o por vía oral, produce un aumento en el flujo urinario y en la excreción de sodio, mayor que si se infunde en una vena periférica. Debido a que no se realizaron experiencias con soluciones sin electrolitos, sobre todo sin sodio, es imposible determinar si estas respuestas son o no específicamente osmorreguladoras. Sin embargo, Glasby y Rasmsay (133) no observaron diferencias significativas, entre las infusiones sistémicas y portales de ClNa 0,45%, en el flujo urinario y en la excreción de sodio y de potasio. Las experiencias las realizaron en perros despiertos y anestesiados, en estos últimos hay una tendencia hacia una mayor excreción de sodio y una menor respuesta diurética que en los despiertos y estos autores piensan que se debe a la acción estimuladora de la anestesia sobre la ADH (129). Las diferencias más significativas entre

los perros despiertos y anestesiados no estuvieron en el aclaramiento de agua libre, sino en la diuresis, fundamentalmente en el tanto por ciento de la carga infundida que es excretada a lo largo del tiempo. Es posible que las tasas de infusión empleadas (0,5 y 1,0 ml/kg/min) al ser mayores que las utilizadas por Haberich (150) y Lydtin (222) pueden oscurecer un efecto específico de la infusión portal. Sin embargo, Schneider y col. (297) en perros despiertos utilizaron unas velocidades de infusión similares a las de Lydtin y tampoco encuentran diferencias entre la respuesta diurética a la infusión de agua destilada en la vena porta y a la misma infusión en una vena periférica, añadiendo, que sí elevaban la velocidad de infusión obtenían una diuresis importante, pero similar para ambas vías.

A pesar de lo controvertido de los resultados de las experiencias en perros, han sido precisamente en estos animales, donde se han realizado un número importante de investigaciones para estudiar cuál es el mecanismo mediante el cual los osmorreceptores del área porta hepática, pueden transmitir la información al sistema nervioso central. Los trabajos de Montastruc y col. (237) muestran igualmente en perros anestesiados, una respuesta diurética superior al infundir en la vena porta agua destilada con respecto a la administración sistémica. Esta diferencia en la respuesta desaparece al realizar al animal una adrenalectomía o bien una hipofisectomía. Por lo que concluyen que, el mantenimiento del eje hipofisario-adrenal es esencial para la acción osmorreguladora del hígado. Desde los trabajos de Haberich (150) se ha tratado de demostrar la participación del sistema anti-diurético, hipotálamo-hipofisario, en las situaciones de estimulación de los osmorreceptores hepáticos. Pero han sido los trabajos de Chwalbińska-Moneta (64) los que han puesto de manifiesto la existencia de una correlación directa entre las variaciones en la osmolaridad del lecho vascular portal y los niveles plasmáticos de ADH. La infusión de ClNa hipertónico (1,8; 2,7, y 3,6%) en la vena porta de perros despiertos produce un rápido y muy elevado aumento en la concentración plasmática de ADH, medida por bioensayo (64, 327), este aumento es transitorio y disminuye cuando desaparece el estímulo. Chwalbinska postula que el estímulo es la variación puntual en la osmolaridad de la sangre portal, apoyando la tesis de que en esa zona hay una sensibilidad osmótica (1, 150, 291), y sugiere que la transmisión de la información acerca de estos cambios se lleva a cabo por la rama aferente del nervio vago hepático, como postularon Haberich (150), Adachi (2) y Niijima (253).

La implicación de la ADH en las respuestas a las alteraciones osmolares del lecho vascular portal también ha sido postulada por Kozxowsk y col. (189), en perros, en los que encuentra que tras la sección de una rama hepática del nervio vago, disminuyen las respuestas de sed, que observaba al infundir soluciones hipertónicas e hipotónicas en la vena porta. También los trabajos en ratas de Schmitt (296) muestran que la infusión en la vena porta de ClNa hipertónico aumenta la actividad eléctrica de las células de los núcleos hipotalámicos, supraóptico y paraventricular, relacionando estos cambios con los ritmos circadianos que controlan la ingesta de alimentos en estos animales.

El estudio en el hombre del papel del hígado en la osmorregulación ha sido menos extenso que en animales de experimentación. Haberich (150) administró a un grupo de personas distintas soluciones intragástricas e intravenosas, observando que la administración intragástrica de una solución hipotónica estimulaba más deprecia la diuresis que la intravenosa. Cuando aumentaba la concentración de electrolitos en la solución la diuresis disminuía. Estos resultados coincidían con lo que previamente habían observado en ratas, sugiriendo la existencia también en el hígado de humanos de un mecanismo osmorregulador. En humanos, el papel del hígado en la osmorregulación también ha sido puesto de manifiesto por Kiil y Andersen (182). Estos investigadores observaron que tras la infusión hipotónica de ClNaO, 44% en el estómago de una persona se produce una diuresis elevada, con aumento del aclaramiento de agua libre y del aclaramiento del sodio. La vagotomía truncal no hace desaparecer la respuesta, solamente la sección selectiva de la conexión vagal, entre el estómago y el hígado, hace que desaparezca la respuesta. Por tanto sugieren un mecanismo osmorreceptor en el estómago y/o el hígado de humanos, similar al propuesto por Haberich (150).

Sin embargo Bennet y col. (26) no han podido encontrar unos resultados similares investigando este tema, por lo que pensamos que en humanos este papel del hígado necesita una mayor investigación (291).

A.3.d. Papel del hígado en la regulación de la excreción de sodio.

Un amplio conjunto de investigadores han postulado que, entre las funciones del hígado como órgano sensor, se encuentra la de modular la excreción renal de sodio en situaciones fisiológicas normales (75, 291, 325). Hay una variedad de diseños experimentales para el estudio del papel del hígado y de sus territorios anejos en esta función de homeostasis, esto ha dado lugar a una gran variabilidad en los resultados obtenidos por los distintos investigadores, que ha impedido extraer unas conclusiones clarificadoras sobre el tema y, por lo tanto, se hace necesario una revisión crítica de estas investigaciones.

A.3.d.1. Papel de la circulación hepática.

En 1921 Lamson y Roca (196) observaron que la capacidad para desprenderse de una solución intravenosa de ClNa, disminuía cuatro veces si el hígado era excluido del conjunto de la circulación. Basándose en estos estudios, el grupo de Wolfman y col. (364) estudiaron en perros los mecanismos mediante los cuales, una unión portocava podría influir en la excreción renal de sodio. Para ello estudiaron comparativamente las diferencias en la excreción de agua y de sal, frente a infusiones de salino isotónico (500 ml) en la vena porta, y en una vena periférica, en perros normales y en perros con una unión portocava. Estos autores observaron que los perros con esta unión retienen agua y sodio; si la solución salina isotónica se administra por la vena porta, o en la circulación sistémica y además retienen en cantidades superiores a las de los perros normales. Los animales controles aumentan la excreción de agua y de sodio, tras la infusión por ambas vías. En ambos grupos las excreciones de sodio fueron mayores tras la infusión en la vena femoral que en la porta. Concluyen que la exclusión del hígado de la circulación puede causar una alteración importante, impidiendo la eliminación urinaria rápida de sobrecargas de agua y de sal. Asimismo, sugieren que el papel del hígado estaría en conexión con los mecanismos antidiuréticos controlados por la neurohipófisis y con los de la corteza adrenal (150, 327). En la misma línea de investigación se encuentran los trabajos de Mullane y Yhap (244) y los de Perltmutt y col. (269) en ratas despiertas, parcialmente hepatectomizadas, y los realizados en perros, con enfermedad hepática experimental, por Mullane y Gieldman (243). Todos ellos encontraron como Wolfman (364), que la excreción de sodio, en respuesta a una sobrecarga salina isotónica disminuía, si se excluía el hígado, o se hepatectomizaba, o bien si estaba disminuida su función.

A.3.d.2. Respuestas a alteraciones de la concentración de sodio en la sangre portal mediante infusiones intravenosas.

Un conjunto de investigadores ha tratado de ver, de modo más preciso, si el hígado podía sentir y analizar cambios inducidos experimentalmente en las concentraciones de electrolitos y más concretamente de sodio, de la sangre portal y si ello influía de forma específica en la excreción de sodio. Así, Daly y col. (75) observaron en perros anestesiados, una mayor excreción de sodio después de la infusión de ClNa hipertónico 855 mM (0,075 ml/kg/min, 30 min) en la vena porta, que después de una infusión idéntica en la vena femoral. Esta diferencia no variaba con el orden en que fueron realizadas las infusiones dentro del mismo perro, la tasa de filtración glomerular no se alteró durante las experiencias. También excluyen la mediación de posibles cambios en la concentración plasmática de mineralocorticoides y/o vasopresina, pues administraron ambos, previamente a la experiencia. Las respuestas natriuréticas que observó Daly parecen no estar en relación con alteraciones en la con-

concentración de sodio en plasma (P_{Na}), ya que calcularon que la variación en P_{Na} de la sangre de la vena porta, después de la infusión de ClNa hipertónico, fue de 4mEq/l. Strandhoy y col. (325) en perros anestesiados, y pretratados con mineralocorticoides y vasopresina, estudiaron comparativamente las respuestas renales a la infusión en la vena porta de una solución hipertónica de ClNa 5%, y las respuestas a la misma infusión en la vena femoral. Sin embargo, con respecto a Daly (75) introdujeron varios cambios metodológicos, primero en cuanto al análisis de los resultados y, segundo estudiaron si la respuesta natriurética variaba con la velocidad de infusión del salino hipertónico; el resultado fue que sí estaba relacionada, dentro de unos ciertos límites. A una velocidad de infusión de 0,05 ml/kg/min, la natriuresis aumentaba sólo después de la infusión portal, a 0,1 ml/kg/min aumentaba después de la infusión por ambas vías, pero el aumento después de la infusión portal era mayor. Si aumentaba la velocidad ya no observaba diferencias en las respuestas. Strandhoy y col. (325) infundió sacarosa al 56% (isotónica a la solución de ClNa 5%), por la vena porta y por la vena femoral, a la velocidad de 0,1 ml/kg/min, 30 min, pero no encontró diferencias en la respuesta natriurética. Estos autores concluyen que el hígado parece responder a cambios en la concentración de sodio de la sangre portal, más que a alteraciones en la osmolaridad o en el volumen. Entre los mecanismos propuestos por Daly y Strandhoy para explicar sus resultados, sugieren la mediación de un factor humoral, de posible origen hepático (75, 134, 231, 258, 325).

Passo y col. (263) estudiaron en gatos anestesiados las respuestas renales a la infusión de soluciones hipertónicas de ClNa 1 M y de sacarosa 1,68 M (0,206 ml/min, 90 min) en la vena porta, comparándolas con las respuestas a infusiones idénticas en la vena femoral. Estos estudios los llevaron a cabo antes y después de una vagotomía bilateral. Los gatos recibieron un tratamiento previo con mineralocorticoides y un equivalente a la ADH (pitresina). Estos investigadores encuentran aumentos significativos de la natriuresis y del flujo urinario, durante la administración del ClNa hipertónico en la porta, que son superiores a los obtenidos después de la infusión femoral. Si realizan una vagotomía, las respuestas a la infusión por ambas rutas se igualan. Cuando infundieron sacarosa, observaron aumentos en el flujo urinario y en la excreción de sodio pero similares para ambas vías de infusión, y que eran menores que los observados después de la infusión salina. Estos autores concluyen por una parte, que en la circulación portal hay receptores sensibles a cambios en la concentración de sodio y no a la osmolaridad, y que el aumento de la concentración de este ión en la sangre portal, podría estimular la tasa de descargas de la rama aferente del nervio vago hepático. Con ello postulan la prioridad del mecanismo nervioso, frente al hormonal propuesto por otros autores (75, 134, 325). Sin embargo, estas respuestas no se han encontrado en otros estudios sobre el tema. Potkay y Gilmore (278), en perros despiertos no observaron diferencias significativas en la excreción de sodio, ni en el flujo urinario, después de la administración de ClNa hipertónico (855 mM) en la vena porta, y en una vena periférica, utilizando velocidades de infusión relativamente bajas (0,02 y 0,07 ml/kg/min). Encontraron que en los perros que no recibieron vasopresina ni mineralocorticoides antes de la experiencia, muestran un aumento mayor de la excreción de potasio después de la infusión periférica que después de la infusión portal. Ahora en los perros que sí recibieron ese tratamiento, el flujo urinario aumentó más después de la infusión portal, pero las excreciones de electrolitos eran similares para ambas vías. Estos investigadores concluyen que, no encuentran evidencia en perros despiertos que apoye los resultados de Daly (75) y Strandhoy (325) y sugieren que la causa principal de la discrepancia es la utilización por parte de estos últimos de animales anestesiados.

En trabajos realizados con objeto de investigar si los mencionados receptores hepáticos son sensibles a cambios en la concentración de otros electrolitos distintos del sodio, Aizman y col. (4) han observado en perros aumentos específicos en la excreción de potasio tras una infusión portal de ClK al 1%, y dichas respuestas podían ser suprimidas si se realizaba una vagotomía. Pero en este tipo de estudios no se ha profundizado demasiado, centrándose el debate científico, fundamentalmente, en la comprobación de los primeros resultados de Daly y col. (75) y ver si son reproducibles en animales despiertos. Así, Kapteina y col. (179) con un protocolo experimental similar

al de Daly (75), Strandhoy (325), Passo (263) y Potkay (278), estudiaron en perros despiertos, las respuestas renales a la infusión de ClNa 855 mM (0,05 ml/min/kg de peso, 40 min) en la vena porta "versus" vena cava. Observaron que tanto la infusión de esta solución por una vena como por la otra, produce aumentos en el flujo urinario, en la tasa de excreción de sodio, en la osmolaridad del plasma y en ritmo cardíaco. El aumento del flujo urinario es atribuido a los aumentos en el aclaramiento osmolar; el aclaramiento de agua libre descendió constantemente. Asimismo, la actividad de renina plasmática disminuyó tras la infusión, y de un modo similar por ambas vías. Kapteina y col. concluyen que su trabajo no aporta evidencia de que en el hígado de perro haya algún mecanismo osmorreceptor y/o de control de la excreción renal de sodio (179).

Entre los estudios llevados a cabo en ratas están los realizados por Perlmutter (269, 270). Este investigador ha demostrado que la expansión con salino isotónico (2,5% del peso) en una rata parcialmente hepatectomizada, produce una respuesta natriurética menor que en una rata normal (270). Asimismo ha encontrado que si a una rata despierta se le infunde salino isotónico por la vena porta, presenta una respuesta natriurética mucho mayor, que si el salino se le infunde en una vena periférica (268). En este último trabajo no observó cambios en la FG, en la excreción de potasio, ni en la carga filtrada de sodio, relacionados con la respuesta natriurética. Ahora, si repetía la experiencia, pero infundiendo la solución a mayor velocidad, no observaba diferencias entre las respuestas a la infusión sistémica y a la infusión en la vena porta. En otro estudio este investigador ha observado que la infusión de soluciones de glucosa isotónicas no producen respuestas natriuréticas diferentes, si se infunden en una vena sistémica o en la porta (268, 269). Este hecho le llevó a plantear qué son las alteraciones en la concentración de electrolitos de la sangre portal, y no de la osmolaridad, las que estimulan la mediación del hígado en la respuesta renal. Además, encontró que las respuestas se mantenían intactas después de una vagotomía hepática, postulando la mediación de un factor humoral en las respuestas a la infusión portal de salino, y sugiriendo que los mecanismos nerviosos podrían actuar en otras circunstancias, como cambios de presión, osmolaridad, etc.

Más recientemente Valdivieso y Pérez (343) han realizado experiencias similares a las de Perlmutter (269), en ellas han estudiado si el balance previo de sodio del animal tenía alguna influencia en la respuesta a la infusión portal de salino isotónico. El estudio lo llevaron a cabo en ratas despiertas. A un grupo de ellas le restringieron la ingesta de sodio, y a otro grupo le dieron a beber previamente ClNa. Cuando infunden una solución de salino isotónico, el animal que no ha recibido sodio en la dieta, no presenta diferencias en la excreción de sodio en relación con vía de infusión. Sin embargo, los que bebieron ClNa presentan después de la infusión portal, una excreción de sodio, tanto fraccional como absoluta, superior a la de aquellos que reciben la infusión sistémicamente. Esta natriuresis específica después de la infusión portal; parece estar mediada por la inhibición de la resorción tubular de sodio. Concluyen que estos resultados ponen de manifiesto que, al menos en la rata, el hígado juega un papel en la regulación del sodio, y sugieren que la ingesta prolongada del mismo, puede estimular la actividad de algún factor hepático, —no determinaron si nervioso o humoral—, en el control de la excreción de sodio, de tal modo que se magnificarían las diferencias, de por sí existentes entre las respuestas a infusiones de salino en la porta y en una vena sistémica.

Un tipo de estudios importante, que hasta ahora no hemos mencionado en este apartado, son los estudios de electrofisiología, llevados a cabo en hígado aislado y perfundido, con objeto de investigar la sensibilidad de los receptores portales a distintos electrolitos. Estos trabajos apoyan en su mayoría la existencia de ionreceptores en el lecho vascular portal. Andrews y Orbach (15, 16) han descrito que las fibras aferentes del nervio vago del hígado de conejo, aumentan sus descargas al aumentar la concentración de cloruro sódico en el medio de perfusión, y disminuyen al disminuir ésta. También reaccionan de igual forma con sulfato sódico y cloruro de litio, pero no responden a la glucosa y al manitol, ni tampoco a cambios osmóticos producidos por la variación de las concentraciones de agua y del líquido de perfusión. Con lo cual, sugieren que estos receptores son más sensibles a cambios en la concentración de sodio que en la osmolaridad. Adachi y col. (2) como ya se mencionó anteriormente, encontraron resultados similares. Schmitt (295) monitorizó la actividad de neu-

ronas hipotalámicas aisladas, en respuesta a infusiones intraportales de salino hipertónico. Estas infusiones producen cambios en las tasas de descargas, de las neuronas aisladas de la zona lateral del hipotálamo, de la "zona incerta" y de la zona ventral del tálamo de la rata, mientras que la infusión portal de salino isotónico no produce variaciones. Si se comparan estos resultados con los obtenidos después de infusiones idénticas, en una vena yugular, se ve que estas últimas no producen respuestas apreciables.

Los receptores iónicos del área porta-hepática también han sido implicados en el control de la ingesta de sal en ratas. Así, Blake y Lin (31) han encontrado que las infusiones en la vena porta de ClNa hipertónico en ratas sedientas, disminuyen la ingesta de salino isotónico y no afectan a la ingesta de agua de dichas ratas. Sin embargo, si la infusión de salino hipertónico se realiza en la vena cava inferior, no se produce la disminución del consumo de sal. Si se realiza la sección del nervio vago cervical derecho, se suprime el efecto de las infusiones salinas en la porta. Asimismo, si en vez de salino se administra sacarosa o fructosa 2 M (31, 32), no se producen alteraciones en el consumo de agua, ni de sal, sugiriendo que las respuestas a las infusiones portales son específicas para los cambios en las concentraciones de iones.

A.3.d.3. Respuesta a la administración oral e intragástrica de soluciones salinas.

Los estudios comentados hasta ahora han tratado de ver la respuesta renal a variaciones en la concentración y en la osmolaridad de la sangre hepática y portal, mediante infusiones de distintas soluciones, realizadas directamente en esta última vena. Pero teniendo en cuenta que el objeto primero de este estudio es la consideración de que el hígado puede sentir y analizar los cambios originados como consecuencia de variaciones en la ingesta diaria, parece lógico pensar, que también se hayan realizado investigaciones sobre las respuestas renales frente a administraciones orales o intragástricas, de diferentes soluciones, que induzcan alteraciones en las características físico-químicas de la sangre del lecho vascular portal similares a las ya comentadas. En 1885, Bruton (51) describió cómo los animales sometidos a una dieta restringida de sal, reducen la cantidad de la misma excretada en la orina. Posteriormente, Mc Cance (228) en humanos estableció de una manera formal la alta eficiencia para hacer ajustes compensadores en la excreción de sodio frente a cambios en el contenido del mismo en la ingesta. En este sentido, el grupo de Lennane y col. (201) han llevado a cabo un estudio en conejos despiertos, previamente sometidos a una dieta con bajo contenido en sodio, a los cuales les administraron vía oral, una solución de ClNa hipertónico, y compararon las respuestas renales con las de una infusión idéntica pero intravenosa. Estos autores observaron que los que reciben la solución salina oral responden con una natriuresis mayor que los que la reciben intravenosa, a pesar de la situación previa de déficit de sodio. Entre los mecanismos que sugieren Lennane y col. como mediadores en la natriuresis específica tras la administración oral de la solución de salino hipertónico, están:

- 1.- Un reflejo nervioso proveniente de la pared del intestino. Sin embargo, resaltan que el volumen administrado es pequeño y no se espera una distensión del intestino.
- 2.- La liberación de una hormona natriurética.
- 3.- La liberación de alguna sustancia no conocida, con capacidad de bloquear, de algún modo, los mecanismos encargados de la retención de sodio (antialdosterona).
- 4.- La degradación rápida de la aldosterona.
- 5.- La estimulación de los receptores para iones, o bien de los osmorreceptores, del territorio vascular del sistema porta o del hígado dando lugar a que se desencadene alguno de los mecanismos anteriores.

Lennane y su grupo llevaron a cabo otro estudio en humanos (200), a los que restringe la ingesta de sodio previamente a la experiencia (5 mmol/24h). Observaron que las personas que recibieron el salino hipertónico "per os" (100 mmol, en cápsulas de gelatina) lo excretaron más rápidamente, que los que lo recibieron intravenoso (100 mmol/160 ml). Las respuestas a la administración

oral parecen ser menos duraderas y significativas en humanos, si se comparan con las de los conejos. Tampoco encontraron alteraciones en los parámetros de la función renal, que les permitieran explicar las diferencias en la natriuresis; la concentración plasmática de aldosterona a las 24 h, estaba baja en las personas que recibieron la sobrecarga oral, pero no fué un dato aclaratorio para explicar su posible participación. Carey (61) y Carey y col. (62) también han mostrado evidencia en sus trabajos, en humanos y en conejos, de la existencia de receptores para iones en la zona esplácnica y en el lecho vascular portal, así como la posible participación de un mecanismo que participe en el control de la excreción renal de sodio.

Sin embargo, estos resultados no han podido ser comprobados por otros autores. Así, Hanson y col. (155) no han encontrado evidencia en perros despiertos, de que en el sistema gastrointestinal o en la vena porta exista un mecanismo capaz de ser sensible a variaciones en la concentración de sodio debidas a la ingesta. El diseño experimental de este trabajo fue igual al de Lennane y col. (201), salvo que en este caso, considerando que la ingesta de sodio, normalmente va unida a la ingesta de alimentos, realizaron un estudio comparativo de las respuestas a la administración de salino hipertónico oral e intravenosa, solas y después de la ingesta de una ración normal de comida. No encontraron diferencias en la excreción urinaria de sodio después de la administración de salino hipertónico intragástrico, con respecto a la infusión intravenosa. Sin embargo, los perros que recibieron alimento, inmediatamente después del salino hipertónico, presentaron una reducción significativa en su excreción de sodio, pero tampoco hubo diferencias en función de la vía de administración del salino. Estos autores argumentan que una causa posible de las diferencias con el trabajo de Lennane sería la utilización de dos especies distintas de animales, con comportamientos alimenticios diferentes (201). En este sentido, en 1981 Obika y col. (257), ha llevado a cabo un estudio en conejos, con un diseño similar al de Hanson en los perros, y han encontrado unos resultados similares a los de este último.

A.4. Hormona natriurética.

La posibilidad de que un factor humoral circulante, con actividad natriurética, pueda ser liberado en respuesta a una expansión del volumen extracelular, ha causado gran interés a un buen número de investigadores desde hace aproximadamente varias décadas (82, 84, 194, 210). La oposición a esta "nueva hormona natriurética" ha sido alimentada y justificada, primeramente, por los resultados de modernos estudios sobre el papel de los factores físicos y hemodinámicos, dentro de los mecanismos de la excreción de electrolitos por el riñón y, últimamente, por el descubrimiento de las propiedades natriuréticas de una serie de hormonas conocidas. Esto ha obligado a la realización de estudios más precisos, que permitan diferenciar las denominadas propiedades natriuréticas farmacológicas de las hormonas exógenas, del papel fisiológico que las hormonas endógenas puedan jugar en la regulación del balance de agua y de sal.

Dentro de los mecanismos que median la excreción de sodio, las hormonas producidas en el mismo riñón, juegan un papel importante. Este órgano es un lugar de producción de potentes sustancias vasoactivas que pueden jugar un papel favorecedor (dopamina, kininas, prostaglandinas) o más bien un papel desfavorecedor (renina-angiotensina, noradrenalina), de las natriuresis, mediante la regulación de la hemodinámica renal y posiblemente también influenciando de una manera directa los mecanismos de transporte tubular. Por esta razón, cualquier nueva hormona natriurética debe de enfrentarse competitivamente con las anteriores. Así, por ejemplo, Osgood y col. (261) muestran que si la presión de perfusión renal se disminuye experimentalmente antes de realizar una expansión del volumen extracelular, la natriuresis que en condiciones normales se produciría, no tiene lugar o es pequeña. Este tipo de experiencias, sin embargo, se ha interpretado como una clara evidencia en contra de la existencia de la hormona natriurética (284). Sin embargo, una explicación alternativa a este hecho podría ser que la hormona natriurética aún liberándose, no puede superar la situación creada por los factores intrarrenales que están operando contra la respuesta natriurética, o bien que se produzca un

fallo en la producción de la hormona y/o en la activación de la misma por el riñón, en respuesta a la expansión, ya que este órgano ha sido estimulado para hacer frente a un descenso en la presión de perfusión renal (251).

Según lo que se ha comentado en los apartados anteriores, la excreción de sodio en su conjunto parece ser un resultado de la cooperación de diferentes factores, incluyendo la acción de la denominada hormona natriurética (83). Esta conclusión puede considerarse como una de las diferencias entre las concepciones pasadas y presentes de la hormona natriurética. En principio, sólo se postulaba la acción de un factor natriurético desconocido. Posteriormente cuando otro nuevo factor natriurético era descubierto, había una tendencia a disminuir la importancia del factor humoral previo y dársela al nuevo. Por lo tanto, puede ser ventajoso y estimulante para futuras investigaciones el aceptar la coexistencia de varios factores sinérgicos o antagónicos, como responsables del mecanismo de la natriuresis. Un ejemplo de un tipo de coexistencia con respecto a la interacción de factores físicos, hemodinámicos y hormonales, es la llamada "cascada de hormonas natriuréticas", en la cual la natriuresis resultante, que tiene lugar durante la expansión de los fluidos del volumen extracelular es el producto de la cooperación entre la actividad de los nervios renales, y las acciones de la dopamina, el sistema de las calcireinas-kininas, la acetilcolina, la angiotensina, de la noradrenalina, del glucagón, la calcitonina, las prostaglandinas y la hormona natriurética (82, 84, 194, 210). Dentro de esta línea, recientemente se ha postulado una teoría multifactorial del "escape", frente a los efectos de retención de sodio causados por los mineralocorticoides (185).

A.4.a. Situaciones fisiológicas y fistopatológicas en las que se ha postulado la mediación de una hormona natriurética.

La demostración de la existencia de una sustancia circulante distinta de la aldosterona, la cual participa en el control de la excreción renal de sodio, se ha llevado a cabo en una gran variedad de experiencias. Las más importantes fueron las expansiones del volumen de plasma y por tanto, del volumen extracelular, que se llevaron a cabo sin disminución del valor hematocrito y de las proteínas plasmáticas (71, 183, 184, 208, 319), también se ha demostrado la presencia de este factor en situaciones de expansión crónica del VEC, causada por la administración continuada de mineralocorticoides (54, 105, 108, 185, 193). Otras situaciones en las que se ha postulado la mediación de esta hormona son: la posible ausencia responsable de la retención anormal de agua y de sal que tiene lugar en la enfermedad crónica del hígado (101, 107, 191). Su implicación en la elevada tasa de excreción fraccional de sodio que tiene lugar en la uremia crónica (36, 37, 109, 212, 293); así como también en la etiología de la hipertensión esencial (86, 226).

A.4.a.1. Presencia de la hormona natriurética en situaciones de expansión del volumen extracelular.

A.4.a.1.a. Presencia de un factor natriurético circulante.

La primera sugerencia de la existencia de este factor proviene de los trabajos de De Wardener y col., en 1960 (87), los cuales mostraron en perros que la infusión aguda de grandes cantidades de salino se acompañaban de natriuresis en el perro expandido, e igualmente en un perro en circulación cruzada con el primero. La transmisión de esta respuesta natriurética tenía lugar si la perfusión se realizaba con sangre arterial, pero no con sangre venosa, ni tampoco con la mezcla de ambas, lo que les hizo sugerir que esa sustancia tenía una vida media muy corta. En estos estudios excluían toda participación de la aldosterona y/o de la vasopresina (87, 233), en dicha respuesta.

A partir de estos primeros estudios, se han realizado otros en los cuales la expansión del VEC se lleva a cabo bien con soluciones de salino, o Ringer, o bien soluciones que contienen albúmina a distintas concentraciones (82). Muchas de estas experiencias se acompañan de fenómenos de hemodilución resultando difícil la comparación de resultados, de cara a demostrar la mediación de esta hormona natriurética circulante.

Por ello, el mejor medio para realizar la expansión aguda del VEC en un animal, sin producirle cambios dilucionales, es realizarla con sangre de otro animal, con la cual debe estar previamente en equilibrio. Esto puede llevarse a cabo mediante experiencias de circulación cruzada (183,184) o bien mediante el continuo intercambio de la sangre de un animal con el contenido (Ringer, albúmina o salino), de un reservorio, hasta alcanzar un equilibrio entre ambos. Una vez alcanzado éste, se induce una expansión de volumen (30%, durante 15-20 minutos, p.e. mediante un descenso del nivel del contenido del reservorio) (82).

Así, Bahlmann y col. (20) fueron los primeros en realizar la expansión del volumen de sangre de un perro, al que se le había pretratado con acetato de desoxicorticosterona y vasopresina, con sangre, con la que estaba previamente en equilibrio. Los cambios en la excreción de sodio se estudiaron en un riñón denervado, in situ y perfundido a presión constante. Estos autores encuentran aumentos de la carga de sodio filtrada, del aclaramiento de ácido para-aminohipúrico y de la excreción de sodio. Postularon que esta respuesta natriurética se debe a un cambio en la concentración de alguna sustancia humoral. En trabajos de diseño similar, Kaloyanides y col. (175) expanden el volumen de sangre a un perro y con la sangre de este último perfunden un riñón aislado de otro perro, y encuentran aumentos en la natriuresis en el riñón aislado. Con objeto de mantener la expansión en el perro donante, le infunden una solución de cloruro sódico hipotónica para reponer las pérdidas ocasionadas por la diuresis. Postulan la mediación de un factor humoral como responsable de los cambios en la excreción de sodio, y además demuestran que esta última no está mediada por cambios en la presión de perfusión, ni en la actividad nerviosa renal (175, 178).

Otros autores han llevado a cabo sus experiencias expandiendo el VEC con sangre homóloga proveniente de otro animal, en vez de sangre equilibrada como los anteriores (71, 183, 184, 208, 319). Las experiencias se han llevado a cabo en ratas y en riñón aislado de rata (82), o bien mediante trasplante de un riñón de perro a la zona del cuello de otro perro (82), donde es perfundido, y mantenido con unas presiones arterial y venosa constantes, mientras el conjunto del animal se expande un 30% en 15 minutos. Esto va asociado a un aumento en la excreción urinaria de sodio en el riñón transplantado.

En las experiencias de circulación cruzada en ratas (183, 184), cuando la rata donante sufre una expansión de volumen con sangre homóloga, se observa un aumento en la excreción urinaria de sodio de la rata receptora, (183) si el aumento del VEC en la donante se mantiene, bien mediante la reinfusión de la orina, o bien mediante la infusión de cantidades equivalentes de salino o de Ringer (183). Si no se reemplazan estas pérdidas por la orina, no se encuentran aumentos en la excreción de sodio en el animal que actúa como receptor (255). Hay investigadores que previenen dichas pérdidas mediante la nefrectomía bilateral (319). En un trabajo reciente C.A. Knock (183) y Knock y de Wardener (184), han encontrado que la excreción urinaria de sodio aumenta en una rata isovolémica, utilizada como receptor, en una experiencia de expansión del VEC en circulación cruzada, en la cual la reposición de las pérdidas por la orina, en la rata donante, se hicieron mediante reinfusión de su propia orina. Cuando en otro grupo de ratas, se les inyecta 1 ml. de sangre de la rata donante, éste produce un aumento en la excreción de sodio. Sin embargo, si en la rata donante se realiza una nefrectomía bilateral previamente a la expansión del VEC, y se le extrae 1 ml. de sangre que bioensaya en otra rata posteriormente, éste no produce un aumento en la excreción de sodio. Estos autores postulan que hay un cambio en la concentración plasmática de una sustancia circulante, que además produce natriuresis en la rata recipiente, y sugieren que esta sustancia natriurética es excretada en la orina y que podría ser producida por el riñón.

El grupo de Pearce y col. (266) observaron que la expansión del volumen de sangre en una rata produce menos respuesta natriurética, si la rata ha sido privada de sodio, que si ha recibido previamente una ingesta alta del mismo y aún más, si además recibe mineralocorticoides. Sin embargo, si la rata donante es la que posee un balance de sodio elevado y la receptora no, después de una hora de circulación cruzada, hay una respuesta natriurética en ambas. Ellos explican este resultado diciendo, que la falta de respuesta en la rata depleccionada de sodio se debe a la disminución de una

hormona natriurética circulante, y no a una mayor concentración de mineralocorticoides.

En la mayor parte de estas experiencias descritas, el aumento en la excreción de sodio causado por la expansión del volumen de sangre, no va acompañado de aumentos en el flujo sanguíneo renal, ni de la tasa de filtración glomerular, por ello se sugiere que este aumento se debe a la disminución de la resorción tubular de sodio (82, 183, 184, 283), es más, en algunos trabajos recientes, se ha encontrado que si bien la resorción proximal, fraccional y absoluta, está disminuida, la natriuresis observada se debe a un descenso en el transporte de sodio en los segmentos más distales de la nefrona (82).

A.4.a.1.b. Presencia de la H. N. tras la expansión aguda del volumen extracelular con salino.

Entre los mecanismos que dan lugar a la respuesta natriurética en la expansión del VEC con salino isotónico, se ha sugerido la mediación de la hormona natriurética (87, 233). Una expansión aguda del VEC con salino produce un rápido aumento del flujo urinario y de la excreción de sodio (204, 368). La natriuresis parece ser similar a la producida por una expansión con albúmina; pero la diuresis es mayor la producida por el salino (83, 323). Actualmente, las inhibiciones de la resorción de sodio no pueden ser explicadas sólo por aumentos en la carga filtrada de sodio y/o por la disminución de los niveles plasmáticos de aldosterona (83, 87, 233). Del estudio de los distintos segmentos de la nefrona, en esta situación de expansión de VEC, se ha sugerido y demostrado la intervención de distintos mecanismos intrarrenales (filtración glomerular, inhibición resorción de sodio en el TP y en la rama delgada del asa ascendente de Henle, y otros segmentos más distales). Y hay una interesante bibliografía sobre el tema (83, 303).

Hay una serie de primeros estudios que ponen de manifiesto que en el plasma de animales de experimentación expandidos con salino, hay un tipo de factor que inhibe la resorción de sodio, y causa aumentos en la natriuresis (87, 233). Posteriormente se han llevado a cabo numerosas investigaciones para caracterizar a este factor y aislarlo de distintos líquidos (orina, plasma, etc...), y órganos (82), y para delimitar su acción biológica (84, 194, 210). Así, Buckalew en 1970 (55) encuentra que en el plasma de perros expandidos con salino, hay una sustancia de bajo Pm, ultrafiltrable y dializable que inhibía el transporte de sodio. Posteriormente aisló también este factor del plasma mediante cromatografía y comprobó que inhibía el transporte de sodio en la piel del sapo, en la vejiga de la rana y era natriurético en ratas (53, 55, 56). En trabajos recientes ha utilizado la cromatografía líquida de alta presión para aislarlo, y sugiere la mediación de un mecanismo enzimático, de tal modo que de una sustancia de Pm elevado se produciría otra de bajo Pm, que es la que él logra aislar (146). Siguiendo esta última metodología ha encontrado que esa sustancia inhibe la acción de la enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP}$ asa (147) y compete con la digoxina frente a anticuerpos de la última, postulando para la H.N. una naturaleza parecida a la de los digitales endógenos (52, 147).

Gonick y col. (138) cromatografiaron plasma de ratas normales, después de una expansión con salino, y encontraron un factor de bajo Pm, que inhibe la acción de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP}$ asa. En otro estudio realizado de forma similar pero en eluidos de riñón, Gonick encontró también esta actividad biológica (138, 139) y que además producía natriuresis en ratas. Louis y Favre (219 y 220) también han aislado un factor de bajo Pm en eluidos de riñón de ratas, después de una expansión con salino.

Finalmente, el equipo de De Wardener (49, 65, 66, 67) y de Kramer y col. (190, 193) en estudios de expansión de VEC en humanos, mediante infusión de salino isotónico, también demuestran la presencia en el plasma y en la orina, de dos sustancias, una de bajo y otra de alto Pm y de propiedades biológicas similares a las mencionadas por los autores anteriores.

A.4.a.1.c. Papel de la hormona natriurética en el escape a la retención de sodio inducida por mineralocorticoides.

Cuando a una persona o a un animal de experimentación sanos se les administra durante un

tiempo más o menos largo mineralocorticoides a dosis farmacológicas, se les produce un aumento importante en el volumen de plasma, producido por el efecto de estas hormonas sobre la retención de sodio, si además se administra simultáneamente una ingesta con alto contenido en sodio, la retención del mismo es evidente durante los primeros días, pero seguidamente el balance de sodio se restablece y para ello comienza a excretar importantes cantidades de sodio en la orina. A este fenómeno se le denomina "escape". Los mecanismos responsables de este fenómeno aún no han sido esclarecidos (185) y entre ellos se ha postulado la participación de la hormona natriurética (54, 105, 108, 193).

Buckalew y Lancaster (54) han evaluado la presencia de este factor humoral en el plasma de perros, antes y después de la administración de desoxicorticosterona (DOCA). Estos autores han demostrado que el escape inducido por DOCA correlaciona con la presencia en el plasma de una actividad inhibidora del transporte de sodio en la membrana de la vejiga de rana (antinatriurética). Además, encuentran una similitud de esta actividad antinatriurética con la que habían observado en el plasma de perros normales después de una expansión con salino (56). Estos investigadores demuestran que en el plasma de los perros que responden con el "escape" se puede aislar mediante cromatografía una fracción de bajo Pm (<700) que es antinatriurética y natriurética. Si a esos mismos perros se les induce una deplección de volumen, mediante un tratamiento con diuréticos -furosemida-. No se encuentra en el plasma la actividad mencionada. También Favre y col. (105, 106, 108), han demostrado la presencia en la orina de perros normales, tratados con dosis altas de mineralocorticoides y una dieta de alto contenido en sodio, de un inhibidor del transporte del mismo en la vejiga de rana, que también produce natriuresis en la rata. Además, encuentran una correlación positiva entre la presencia del inhibidor en la orina y los niveles de la excreción de sodio en los perros durante el fenómeno de "escape".

En la orina de personas con el síndrome de Conn, es decir, con hiperaldosteronismo primario y que poseen una expansión crónica de volumen, así como en la de personas normales tratadas durante un cierto tiempo con mineralocorticoides (192, 193) también ha sido demostrada la presencia de un factor de las características mencionadas. En el plasma de este tipo de enfermos y de personas, Kramer y col. (193) han encontrado actividad antinatriurética y natriurética. Estos autores sugieren que es debido a una sustancia circulante de bajo Pm, excretable en la orina que puede ser secretada frente a cambios en el volumen extracelular, y que puede afectar directamente a la resorción tubular de sodio (192).

A. 4. a. 1. d. Papel de la H. N. en la respuesta renal a la inmersión.

La mediación de una hormona natriurética también se ha puesto de manifiesto en situaciones en las que se produce una redistribución de volumen extracelular. Entre estos trabajos están los realizados por Cort y Lichardus (70), en gatos anestesiados a los que les realizan una oclusión de la carótida y encuentran que en la sangre de estos animales hay actividad natriurética, al probarla en la rata. Posteriormente, también se ha encontrado esta actividad en el plasma de personas (102) y de animales de experimentación (180, 272), cuando se induce una respuesta natriurética mediante una redistribución del VEC (98, 103, 119).

En esta línea de estudio de los mecanismos patogénicos que median las alteraciones del VEC ha sido de gran utilidad el modelo de inmersión hasta el cuello en agua a temperatura corporal. La inmersión de una persona sana en esas condiciones, induce una inmediata redistribución del volumen circulante, produciéndose una relativa hipervolemia central (98, 103, 119). El gasto cardíaco y el volumen central de sangre aumentan, estos cambios son reversibles después de la inmersión. Un hecho importante que produce la inmersión es un aumento importante y progresivo de la excreción de sodio, de potasio y de orina. Los mecanismos mediante los cuales este modelo de redistribución del VEC induce esos cambios en el manejo renal de sodio no han sido aclarados completamente y entre ellos se ha sugerido y en parte puesto en evidencia (98) la participación de un factor humoral con actividad natriurética. M. Epstein y col. (98) no han observado cambios en la filtración glomerular,

ni en el flujo plasmático renal, y la concentración plasmática de renina y de aldosterona están disminuidas. El aumento significativo en la excreción fraccional de sodio parece apoyar que la natriuresis es atribuible a un descenso en la resorción tubular más que a una alteración en la carga filtrada (98, 103). Una vez finalizada la inmersión, la respuesta natriurética sigue aumentada, mientras que el VEC se va contrayendo y el gasto cardíaco recupera sus valores normales. También M. Epstein ha encontrado que la persistencia de la respuesta natriurética no puede ser atribuida a una supresión mantenida de los mineralocorticoides (98). Luego ese retraso de la excreción de sodio en volver a valores basales, va a favor de la hipótesis de la mediación de un mecanismo humoral, distinto a la aldosterona, más que a mecanismos nerviosos y hemodinámicos (102).

La participación de un factor humoral en la respuesta natriurética a la inmersión, ha sido sugerida también por diferentes laboratorios. En 1964, Gauer y col. (119) describieron esta posibilidad. Sin embargo, cuando bioensayaron el suero de personas normales sometidas a la inmersión, obtuvieron antiuresis. En observaciones recientes por M. Epstein en la orina de personas normales durante la inmersión (102) ha podido encontrar la presencia de un factor que es natriurético en rata; cuando muestras de plasma de dichas personas se fraccionan en Sephadex G25, la fracción que eluye tras el pico de las sales produce una inhibición de la corriente del sistema de cortocircuito al bioensayarla en vejiga de rana. En contraste, muestras previas a la inmersión (98) no producen ninguno de los hechos mencionados. Todas estas observaciones sugieren la mediación de un factor humoral, de características similares a las descritas por otros autores (36, 52, 65, 66).

A.4.a.2. Presencia de la hormona natriurética en la uremia crónica.

La posibilidad de que una H.N. actúe como un modulador de la excreción de sodio en la uremia crónica ha originado considerable interés, entre numerosos investigadores. Bricker y col. (47), han realizado una exhaustiva investigación acerca del tema, tratando de aislar y caracterizar el papel de esta hormona en pacientes y en animales de experimentación con esta disfunción renal (36, 37, 109, 212, 293). Han demostrado que en el suero de personas y de perros con uremia crónica hay presente un factor de bajo P_m que inhibe la incorporación de PAH en cortes finos de corteza renal, de conejo y de rata (47). Asimismo, este factor inhibe el transporte de sodio en la piel de sapo y en la vejiga de rana (38) y si se inyecta en una rata, produce aumentos en la excreción de sodio (36). También en la orina de enfermos urémicos parece estar presente un factor de características similares, según han demostrado también estos autores (37). La presencia en el plasma y en la orina del mencionado factor parece correlacionar de modo directo con los cambios que se producen en la excreción de sodio, en los propios pacientes y en los animales. En este sentido, han demostrado que la hormona natriurética está ausente en enfermos urémicos que además presentan síndrome nefrótico y balance positivo de sodio (37, 108). Tampoco detectan actividad natriurética en la orina de perros urémicos a los que restringen la ingesta de sodio (293). Un hecho importante que encontraron estos investigadores fue que al aumentar experimentalmente la excreción fraccional de sodio en perros normales, mediante una dieta con contenido elevado del mismo y además mineralocorticoides, es decir, induciendo el fenómeno de "escape", han logrado detectar un factor de características similares en la orina de estos perros (108), este hecho les lleva a apoyar el planteamiento de que el factor aislado en la situación de uremia crónica, no está en relación con la disminución de la función renal, sino que es un factor biológico presente en situaciones normales en las que es necesario mantener el balance de sodio (108, 212).

Estudios posteriores en túbulos colectores corticales de conejo aislados y perfundidos, han demostrado que cuando añaden a la superficie peritubular el factor natriurético, se produce un descenso en la diferencia de potencial negativa de la luz del lumen y una disminución de la resorción activa de sodio (109). El grupo de Bricker ha estandarizado un método de aislamiento, mediante cromatografía en gel de Sephadex G 25 y la localización de la actividad natriurética es en la fracción que aparece inmediatamente después de las sales. De los trabajos realizados por este equipo se

concluye, que esta sustancia es un compuesto de bajo peso molecular (menos de 1.000 daltones), de posible naturaleza peptídica, ácido no volátil, insoluble en lípidos, resistente a aumentos y descensos en la temperatura, dializable y ultrafiltrable. Al igual que en los otros apartados anteriores, la contribución de la hormona natriurética a los mecanismos de estas situaciones patológicas, se entiende en colaboración con otra serie de hormonas y factores.

A.4.a.3. Papel de la hormona natriurética en la hipertensión.

Hay un concepto generalizado de que la ingesta con alto contenido en sal parece ser la responsable de la hipertensión en el hombre, sin embargo, no existe una explicación clara de cómo se produce este hecho. Recientemente, se ha postulado que la hormona natriurética podría estar de algún modo relacionada con la ingesta de altas cantidades de sal y al menos en alguna de las formas conocidas de hipertensión (86, 226). A primera vista, resulta paradójico explicar cómo un agente que aumenta la excreción renal de sodio puede aumentar la presión arterial, teniendo en cuenta que la excreción de iones es beneficiosa, porque se acompaña de pérdida de agua y el resultado de ambos hechos puede ser un descenso en la P.A. Pero la clave de este aparente dilema está en los mecanismos de acción que han sido propuestos para la hormona natriurética. Según hemos visto, se ha demostrado que inhibe el transporte de sodio en la piel de sapo y en la vejiga de la rana. Se ha sugerido que aumenta la excreción de sodio inhibiendo la resorción del mismo en el riñón, afectando a la bomba de sodio que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP, llevada a cabo por la enzima sodio, potasio, adenosintrifosfatasa (Na^+ , K^+ - ATP asa), la hormona natriurética actuaría inhibiendo a esta última enzima. Esta bomba de sodio está presente en todas las células del organismo. Por lo tanto, la H.N. actuaría no sólo en el riñón inhibiendo el transporte sodio-potasio y aumentando la concentración de sodio en la orina, sino también en otras células del cuerpo. En este sentido, se ha postulado una teoría tal que la H.N. inhibiría la acción del enzima Na^+ K^+ ATP asa, dificultando el intercambio sodio por potasio en las células, por ejemplo, del músculo liso de las arteriolas, aumentando la concentración de sodio intracelular, lo que inhibiría a su vez el intercambio sodio por calcio, aumentando la concentración intracelular de calcio, lo cual hace aumentar la tensión en el músculo liso, ya que le hace más susceptible a los agentes vasoconstrictores, aumentando su contractibilidad y por tanto, favorece el aumento de la P.A. (ver Fig. A.4.a.3.), (86, 230).

Dahl, Knudsen y Iwai (73) fueron los primeros en proponer que una sustancia circulante con capacidad de inducir aumentos en la excreción de sal, podría causar un aumento importante en la presión arterial en ratas hipertensas. Haddy y Overbeck (153) en 1976 en perros encuentran que la actividad de la bomba de sodio en las células de los vasos sanguíneos está inhibida sólo si la hipertensión va unida a determinadas situaciones de expansión de volumen sanguíneo y de bajas concentraciones de renina. Este tipo de hipertensión con concentraciones de renina bajas, supone un 25% del total de hipertensiones y una de las más difíciles de explicar. Este mismo autor encuentra en el plasma de ratas normales sometidas a expansión de volumen, la presencia de una sustancia capaz de inhibir el transporte de sodio en sus propias arterias. Estos hechos le llevan a postular que el tipo de hipertensión que ellos han estudiado está mediada por una hormona natriurética.

En ratas hipertensas de origen genético, ésta se debe a una anomalía en la función renal (29). Se ha demostrado que una rata normal que recibe el riñón de una hipertensa puede volverse también hipertensa (332). Se sabe que el fallo funcional en el riñón se debe principalmente a las dificultades que tiene en la excreción de sodio, lo que tendería a aumentar el volumen extracelular y esto último estimularía la secreción de la hormona natriurética (86, 131), y ésta aumentaría la excreción de sodio, pero a la vez, según la hipótesis mencionada (Fig. A.4.a.3.) produciría vasoconstricción en las arteriolas e hipertensión (86, 131, 226, 332). Hay abundante evidencia de la existencia en el plasma de estas ratas, de un buen número de alteraciones del transporte de sodio en eritrocitos, lo que sugiere que su sangre contiene un inhibidor circulante de la Na^+ - K^+ ATP asa.

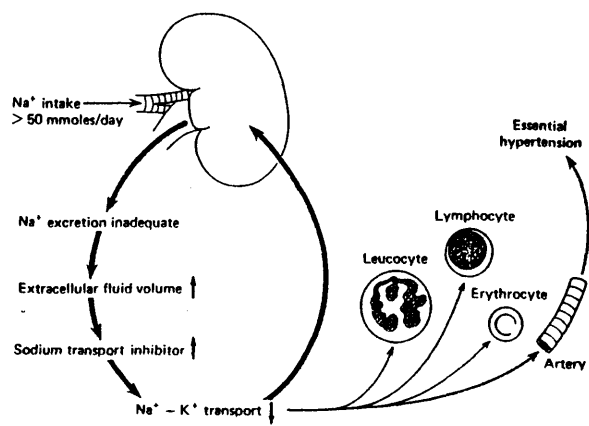


Fig. A.4.a.3.— Esquema de la hipótesis propuesta por De Wardener y Mc Gregor (86) acerca del posible papel de un inhibidor del transporte de sodio circulante en la etiología de la hipertensión arterial esencial.

En humanos con hipertensión esencial, De Wardener y Mac Gregor (86), muestran un empeoramiento del transporte de sodio en leucocitos, y concretamente el debido a la acción de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, sugieren que esto puede estar causado por un defecto genético en el manejo renal del sodio (86). Los resultados recientes de Poston y col. (276) también parecen apoyar esta hipótesis, la incubación de leucocitos de sujetos normotensos y con plasma de pacientes con hipertensión esencial, produce un empeoramiento en el transporte mediado por la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa en los leucocitos normales. Esto coincide con lo que previamente había encontrado en los leucocitos de personas con hipertensión esencial (276, 277) y concluye que en el plasma de estos últimos hay un inhibidor de esta última enzima. Alaghband-Zadeh y col. en 1981 (5, 6), han mostrado que un extracto muy purificado de la H.N. de bajo Pm, no sólo inhibe la acción de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, sino que aumenta la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PD); que concuerda con el hecho de que la ouabaina también estimula esta última enzima (226). También han encontrado que el plasma de personas normales puede estimular la G-6PD, y que esto está en relación con la ingesta de sodio. Sin embargo, el plasma de los hipertensos esenciales produce mayor activación de la G-6PD que el plasma de los normotensos (5, 6). Finalmente, no se puede decir concretamente cuál es la relación entre la H.N. y la presión arterial elevada, pero sí hay abundante evidencia de la contribución de la H.N. al desarrollo de algunas formas de hipertensión con bajo contenido de renina (35, 85, 275).

A.4.a.4. Papel de la hormona natriurética en la patogenia de la retención de sodio en la cirrosis y en la insuficiencia cardíaca.

Frecuentemente, los pacientes con enfermedad hepática avanzada presentan graves alteraciones de la función renal, con retenciones anormales de agua y de sal, presentando ascitis y edemas periféricos (206). También se observa una respuesta natriurética disminuida frente a sobrecargas de sal y expansiones del VEC (140), y en algunos casos el empeoramiento de la función renal puede llegar a un fracaso renal agudo (356). Aún no están totalmente definidos los mecanismos que median este empeoramiento en el manejo renal de sodio. Hasta hace poco un buen número de investigadores han apoyado el papel del hiperaldosteronismo en la retención de sodio en la cirrosis. Actualmente, hay bastante evidencia que relega el papel de este mecanismo y plantea que el hiperaldosteronismo jugaría un papel permisivo, mientras que, el factor predominante, que causaría este anormal manejo del sodio, parece ser la disminución del volumen de filtrado que sale del túbulo proximal y que llega al distal (104, 206, 342). La investigación de la mediación de distintas hormonas en estas alteraciones, ha llevado a que se postule la participación de una amplia gama de ellas (342). Entre las hormonas que se han sugerido está la hormona natriurética (101, 191). Esto lleva implícitamente la hipótesis de que la retención de sodio, en esta situación, es el resultado de un fallo en la elaboración de la H.N. En este sentido, en la cirrosis, la H.N. no debería ser liberada (101). Hay un buen número de trabajos que aportan atos respecto a la implicación de esta hormona, o mejor dicho a su ausencia. Denison y col. (80) y Wilkinson y col. (357) han estudiado a personas con cirrosis, libres clínicamente de ascitis, después de la administración de mineralocorticoides y han encontrado que algunos pacientes no presentan el fenómeno de "escape", a la retención de sodio inducida por estos últimos. Las fracciones de bajo Pm de la cromatografía en gel de la orina, producen natriuresis en ratas, si es de un paciente que presenta el fenómeno de escape y no la produce si la orina es de un paciente que no presenta ese fenómeno. Kramer y col. (193) planteó también posibilidad de que alteraciones en la presencia de la H.N. podían mediar la retención de sodio en la cirrosis, encontró que en el plasma de estos pacientes no había presencia de un factor de bajo Pm, que fuese antinatriurético y natriurético. Favre y col. (107), tampoco ha encontrado actividad natriurética en la orina de enfermos cirróticos. Recientemente, Naccarato y col. (247) ha logrado en pacientes cirróticos sin ascitis inducir una expansión del VEC, similar a la de un grupo control de personas sanas, observando que tanto la excreción absoluta como fraccional de sodio en los pacientes cirróticos

cos estaba disminuida con respecto a los controles; en la orina de los cirróticos no encontró tampoco actividad natriurética, mientras que en la de los controles sí. Sin embargo, el hecho de que los pacientes de Naccarato y col. (247) no presentasen otros signos de retención de sodio aparte de la falta de actividad natriurética en la orina, subraya la complejidad de las alteraciones en el manejo renal del sodio. Lógicamente, la patogenia de la retención de sodio precisa de la participación de diferentes efectores hormonales y/o nerviosos, actuando de modo concertado.

Igualmente, Kruck y col. (195) han demostrado que en la orina de pacientes con insuficiencia cardíaca y edema no encuentran una fracción de alto peso molecular que tenga actividad natriurética y/o antinatriurética. En estudios posteriores, las fracciones de orina de estos pacientes, después de una cromatografía en sephadex G 25, tampoco presentan actividad natriurética. Concluyen que este fallo en la producción de actividad natriurética endógena, puede, al menos en parte, ser responsable de la retención de sodio y la formación del edema.

A.4.a.5. Presencia de la hormona natriurética en condiciones normales y su relación con la ingesta de sodio.

Una de las investigaciones imprescindibles era estudiar la presencia de esta hormona en el plasma y en la orina de personas y de animales de experimentación en condiciones normales, e incluso en situaciones de deplección de sodio. Así, el grupo de De Wardener (84) han demostrado que de la orina de personas normales, procesada mediante dos métodos distintos, se obtienen dos sustancias natriuréticas. Una la aislan mediante cromatografía en sephadex G50, tiene un Pm elevado (≤ 30.000 daltones), esta sustancia tarda más o menos una hora en producir un efecto natriurético en la rata y su acción se prolonga aproximadamente unas dos horas. La otra sustancia se aísla en Sephadex G25, es de bajo Pm (≤ 3.000 daltones) produce natriuresis en la rata al poco de ser inyectada, el máximo de natriuresis lo alcanza a los 20 min., y dura una hora en total (67). Clarkson y col. (66) demostraron que esta sustancia tiene un Pm exactamente de alrededor de 500 daltones y está presente en la orina de personas normales y que su presencia está en relación directa con la ingesta de sodio. Aunque este mismo equipo ha logrado aislar ambas sustancias en la orina de personas que durante varios días han recibido una dieta sin sodio. Esto no lo pudo encontrar Favre y col. (108) en perros normales que no recibían sodio en la comida, y al parecer un motivo para la discrepancia entre estos resultados es que utilizaron un sistema de bioensayo menos sensible. En un trabajo posterior Favre ha aislado de eluidos de riñón de ratas normales hormona natriurética de bajo Pm, encontrando una correlación directa entre la actividad de esta última, y la ingesta de sodio de las ratas de las que se aísla (219). En otro tipo de estudio, Flier y col. (115) han encontrado en la sangre del sapo *Bufo marinus* un inhibidor de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ asa. Por otro lado, De Wardener demuestra que en el plasma de personas sanas hay una sustancia que inhibe a su vez la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ asa renal, para ello utiliza técnicas citoquímicas (84, 85). También han encontrado que la actividad inhibidora circulante es veinticinco veces mayor en el plasma recogido de personas sanas con dieta rica en sal, que en el plasma obtenido cuando estas mismas personas reciben dieta sin sal. Y concluyen que el control de la excreción de sodio en situaciones fisiológicas normales está mediado también por un factor natriurético circulante.

A.4.b. Naturaleza de la hormona natriurética.

A.4.b.1. Materiales biológicos de donde se ha podido aislar la hormona natriurética.

Al igual que el apartado anterior, las investigaciones sobre este tema se caracterizan por la utilización de una amplia variedad de protocolos experimentales para caracterización y aislamiento de esta sustancia. Fundamentalmente se ha intentado detectar la presencia de esta hormona en:

- 1) La linfa del conducto torácico (72).
- 2) En el plasma y en extractos de plasma (36, 56, 178, 184, 193).
- 3) En extractos de orina (37, 66, 108).

- 4) En homogeneizados y en eluidos de riñón (60, 107, 139, 219).
- 5) En el hígado (231, 320, 338, 339).
- 6) En extractos de hipotálamo, de hipófisis posterior, de corteza cerebral (69, 132, 157, 279,

287).

A.4.b.2. Bioensayos de actividad natriurética.

Al no existir una completa caracterización bioquímica de esta sustancia, la comprobación de la existencia de un factor natriurético se ha realizado mediante ensayo de sus propiedades biológicas. Esto ha dificultado la comparación de los resultados entre los distintos trabajos.

Actualmente, se están realizando pruebas de estandarización de los efectos biológicos de esta sustancia, en base a los de otras sustancias de propiedades similares (por ejemplo, la ouabaina) (52, 147, 214).

a) Efecto sobre la excreción urinaria de sodio.

Es el método más utilizado, las pruebas se suelen realizar sobre ratas o perros, se bioensaya mediante inyección intravenosa, en algunos casos en la aorta, antes de la bifurcación de las arterias renales (82, 194, 210). Los animales habitualmente están uninefrectomizados, para aumentar su sensibilidad al factor natriurético, ya que tienen disminuido el número de nefronas (36, 37, 79). Pero también se ha probado en animales urémicos (293) y cirróticos. Este método obliga a realizar múltiples pruebas y a utilizar material muy activo.

b) Efecto sobre el transporte de sodio en membranas epiteliales.

Se utiliza la piel de rana (*Rana pipiens*) y la vejiga urinaria del sapo (*Bufo marinus*), son epitelios parecidos funcionalmente al del túbulo distal de la nefrona de mamíferos (223); el transporte activo de sodio a este nivel genera una diferencia de potencial relativamente elevada, este transporte es estimulado por los mineralocorticoides y las hormonas neurohipofisarias, y según se ha demostrado la hormona natriurética inhibe este transporte (actividad antinatriurética). La valoración de la actividad de esta última se hace viendo el efecto sobre la diferencia de potencial y la corriente del corto-circuito, al añadir las muestras sobre el lado de la serosa del epitelio (223).

c) Efecto sobre la actividad del enzima $Na^+ - K^+ - ATP$ asa.

Esta enzima está presente en todas las células del organismo, y es conocido que el factor natriurético de bajo Pm inhibe la acción de este enzima, alterando el intercambio celular sodio-potasio, con lo cual impide el transporte renal de sodio, aumentando la concentración de sodio en la orina, además de otras consecuencias intracelulares que ya hemos mencionado (35, 85, 275). La enzima se ha aislado del riñón, del cerebro y en otros casos los estudios se han llevado a cabo directamente sobre leucocitos, eritrocitos, células de túbulos renales, células del músculo liso de las arteriolas.

d) Efecto sobre la actividad del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Recientemente se ha demostrado la capacidad de la HN de bajo Pm para estimular la actividad de este enzima, que también es un marcador de la actividad del transporte activo de sodio en las células (5, 6, 84, 226).

e) Competencia con la acción de otros inhibidores del transporte activo de sodio.

Gruber y col. (147) han demostrado que la HN que ellos aíslan posee una capacidad para competir con los anticuerpos antiglicósidos cardíacos, que son específicos para la ouabaina, sugiriendo una similitud de la HN con esta última. Recientemente Licht, Weiss y Bricker (214) han cuantificado la actividad de la HN, de bajo Pm, en "unidades de ouabaina" ya que hacen compe-

tir a ambas en la inhibición del transporte de Na^{22} en un cultivo de células de fibroblastos.

f) Efecto sobre el transporte renal de PAH.

El PAH es secretado activamente en la orina por los túbulos renales y este transporte se inhibe por la acción de inhibidores del transporte de sodio, como la ouabaina (76, 188). Luego esta prueba se basa en la acción de la HN de bajo Pm, como inhibidor del transporte de sodio, sobre el de PAH, utilizando cortes finos de corteza renal y PAH- H^3 (47). Esta técnica no se utiliza mucho en la actualidad.

g) Efecto sobre el transporte de sodio medido directamente en túbulos renales.

La actividad de esta hormona ha sido estudiada mediante técnicas de micropunción (352) y también túbulos aislados y perfundidos (59, 84, 109, 352), utilizando microelectrodos selectivos.

A.4.b.3. Metodología para el aislamiento de la hormona natriurética.

Al principio, la presencia de actividad natriurética se investigaba siguiendo alguno de los métodos mencionados, pero utilizando plasma, orina, enteros, o bien un eluido u homogeneizado de algún órgano, directamente. Buckalew y col. (53) en 1971 aislan del plasma de perro, después de una expansión salina del VEC, una sustancia dializable y ultrafiltrable, a través de membranas DIAFLO UM-05; esto indicaba que poseía un Pm ≤ 3.000 daltones. Esta sustancia era natriurética y antinatriurética. Paralelamente Bourgoignie y col. (36, 37) aislaron la HN del plasma y de la orina de personas y animales urémicos mediante cromatografía en columna en Sephadex G 25 fino, utilizaron como eluyente acetato de amonio 10 mM, pH = 6,8, y el proceso se llevó a cabo a 4 °C. De las cuatro fracciones en que dividen el proceso de aislamiento, la que aparece detrás del pico de las sales la denominan fracción IV, y corresponde a las moléculas de bajo Pm; ésta es la que produce la natriuresis en la rata y es antinatriurética en las membranas de anuros. Al dializar y ultrafiltrar esta fracción, en membranas similares a las de Buckalew, calcularon que su Pm era ≤ 1.000 daltones. A partir de este momento la técnica de aislamiento de la HN más empleada es la de cromatografía en columna. Para la HN de Pm bajo se ha utilizado entre otros Sephadex G 25 fino, G 10, y Biogel P-2; para la HN de Pm elevado se han empleado Sephadex G 50, G 75, G 100, G 200. La sustancia de Pm bajo aparece habitualmente detrás del pico de las sales principales, medidas estas últimas por su concentración de electrolitos y la osmolaridad. Buckalew (56), utilizando sephadex G 10 y como eluyente CIH 0,1 M logró que la actividad natriurética apareciera antes que el pico de las sales, evitando así el fenómeno de adherencia al Sephadex y que le hace retrasar su elución por detrás de su Pm. Entre los eluyentes utilizados están también el TRIS-CIH 10 mM, pH = 7,2 ó 7,4, y el ácido acético 100 mM, pH = 3.

Buckalew en 1978 (146) empleó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC); previamente el plasma lo fraccionó en una columna de Biogel P-2, ácido acético 100 mM, la fracción IV, que eluye después del pico de las sales la resuspendió en CIH 50 mM y la fracciona en una columna de HPLC de Partisil SCX (intercambio catiónico), alcuotas recogidas en el volumen de exclusión, las hizo reaccionar con fluorescamina específica para los grupos amino, pH = 7; así la máxima fluorescencia la presentaron los péptidos fluorados y la mínima los aminoácidos fluorados; los péptidos fluorados separados en varios picos mediante una cromatografía de fase inversa (Lichrosorb - ODS); los dos primeros picos que emergen presentan actividad antinatriurética (Pm ≤ 500 daltones), correlacionando el tamaño de los picos con la mayor o menor actividad biológica. Esta misma técnica ha sido utilizada recientemente por otros grupos de investigadores (52).

La sustancia de Pm elevado ha sido aislada del plasma y de la orina (67, 84) y eluye, según el tipo de gel utilizado, previamente al pico de las sales principales (Pm ≤ 3.000). Recientemente, Veress y col. (345) ha realizado el aislamiento en Sephadex G 200, aislando una molécula de mediano Pm con actividad natriurética, que tras fraccionarla de nuevo en Sephadex G 25, la actividad

natriurética aparece después del pico de las sales. Sugiriendo como Buckalew (52, 146) que tanto la HN de alto como de bajo Pm son una misma molécula, y que se pueden convertir una en la otra por medio de una degradación enzimática.

A.4.b.4. Características físico-químicas de la hormona natriurética.

La caracterización se ha llevado a cabo principalmente en la H.N. de Pm bajo (≤ 500 daltones). El factor de este tipo aislado de las muestras de orina, por los grupos de Bricker y Bourgoignie (37) y de De Wardener (84) parece tener características similares, la actividad natriurética del mismo es relativamente resistente al calentamiento, a aumentos y disminuciones en el pH del medio, a la oxidación con ácido nitroso, insoluble en soluciones orgánicas poco polares y se destruye por la acción de la prolidasa. En uno de sus últimos trabajos Clarkson y col. (66, 67) han llevado a cabo un estudio exhaustivo sobre esta sustancia, y sus resultados se pueden resumir:

1) La sustancia natriurética, obtenida de la orina, que eluye detrás del pico de las sales, F IV, es ultrafiltrable a través de una membrana de tamaño de poro de 500 daltones (AMICON UM 05).

2) Es soluble en un buen número de solventes orgánicos polares.

3) Es totalmente soluble en acetona al 95%, y su actividad natriurética en esta solución se duplica.

4) Relativamente resistente al calentamiento a 100 °C, 1 h., pH = 10, y al calentamiento a 110 °C, en ácido ClH 6 N, durante 90 h. y en condiciones anerobias y al tratamiento con ácido nitroso. Es menos resistente a estos procesos si ha sido extraída en acetona al 95%.

5) No se destruye su actividad natriurética (AN) con tripsina, quimotripsina, pronasa, pepsina, leucinaminopeptidasa, y subtilisina. Después de la extracción en acetona al 95%, tampoco se destruye su AN con pepsina, leucinaminopeptidasa, subtilisina, carboxipeptidasa A y B, aminopeptidasa M, monoaminooxidasa, arilsulfatasa y β -glucuronidasa. La F IV extraída en acetona al 95% pierde totalmente su AN por incubación con prolidasa.

6) El retraso que sufre la sustancia natriurética en la cromatografía en columna en gel de Sephadex G 25 ha hecho pensar que podría poseer un grupo aromático o heterociclo. De la pérdida de AN mediante tratamiento de F IV con ácido nitroso, se podría pensar que depende de un grupo amino, amido, imino o imido o de una estructura en anillo que sea susceptible de oxidarse por ese ácido. Así, Clarkson, teniendo en cuenta estos hechos, su solubilidad en isobutanol y unido a su pequeño Pm, postuló que ese retraso podía deberse a la presencia en su molécula de una amina aromática.

7) De estos experimentos plantea que la HN puede ser un pequeño péptido, que contiene un aminoácido heterocíclico (p.e. prolina). En este sentido, Kramer ha planteado recientemente que es un péptido acídico. Sin embargo el grupo de Bricker no ha logrado aún analizar su posible composición de aminoácidos, y Buckalew plantea su semejanza con los glucósidos cardíacos.

A.4.b.5. Propiedades biológicas de la hormona natriurética.

Un breve resumen de las mismas es el siguiente:

1) La sustancia de bajo Pm produce un efecto natriurético inmediatamente después de ser administrada por vía intravenosa en un animal de experimentación y su acción dura más o menos una hora (36, 37, 109).

2) La sustancia de Pm elevado tarda un tiempo (aproximadamente de 20 a 60 min.) en producir su efecto natriurético al ser inyectada en el animal prueba (67).

3) El factor de bajo Pm inhibe la acción de la enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-asa}$ no sólo en las células del riñón, sino en otros tejidos epiteliales (84), esto hace que aumente el contenido intracelular de sodio, junto al de otros cationes como el Ca^{++} , apoyando la tesis de que su lugar de acción es sobre el transporte de sodio en la superficie de las células epiteliales.

4) Esta última sustancia es activa cuando se añade en la vejiga urinaria del sapo y en la piel de la rana en el lado de la superficie epitelial, que está en contacto con la sangre (serosa) (84).

5) Inhibe la oxidación del piruvato en asociación con la inhibición del transporte de sodio (36).

6) Inhibe también el transporte de sodio en el túbulo proximal de la rata, hecho comprobado mediante técnicas de micropunción (352).

7) Produce un efecto fosfatúrico (36, 37, 219).

8) Su acción sobre la excreción de sodio a veces se suele acompañar de aumentos en el volumen urinario (219) y en la excreción de potasio.

9) La sustancia de bajo Pm inhibe el transporte de ácido p-aminohipúrico en cortes de corteza renal (36, 47).

10) Esta misma sustancia aumenta la actividad del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, en las células sanguíneas de personas sanas (5, 6, 84, 226).

11) También inhibe el transporte de sodio en los tubos colectores aislados y perfundidos de conejo (109), sugiriéndose que el lugar de acción de la HN de bajo Pm in vivo, puede ser precisamente estos tubos colectores.

12) La sustancia de bajo Pm, por sus características químicas y biológicas difiere de las prostaglandinas, vasopresina, calcitrinas, hormona paratiroidea y de la angiotensina (212).

A.4.c. Posibles lugares de secreción de esta hormona.

El lugar exacto en donde se puede secretar esta hormona aún no se conoce. Se han propuesto como posibles lugares: el cerebro, el riñón y el hígado, principalmente.

A.4.c.1. Origen cerebral.

En experiencias de circulación cruzada, al objeto de estudiar la presencia de la HN circulante en la expansión del VEC, no puede impedirse la respuesta natriurética del riñón aislado o del animal de experimentación, mediante la realización en el animal "donante", de una nefrectomía bilateral, adrenalectomía o hipofisectomía (177, 202). Sin embargo, Lichardus y col. (209) encuentra que en ratas hipofisectomizadas no hay respuesta natriurética a la expansión del VEC como en los normales, sugiriendo que la diferencia pudiera deberse a factores humorales extrarrenales de origen hipofisario, que actuarían en los mecanismos hemodinámicos que median en la excreción de sodio.

En este sentido, hay una serie de investigadores que demuestran que en determinadas experiencias la actividad natriurética sólo se puede aislar de la sangre que proviene del cerebro (por ejemplo, de vena yugular interna). Cort en 1968 (69) y Buckalew en 1970 (55) han observado que después de una expansión del VEC con salino, encuentran más actividad natriurética en la sangre de la vena yugular que en una periférica. Kaloyanides y col. (176) no obtuvieron respuesta natriurética en un riñón aislado y perfundido con sangre de otro perro, que previamente había sido decapitado, aunque a este último se le realizaba una expansión del VEC, y se le mantenían dentro de la normalidad la PA, el FSR y la FG. Otro tipo de estudios han demostrado la presencia de AN en extractos de hipotálamo y de neurohipófisis (132, 157, 279, 287). Otros autores han logrado aislar de hipotálamo bovino o de cerebro de rata una sustancia de pequeño Pm (≤ 2.000); ésta inhibe la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ asa, y compite con los lugares de unión de la ouabaina (112, 211). Clarkson y De Wardener (84) también han logrado aislar una sustancia de este tipo, de los mismos sitios y añaden que la capacidad de inhibir la acción de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ asa de la sustancia aislada de la corteza cerebral de rata se destruye por calentamiento y por incubación con subtilisina, mientras que la obtenida de hipotálamo no. También la fisiología comparada revela que hay sustancias neurosecretoras que pueden influir en la excreción de sodio en insectos (224), en te-

leósteos (27), y en anfibios (63).

A. 4. c. 2. Origen renal.

Otro grupo de investigadores postula que es el propio riñón el encargado de secretar la HN. Así Gonick y col. (139) han encontrado en homogeneizados de riñón de rata, en expansión del VEC, una fracción de bajo Pm, que inhibe la acción del enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-asa}$ y a su vez es natriurética en ratas, la acción biológica parece ser dosis-dependiente. Sin embargo, en trabajos posteriores estos mismos investigadores aislan esa misma sustancia del plasma, no pudiendo aclarar si es o no de origen renal o que se encuentra en gran concentración en este órgano (138). Favre y col. (107, 219, 220) también aislaron de eluidos de riñón de rata, que recibieron un gran contenido de sodio en la ingesta, una HN del tipo mencionado por Gonick, encontrando además correlación positiva entre actividad natriurética y la excreción de sodio de la rata en los días previos a quitarle el riñón. Favre, en un trabajo reciente, encuentra que la rata con síndrome nefrótico no produce HN en sus riñones cuando se le induce una expansión de VEC, pero responde con natriuresis si se le inyecta i.v. HN aislada de otra rata, y entonces, sí se logra aislar HN de sus riñones, por lo que plantean que la HN no parece tener origen renal. Desde hace bastante años Godon y col. (60, 135) han aislado una HN de alto Pm (≤ 45.000) de riñones de rata con expansión de VEC y que está ausente en ratas con glomerulonefritis (135). Esta sustancia produce natriuresis en un riñón aislado de rata, aún si este último se trata con Indometacina, ahora si a la rata, de la cual se obtiene la HN, se la trata con Indometacina, no logran aislar este factor. Estos autores sugieren que las prostaglandinas son necesarias para la biosíntesis de la HN, aunque no para su actuación (136).

A. 4. c. 3. Origen hepático.

Según se ha comentado, hay una gran evidencia de que en la enfermedad hepática, que va asociada a retenciones de agua y sal, la actividad natriurética está ausente del plasma y de la orina de estos pacientes (101, 107, 191). Esto ha llevado a postular que el hígado podría ser un lugar de síntesis y/o activación de esta hormona, y que la disfunción hepática conllevaría el empeoramiento de dicha síntesis o activación, lo que haría explicable la retención de sodio y de fluido concomitante (75, 325). Por otro lado, según comentamos en el apartado A.3.c. de esta INTRODUCCION, hay también una serie de resultados que apoyan el papel del hígado dentro de los mecanismos de regulación del volumen extracelular. Así, Daly y col. (75) y Strandhoy y col. (325) encuentran que la infusión de Cl Na hipertónico en la vena porta produce mayor respuesta natriurética, que la misma infusión en la vena femoral. Resultados similares encuentra Perlmut (268, 270) y otros autores (61, 62, 200, 201, 243) en ratas, tras la infusión en este caso de salino isotónico. Dichos autores plantean que el hígado puede participar en esta regulación de la excreción de sodio, mediante la liberación de un factor humoral, de posible origen hepático, el cual puede ser liberado frente a cambios en la concentración de electrolitos de la sangre portal (75, 201, 268, 325). Este planteamiento viene en parte a apoyar lo encontrado hace tiempo por Milies, que aisló y purificó parcialmente a partir de concentrados de hígado perfundido de perro, una α -2-globulina, que produce natriuresis al ser administrada i.v. en perros (231). Por otro lado Stahl en 1967 (320) encontró en la sangre que sale del hígado, después de una expansión del VEC, mayor actividad natriurética y diurética, que en sangre periférica. Wolfman ha descrito menor respuesta natriurética a la expansión salina del VEC, en perros a los que se les excluye el hígado de la circulación (364), resultados similares se han descrito en animales hepatectomizados (269, 270).

En otro tipo de experiencias Uranga ha aislado un factor de origen hepático del plasma del sapo Bufo arenarum, después de una expansión del VEC, que parece ser responsable de los aumentos que observa en la FG y en la presión glomerular (338, 339). Esta investigadora postula que una expansión del volumen de plasma produce un aumento en el flujo hepático y esto aumenta la libera-

ción de una sustancia —glomerulopresina (GPS)— que puede ser la responsable de los aumentos en el índice de presión glomerular (GPI). Posteriormente, Uranga y col. (339, 341) ha caracterizado esta sustancia, que es ultrafiltrable con membranas DIAFLO de tamaño de poro UM 05, calculándose un $P_m \leq 500$ daltones; es termoestable, es estable en un amplio rango de pH (entre 2,2 y 8,8), resiste la digestión con pronasa y tripsina. También lograron aislar glomerulopresina de un sistema de hígado perfundido y aislado, sugiriendo que está presente en condiciones normales y que se libera en mayor cantidad cuando aumenta el VEC (337). En trabajos posteriores, lograron aislar GPS ultrafiltrados de sangre de la vena suprahepática de conejos con expansión del VEC, asimismo la producción de glomerulopresina aumenta en perros pancreatectomizados, y se inhibe por infusión de insulina y se estimula con la administración de glucagón (341). La infusión i.v. de GPS en ratas y en perros produce aumentos en la FG, que no conllevan cambios en la PA y que se asocian a una vasodilatación en la arteriola aferente (337).

De acuerdo con lo que se conoce de esta sustancia, se cree que no es péptido, si los ultrafiltrados de plasma de la vena hepática se hidrolizan con β -glucuronidasa se produce una pérdida completa de la actividad de la GPS, si la acción de la β -glucuronidasa se inhibe, entonces la actividad de la glomerulopresina no se altera. Estos hechos les permiten sugerir que es un conjugado del ácido glucurónico (117). Por otro lado, esta sustancia parece aumentar la tensión de contracción en fibras de fundus de estómago, de duodeno y de vejiga urinaria de rata. Y esta acción sólo puede bloquearse mediante la administración de la Indometacina, ello les permite sugerir que la acción de la GPS está mediada por las prostaglandinas (340). En un trabajo posterior en perros, demuestran que los aumentos de la filtración glomerular inducidos por la administración de glucagón, pueden deberse a la mediación de la GPS (341). La capacidad de la GPS para actuar sobre la FG se ha puesto también de manifiesto al i fundir GPS en ratas, con anuria de veinticuatro horas por fracaso renal agudo, observándose que se restablece la FG y el flujo urinario (117).

B. OBJETIVOS

1. El volumen y la composición de los fluidos del espacio extracelular y de sus compartimentos principales están estrechamente regulados en el organismo, frente a una amplia variedad de posibles alteraciones entre ellas las debidas a la ingesta. Siempre que la presión osmótica de los fluidos corporales se mantenga constante, por medio de la regulación del balance de agua, el control del volumen extracelular se realiza básicamente mediante la regulación de la excreción renal de sodio (303).

El SGI es la única ruta, en condiciones fisiológicas, de entrada de líquidos y de solutos en el organismo. Dentro de este sistema, el hígado posee una situación circulatoria estratégica, ya que todo el flujo esplénico es conducido por medio de la vena porta hacia el interior del mismo, antes de regresar al corazón. Si tenemos presentes las variaciones diarias de la ingesta, sin contar con situaciones anormales, a sangre que drena el SGI presentará al menos transitoriamente, alteraciones importantes, en la osmolaridad y en la composición de electrolitos, lo que nos permite plantear el papel ideal del hígado para detectar y analizar posibles cambios, antes de que la información acerca de ellos llegue a los receptores centrales, actuando como un receptor avanzado en la frontera entre los espacios enteros y parenterales del organismo y contribuyendo así a la regulación renal de la excreción de sodio y por tanto de la regulación homeostática del VEC (303).

De acuerdo con lo expuesto, el objetivo general de esta tesis es investigar el papel del hígado dentro de la regulación general del VEC y, concretamente, en la regulación renal de la excreción de sodio, esta última como mecanismo básico de control de dicho volumen (291).

2. En la literatura existe una evidencia relativa de la existencia de un número variado de funciones sensoras hepáticas y de la presencia en el territorio vascular porta-hepático de receptores sensibles a cambios en la osmolaridad, concentración de distintas sustancias (azúcares, electrolitos) de presión, etc. que parecen jugar un papel en la modulación de la excreción renal de agua y de sal (291).

El primer objetivo de esta tesis ha sido el estudiar si el territorio porta-hepático tiene la capacidad de detectar cambios en la concentración de electrolitos en la sangre portal (producidos experimentalmente mediante la infusión intraportal de pequeñas cantidades de cloruro sódico hipertónico) y responder a dichos cambios induciendo una respuesta renal distinta a la que se produciría si dicha infusión se realizara en una vena periférica cualquiera.

Profundizando en este punto, el segundo objetivo fue el estudio de la especificidad iónica de esta respuesta, iterando experimentalmente las concentraciones intraportales de sodio y cloro independientemente, mediante la infusión de soluciones hipertónicas que contengan uno sólo de estos electrolitos.

El tercer objetivo es doble, por un lado analizar la capacidad del hígado de detectar los cambios de presión osmótica, sin cambios en la composición electrolítica de la sangre porta (inducidos experimentalmente mediante la infusión intraportal de soluciones hiperosmóticas sin electrolitos) y de responder a dichos cambios induciendo una respuesta renal distinta a la producida cuando dicha infusión se realiza en una vena periférica. Por otro lado, se plantea analizar si la mencionada respuesta renal es similar a la observada cuando se infunden soluciones isoosmóticas de electrolitos.

3. Una vez estudiado si el hígado puede de algún modo modular la respuesta renal frente a los cambios en la composición del plasma que le llega por la vena porta, con objeto de llevar a cabo un papel dentro de la homeostasis del VEC, el siguiente objetivo que nos hemos planteado ha sido ver qué tipo de mecanismos pueden estar implicados en esta relación funcional hígado-riñón. En la literatura que se ha revisado en la Introducción, hay propuestos diversos mecanismos para esta relación (nervios, humoral, o ambos conjuntamente). Diversos autores han propuesto la mediación de un factor humoral, de características no delimitadas y de posible origen hepático, en la respuesta natriurética específica que observaron al infundir una solución hiperosmolar en la vena porta (75, 268, 291, 325)

Por ello, el cuarto objetivo es estudiar la presencia de actividad natriurética, en plasma, obtenido directamente del efluente hepático y sistémico, y en orina, que se pueda correlacionar con los aumentos específicos en la excreción de sodio, como consecuencia de infundir ClNa hiperosmolar en la porta.

Por otro lado la regulación de la excreción renal de sodio está mediada al menos en parte por la acción de un agente humoral, que se excreta y/o activa en situaciones de aumento del VEC. Diversos autores han demostrado la presencia en plasma y en orina de un factor natriurético de bajo Pm, aislable mediante cromatografía en Sephadex G 25, en situaciones como la uremia crónica y en respuesta a sobrecargas salinas unidas a mineralocorticoides y sin embargo no se han encontrado en estados de retención de sodio, como en la cirrosis hepática con presencia de edema.

Por ello el quinto objetivo es múltiple: a) la caracterización parcial de algunas propiedades físicoquímicas de la substancia con actividad natriurética. b) investigar su presencia en la orina y en el plasma y correlacionarla con la respuesta natriurética a la infusión de distintas soluciones y c) estudiar si sus características físicoquímicas coinciden con las descritas por otros autores para una substancia natriurética presente en situaciones de alta excreción fraccional de sodio (uremia crónica; expansión salina más mineralocorticoides) (36, 84, 108).

El sexto objetivo ha sido el estudio del posible origen hepático de dicha substancia, estudiando su mayor presencia en la sangre que sale del hígado respecto a la de la circulación periférica.

C. METODOS

C.1. Experiencias de aclaramiento o depuración renal.

La idea de comparar simultáneamente las concentraciones de una sustancia determinada en sangre y en orina como un índice de la función renal, fué introducida primeramente por Gréhan en 1904 (145). Sin embargo, la formulación actual del aclaramiento fue sugerida en primer lugar por Thomas Addis (3), y el término de "aclaramiento" por el grupo de Van Slyke en 1929 (236). Posteriormente, fueron Homer Smith y sus colaboradores (315, 316) los que desarrollaron todas las posibilidades de los métodos de aclaramiento para evaluar la función renal.

C.1.a. Concepto de aclaramiento urinario.

Es el volumen de plasma por unidad de tiempo, que es limpiado, aclarado o depurado totalmente de una cantidad de una sustancia dada, que se excreta en la orina (42, 315). Es una medida empírica de la capacidad del riñón para excretar dicha sustancia en un tiempo determinado (42). Se puede expresar mediante el siguiente esquema:

$$C_x = \frac{O_x \cdot \dot{V}_u}{P_x} \quad (\text{C.1.a.1})$$

donde:

- O_x = concentración de una sustancia x en orina (mg./ml.)
- P_x = " " " " " x "plasma (mg./ml.)
- \dot{V}_u = diuresis (ml./min.) = volumen urinario.
- C_x = "Clearance" = aclaramiento, símbolo empleado tradicionalmente en fisiología renal.

Luego el concepto de aclaramiento se define por unidad de tiempo, p.e. en ml./min.

C.1.b. Medida de la función renal: Tasa de filtración glomerular.

La determinación de la tasa de filtración glomerular (FG) aporta una medida cuantitativa, no sólo de un hecho inicial en el proceso de excreción renal, sino también del alcance de la resorción y de la secreción de las distintas sustancias en los túbulos renales. La información con respecto a la resorción y secreción nos viene dada por la diferencia entre la tasa de filtración de una sustancia, a través de las paredes de los capilares glomerulares, y la tasa con la que aparece esta sustancia en la orina final. Así, puede decirse que hay resorción neta de una sustancia por los túbulos, si la tasa de excreción de dicha sustancia es menor que su tasa de filtración, y se puede considerar que hay secreción de una sustancia, si la tasa de excreción es mayor que la tasa de filtración de la sustancia. Luego es necesario conocer la tasa con la que son filtradas las distintas sustancias en el glomérulo para una comprensión cuantitativa de la función excretora renal (42). Si una sustancia reúne las condiciones siguientes:

- 1) Ser libremente filtrada a través de las paredes de los capilares glomerulares, es decir, que su tamaño no sea tan elevado que le impida atravesar las membranas, y que no esté unida a las proteínas plasmáticas.
 - 2) Que no se altere, ni cambie y que sea biológicamente inerte.
 - 3) Que no se resorba, ni secrete en los túbulos renales.
- Su tasa de excreción es igual a su tasa de filtración y se puede decir que:

$$O_x \cdot \dot{V}_u = FG \cdot P_x \quad (C.1.b.1)$$

donde, $C_x = FG \quad (C.1.b.2)$

Es importante tener en cuenta que la tasa de excreción de una sustancia no tiene que ser lo mismo que el aclaramiento de dicha sustancia, según se observa en la definición de excreción (cf. C.1.b.2.). La tasa de excreción de una sustancia x, que tiene las propiedades de ser libremente filtrada, que no es secretada, ni resorbida, variará en proporción directa a la concentración de x en el plasma, es decir P_x . Mientras que, el aclaramiento de una sustancia x (cf. fórm. C.1.a.1), será independiente de los valores de P_x .

C.1.b.1. Aclaramiento de inulina.

La inulina es una polifruetosa ($P_m \cong 5.200$, con 32 moléculas de hexosas), que se utilizó por primera vez en 1934 (286, 307) en técnicas de aclaramiento renal, como medida de la filtración glomerular. Actualmente hay numerosas pruebas que demuestran claramente que la inulina cumple las condiciones expuestas anteriormente, de tal modo que se puede considerar que su aclaramiento renal nos da una idea de la tasa de filtración glomerular (fig. C.1.b.1).

Es decir:

$$C_{In} = \frac{O_{In} \cdot \dot{V}_u}{P_{In}} \quad (C.1.b.3)$$

donde,

$$\begin{aligned} P_{In} &= \text{Concentración de inulina en plasma (mg./ml.)} \\ O_{In} &= \text{" " " " orina (mg./ml.)} \end{aligned}$$

En un hombre adulto de peso medio -70 kg.- el aclaramiento de inulina y por tanto su tasa de filtración glomerular media es de alrededor de 130 ml./min. Si el aclaramiento de inulina es de 100 ml./min, esto indica que 100 ml. de plasma total serían limpiados, teóricamente, de inulina por minuto; ahora bien, la inulina se distribuye sólo en la fracción del plasma ocupada por el agua y las moléculas de solutos de pequeño peso molecular, es decir, hay que excluir la fracción ocupada por las proteínas y los lípidos, y esta última fase es aproximadamente 6 de los 100 ml. del plasma total. Luego la concentración de solutos x, libremente filtrables, en el plasma P_x será menor que la concentración de solutos x, que hay en el plasma ultrafiltrado (P_{ux}) (42), lo cual se indica en la siguiente relación:

$$P_x = k \cdot P_{ux}$$

donde,

$$k = \frac{\text{Volumen acuoso del plasma}}{\text{Volumen total del plasma}}$$

Luego, si la fracción de lípidos y de proteínas en el plasma es del 6% del total, el volumen acuoso será de 94 ml.:

$$k = \frac{94}{100} = 0,94, \quad k \text{ siempre es menor de } 1.$$

Entonces el verdadero valor de la tasa de filtración glomerular será de:

$$FG = 0,94 \cdot C_{In}$$

C.1.b.2. Técnica de infusión constante.

El aclaramiento renal, usualmente se mide manteniendo una concentración constante en el plasma de la sustancia de referencia. Consideraciones técnicas y la evidencia experimental indican que la técnica de infusión constante es un método más exacto que los que se basan en la disminución de la concentración plasmática de esa sustancia, después de una sola inyección de la misma (315).

En la práctica, para medir, por ejemplo, la tasa de filtración glomerular mediante el aclaramiento de inulina, se inyecta i.v. y de forma continuada, una solución isotónica que contenga inulina, hasta que la concentración plasmática de la misma alcance un estado estacionario. En este momento, se recogen muestras de orina durante un tiempo determinado (para medir dos parámetros: el flujo urinario y la concentración de inulina en orina), y a la mitad de cada uno de los períodos se toman muestras de sangre, preferentemente arterial, y en ellas se mide la concentración de inulina en plasma.

C.1.c. Variación del Flujo Plasmático Renal.

Los métodos directos para medir el flujo plasmático renal (FPR) son muy variados (25) y muchos de ellos consisten en la canulación de la vena renal. También se pueden utilizar microesferas radioactivas, o bien la flujometría electromagnética, mediante un flujómetro colocado en la arteria renal (187) que nos dará el valor del flujo sanguíneo renal (FSR), cuya formulación es: $FSR = FPR / (1 - \text{hematócrito})$. La técnica empleada más frecuentemente para valorar el FPR, es el aclaramiento del ácido paraaminohipúrico (PAH). El empleo de esta técnica está basado en el principio de Fick (42, 315). En unas condiciones de función renal normal, si la sustancia utilizada no es sintetizada, metabolizada, ni almacenada en el riñón, su tasa de aparición en la orina es igual a la diferencia de concentración entre la arteria y la vena renales, multiplicada por el FPR; en este sentido se puede escribir:

$$O_s \cdot \dot{V}_u = (A_s - V_s) \cdot FPR \quad (C.1.c.1)$$

donde,

- O_s = Concentración de la sustancia (s) en la orina (mg./ml.)
- A_s = Concentración de s en la arteria renal (mg./ml.)
- V_s = Concentración de s en la vena renal (mg./ml.)

En la práctica, es conveniente elegir una sustancia que sea completamente extraída de la sangre, en un paso por el riñón, y así la ecuación de Fick puede reducirse a:

$$FPR = \frac{V_s \cdot \dot{V}_u}{A_s - O_s} \quad (C.1.c.2)$$

C.1.c.1. Fracción de extracción. Concepto.

La fracción de extracción (E_s) de los solutos renales, se calcula normalmente como una razón entre las diferencias de las concentraciones de dichos solutos en la sangre arterial y en la vena renal (21, 42).

Por definición:

$$E_s = \frac{A_s - V_s}{A_s} \times 100, \text{ que recalculando (21, 42) nos da, que}$$

$$E_s = \frac{A_s - V_s (1 - V_u/Fa)}{A_s} \times 100, \quad (C.1.c.3)$$

donde,

Fa = Flujo arterial renal (ml./min.).

Fv = Flujo venoso renal (ml./min.).

Hay ciertas condiciones que pueden introducir errores en el cálculo de la fracción de extracción y estas son: 1) Una tasa de extracción de la sustancia que sea muy baja. 2) Y que esta última se acompañe de una gran eliminación de líquidos por el riñón, por vía no venosa, es decir, por la orina y el drenaje linfático. Este último no se incluye en los cálculos, ya que en condiciones fisiológicas se acepta que su drenaje es el 1% del Flujo Plasmático total. Las tasas de extracción bajas están relacionadas con sustancias que no son secretadas por la nefrona (p.e. inulina). El PAH es una sustancia filtrada y secretada activamente por el riñón y puede tener una tasa de extracción del 80% (75% en perros a 90% en el hombre) y esta tasa puede variar por las concentraciones en el plasma de PAH, de tal forma que si se sobrepasa una concentración determinada disminuye E_s .

Dada la fracción de extracción de una sustancia que sea filtrada y secretada totalmente y no almacenada ni sintetizada y conocido simultáneamente el valor de su aclaramiento, se puede calcular el volumen total de plasma que perfunde el riñón:

$$FPR = \frac{O_s \cdot V_o}{A_s / E_s} \quad (C.1.c.4)$$

En el caso del PAH, su fracción de extracción es aproximadamente igual a uno, entonces el C_{PAH} tiende a representar una medida del FPR efectivo.

C.1.c.2. Fracción de filtración.

Se denomina así a la razón que hay entre la tasa de filtración glomerular, valorada mediante el aclaramiento de Inulina, y el flujo plasmático renal, valorado mediante el aclaramiento del ácido p-aminohipúrico (PAH) (42).

$$FF = \frac{C_{In}}{C_{PAH}} \times 100 \quad (\%)$$

C.1.d. Aclaramiento osmolar y aclaramiento de agua libre.

El volumen urinario (ml./min.) se puede considerar formado por dos fracciones: a) Una correspondiente a la fracción de orina que tendría una osmolaridad igual a la del plasma, a esta fracción se refiere el aclaramiento osmolar (Cosm). b) Una segunda fracción que es la diferencia entre el flujo urinario y el Cosm, que es el llamado aclaramiento de agua libre (C_{H_2O}), que no lo es en el término usual, sino que se refiere al volumen del fluido tubular que es limpiado o aclarado de solutos (158, 315). Durante la formación de orina diluida (orina hipotónica) (fig. C.1.d.1.) el aclaramiento de agua libre es positivo; el aclaramiento es igual a cero si la orina es isotónica con el plasma y es negativo si se forma una orina hipertónica con respecto al plasma.

El aclaramiento osmolar se calculó como la cantidad de m Osm / kg. de agua excretados por minuto: $U_{Osm} V$, dividido por la de m Osm / kg. de agua que hay en el plasma:

$$C_{Osm} = \frac{\text{osmolaridad en orina} \times \text{flujo urinario}}{\text{osmolaridad en plasma}} = \text{ml./min.} \quad (C.1.d.1)$$

$$C_{H_2O} = \text{Flujo urinario} - C_{Osm} \quad (C.1.d.2)$$

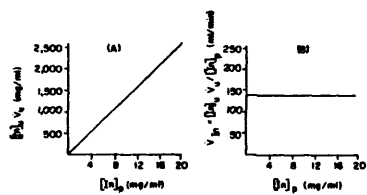
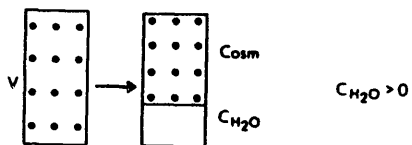


Fig. C.1.b.1.— Relaciones entre la tasa de excreción (A) y el aclaramiento de inulina (B), respectivamente, con la concentración de inulina en plasma (Tomado de ref. 188).

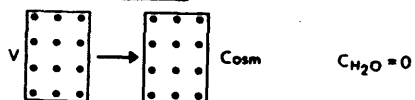
OSMOLAR AND FREE WATER CLEARANCES

• • • • •
 • • • • • = PLASMA OSMOLALITY
 • • • • •

HYPOTONIC URINE



ISOTONIC URINE



HYPERTONIC URINE

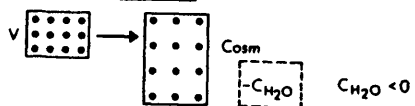


Fig. C.1.d.1.— Representación esquemática de los conceptos de aclaramiento osmolar y aclaramiento de agua libre: División de la orina hipo, iso e hipertónica con respecto al plasma, en los dos componentes C_{osm} y C_{H_2O} . (Tomado de ref. 158).

C.1.e. Experiencias de aclaramiento corto en perros y en ratas.

C.1.e.1. El estudio de la función renal en perros.

Se realizó mediante técnicas de aclaramiento renal de inulina (In) y de ácido p-aminohipúrico (PAH), como medida de la tasa de filtración glomerular (FG) y del flujo plasmático renal (FPR), respectivamente. Los aclaramientos de inulina y de ácido p-aminohipúrico se comenzaron con la infusión de unas soluciones iniciales de cada una de estas sustancias disueltas en salino 150 mM, con objeto de alcanzar una concentración óptima en plasma de 1 mg./ml. y de 0,1 a 0,15 mg./ml.; respectivamente. Seguidamente el aclaramiento continuó con la infusión constante, durante toda la experiencia, de otras soluciones de estas mismas sustancias para mantener estas concentraciones óptimas, estas últimas soluciones se calcularon de acuerdo con los aclaramientos teóricos de In y de PAH estimados para cada perro en función de su peso. Las soluciones de mantenimiento se infundieron mediante una bomba Braun-Melsungen, de infusión continua (Mod. Unita I) a una velocidad de 0,5 ml./min., durante toda la experiencia.

Una vez finalizada la cirugía se tomó una muestra de sangre, que se consideró como "blanco" en los análisis posteriores. Seguidamente se comenzaron las técnicas de aclaramiento, dejando transcurrir un tiempo mínimo de 60 min., para la estabilización del animal antes de comenzar la recogida de orina. Seguidamente se realizaron tres períodos de aclaramiento control de 20 min. cada uno, y a continuación se comenzaron los períodos experimentales. La orina se recogió en probetas graduadas, y se tomaron muestras de sangre con jeringas heparinizadas al principio y al final de cada período, durante toda la experiencia (fig. D.1.a). La valoración de las concentraciones de In y de PAH se llevó a cabo mediante una serie de métodos colorimétricos, que se detallarán en otro apartado. (cf. C.5.). Una vez acabada la experiencia, a todos los animales se les extrajo una muestra de sangre de la vena renal izquierda, con objeto de ver la fracción de extracción de PAH.

C.1.e.2. La valoración de la tasa de filtración glomerular en ratas.

Se llevó a cabo por medio del aclaramiento de inulina marcada con el radioisótopo tritio (In-H^3) (Amersham Searle, Holanda). La velocidad de infusión y la concentración plasmática a conseguir de esta sustancia fueron completamente distintas a la del método colorimétrico anterior. Se utilizó la misma bomba de infusión y con el objeto de que la actividad de los radioisótopos en muestras de 25-50 μl . de plasma fueran por lo menos 30 veces el valor del fondo del aparato, se infundió una solución que contenía 1,2 $\mu\text{Ci/ml}$. de In-H^3 , en salino 150 mM, a una tasa de infusión de 20 a 40 $\mu\text{l./min.}$, en función del flujo urinario a lo largo de la experiencia. Todas las infusiones se realizaron en la vena yugular. Se dejó transcurrir un período de estabilización mínimo de 60 min. antes del comienzo de la recogida de las muestras de orina, ésta se recogió en períodos de 30 min. cada uno, en tubos de poliestireno (11 x 70 mm.), que contenían 0,5 ml. de aceite mineral (parafina líquida), el volumen de orina se calculó por diferencia de peso de los tubos, antes y después de la recogida de orina. La sangre se recogió en capilares de vidrio de 75 μl . de volumen, previamente heparinizados (Capilets, Type II, glass Dade, Miami, USA). El plasma se separó por centrifugación en una microcentrifugadora (Hereaus Christ, Osterode).

C.2. Experiencias en perros.

C.2.a. Cuidados preoperatorios y durante la cirugía.

A todos los animales se les tomó una muestra de sangre una semana antes de la cirugía en la que se analizaron sus parámetros bioquímicos más importantes y se midió el valor hematocrito. Quince días antes de la experiencia y durante una semana, se les administró un tratamiento contra

la parasitosis gastrointestinal formado por Niclosamida, 100 mg/kg de peso, y Citrato de Piperazina, 250 mg/kg de peso, ambos dos veces al día, veinticuatro horas antes de la cirugía se les suspendió la comida y sólo se les permitió el acceso al agua. En algunos casos, una serie de días antes a la cirugía, los perros recibieron en la dieta un suplemento en el contenido de ClNa, que habitualmente es bajo en las dietas estandar, con objeto de elevar su volemia (303).

Durante la cirugía se les infundió una solución de glucosa 277 mM (20 ml/Kg de peso) con objeto de conseguir unos niveles comparables de hidratación basal entre los diferentes perros. Desde el comienzo de la cirugía hasta el final de la experiencia, se les administró una solución de salino isotónico (150 mmol/l), al objeto de asegurar un buen flujo urinario, a una velocidad de 1 ml/min, mediante una bomba de infusión (Multi-Speed Transmission, Harvard Apparatus, Co, Dover, Mass, Model n.º 600-000).

C.2.b. Preparación quirúrgica general.

Las experiencias se han llevado a cabo en perros que fueron anestesiados con tiopental sódico (Pentthol) 30 mg/Kg de peso, intravenoso, como dosis inicial y se administraron nuevas cantidades, si era necesario, a lo largo de la experiencia. Para mantener una ventilación adecuada fueron intubados y conectados a un respirador (Harvard Apparatus, Co, Inc, Millis, Mass.).

La preparación quirúrgica general fue la siguiente: A través de una incisión inguinal se visualizó el paquete femoral y se aisló y cateterizó la vena femoral mediante un tubo de polietileno (Steriflex, Ø: 2,0 x 3,3 mm, G II, Vygon, Francia, para la toma de muestras de sangre y para la administración de infusiones de distintas soluciones. Seguidamente se aisló y cateterizó la arteria femoral, mediante un tubo de polietileno siliconizado (Ø: 1,8 x 3,2 mm, Vygon, Francia), que se conectó a un medidor de presión a través de un transductor eléctrico (Statham), con objeto de medir y registrar la presión arterial (PA) a lo largo de la experiencia (Polygraph, Grass, Inst., Co., Quincy, Mass.). A continuación se practicó una incisión longitudinal, siguiendo la línea alba de la pared abdominal, hasta llegar a la cavidad peritoneal. Para evitar pérdidas de sangre durante la cirugía se realizaron técnicas de hemostasia y electrocauterización. Se aislaron y canularon los uréteres con tubos de polietileno (PE 160 a PE 205) y a través de una pequeña incisión lateral en la pared abdominal se comunicaron con el exterior. Los extremos de los tubos se introdujeron en dos probetas graduadas para la recogida de orina. La arteria renal izquierda se diseccionó y se colocó a su alrededor el cabezal de un flujómetro electromagnético (Nycotron), previamente equilibrado. Esto nos permitió conocer el flujo de sangre que llegaba al riñón sin necesidad de canulación de la arteria renal.

C.2.c. Valoración del flujo sanguíneo renal mediante flujometría electromagnética.

Está basado en el principio de que las cargas que se mueven en un campo magnético son reflejadas en dirección perpendicular a dicho campo y a su dirección de movimiento. Puesto que los iones del torrente circulatorio son en sí mismos cargas, si se hace pasar a un vaso sanguíneo a través de un campo magnético, colocando un cabezal externo alrededor del mismo (del vaso), tiene lugar la creación de una diferencia de potencial a través del vaso, proporcional a la velocidad del flujo sanguíneo en el mismo. Esta diferencia de potencial se puede medir mediante unos electrodos colocados en el exterior del vaso o por medio de un cateter y registrándola en un polígrafo (187).

En nuestras experiencias en perros el Flujo Sanguíneo Renal (FSR) se ha medido según el método descrito. La arteria renal izquierda se diseccionó con cuidado de conservar los nervios renales y el tejido que hay alrededor de ella, a su alrededor se colocó un cabezal de un flujómetro electromagnético (I.D. 2,5 a 3,5 mm., Nycotron, Oslo, Noruega) previamente equilibrado. Esto nos permitió conocer el flujo de sangre que llegaba al riñón sin necesidad de canulación de la arteria renal. Al final de la experiencia se realizó un control de medida del flujómetro, para ello se interrumpió el paso de sangre al riñón, mediante un clampaje entre el cabezal y el riñón. Este control

se tomó como medida de flujo "cero". La PA y el FSR se registraron en la misma gráfica (Fig. C.2.c.) mediante un polígrafo (Grass, Inst., Co., Quincy, Mass.).

C.3. Aislamiento de una hormona natriurética en el plasma y en la orina.

Las muestras de plasma y de orina recogidas de las experiencias en perros, sufren un procesamiento previo antes de bioensayar su actividad natriurética en un animal de experimentación. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena suprahepática, y de la vena y arteria femorales. Estas muestras se recogieron en jeringas heparinizadas. Las muestras de orina y de plasma pueden dividirse metodológicamente, en basales, que corresponden a muestras recogidas durante los períodos de aclaramiento control, es decir, una vez estabilizado el animal después de la cirugía, y experimentales, que son las recogidas durante o después de realizar la infusión de una solución hipertónica (de ClNa, 855 mM) en la vena porta o en una vena periférica, como se ha expuesto en los grupos experimentales y resultados de esta Tesis.

C.3.a. Recogida y preparación de las muestras de plasma y de orina de perros.

Se realizaron dos procesamientos diferentes para los dos tipos distintos de experiencias, en perros y en ratas despiertas.

1). Las muestras de sangre suprahepática que fueron, posteriormente, bioensayadas en perros anestesiados, se centrifugaron a 3.000 rpm, 15 min a 4°C, y los plasmas se diluyeron ligeramente en Ringer (15 ml de plasma y 5 ml de Ringer), y se congelaron a -20°C, hasta el momento de su bioensayo. (Ver apartado D.3.2.).

2). Las muestras que se bioensayaron en ratas despiertas, las de sangre suprahepática (SH), y de la arteria femoral (SA) se centrifugaron a 3.000 rpm, 15 min, a 4°C, una vez separados los plasmas, y recogidas alícuotas de los mismos para realizar la analítica general; un volumen de plasma (2 a 5 ml) se aplicó en una columna de Sephadex G 25 fino, previamente calibrada, y en equilibrio con el tampón, acetato de amonio 10 mM, pH:6,8 utilizado como eluyente y a 4°C.

Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 rpm, 15 min, a 4°C, y el sobrenadante se liofilizó para concentrarlo. El extracto seco se resuspendió en acetato de amonio 10 mM, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, y el sobrenadante, de 6 a 10 ml, se aplicó en una columna cromatográfica similar a la de los plasmas.

C.3.b. Técnicas de filtración en gel en columna.

Desde la introducción hace veinte años (274) de la filtración en gel de Sephadex, esta técnica ha ocupado una posición clave en la purificación y aislamiento de numerosas moléculas biológicas. La separación por filtración en gel depende de las diferentes capacidades de las moléculas para atravesar los poros que forma en su interior el gel, es decir, la fase estacionaria. Esta técnica está basada en que los movimientos de un soluto, cuando atraviesa el gel, que constituye el lecho cromatográfico, dependen del flujo de la fase móvil y del movimiento Browniano de las moléculas de soluto, que produce su difusión hacia dentro y hacia fuera de la fase estacionaria. Las moléculas grandes, no interactúan con la fase estacionaria y atraviesan el lecho cromatográfico rápidamente; las moléculas pequeñas, sí pueden atravesar los poros del gel, por tanto, se mueven más lentamente a través de la columna. Por consiguiente, el orden de elución es decreciente en cuanto a los pesos moleculares (14, 274).

El lecho del gel de Sephadex constituye una malla de moléculas de dextrano entrecruzadas. El gel tiene un gran número de grupos hidroxilos lo que le da una hidrofilia elevada, aumentando de tamaño rápidamente en agua y en soluciones de electrolitos. Los distintos tipos de Sephadex se diferencian en el grado del entrecruzamiento y, por tanto, en el grado de capacidad de aumentar de

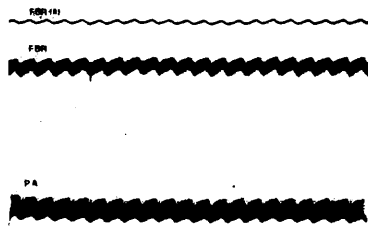


Fig. C.2.c.— Representa un registro conjunto de PA, FSR, en la arteria renal izquierda, y FSR (\bar{x}), de una de las experiencias llevadas a cabo en perros.

tamaño en agua y esto a su vez determina el rango de separación o de fraccionamiento de las moléculas biológicas. También a mayor grado de entrecruzamiento hay una mayor rigidez del gel y se pueden utilizar flujos de elución más elevados. Dentro del rango de fraccionamiento apropiado para cada tipo de gel, hay una correlación lineal entre el logaritmo de los pesos moleculares y los volúmenes de elución de las distintas fracciones.

C.3.c. Fraccionamiento de las muestras de plasma y de orina.

La técnica utilizada para el aislamiento de la hormona natriurética ha sido la descrita por Bourgoignie (36, 37). Las muestras de plasma se fraccionaron en gel de Sephadex G 25, grado fino (Pharmacia Fine Chemical Suecia), en columnas cromatográficas de dos tamaños distintos, en función del volumen de muestra, K 16/100 y K 16/40 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia). Sus volúmenes de exclusión (V_o) eran aproximadamente de 96 y 37 ml en cada tipo de columna, estimados mediante la elución del azul dextrano ($P_m \geq 2 \times 10^6$ daltones), tras la lectura de la absorbancia de las fracciones a una longitud de onda de 260 nm. El volumen interno (V_i) de las columnas, era de 200 y de 84 ml respectivamente, estimados mediante la elución de I^{125} , tras el conteo en un contador de radiación gamma (Nuclear, Chicago, Ch. USA). (Fig. C.3.c.1. y C.3.c.2.).

El tampón utilizado como eluyente fue acetato de amonio 10 mM, pH:6,8 ($\cong 20$ mOsm/Kg de agua) que por su propiedad de ser volátil es el adecuado para la liofilización de las fracciones que se recogen de la columna. Todos los fraccionamientos se llevaron a cabo a 4°C en una cámara fría termostataada. Las muestras menores de 4 ml se fraccionaron en la columna K 16 / 40 y las superiores a 5 ml en la K 16 / 100. El flujo de elución fue de 20 ml/h para la columna K 16/100 y de 35 ml/h en K 16/40. Las fracciones fueron recogidas en volúmenes de 3 ml, aproximadamente, en tubos de poliestireno, mediante un colector de fracciones automático (LKB Ultrarac).

El gel de Sephadex G25 tiene un rango de fraccionamiento de moléculas de pesos moleculares comprendidos entre los 1000 y los 5000 daltones. Las moléculas de mayor P_m son totalmente excluidas del gel y eluyen en el volumen de exclusión (V_o), las moléculas de P_m menor de 1000 daltones eluyen en el volumen interno (V_i) de la columna. Hay otras situaciones, como son los fenómenos de adsorción del gel, que hacen que las moléculas eluyan retrasadas con respecto al volumen que les correspondería por el P_m ; esto ocurre debido a fenómenos de interacción con el mismo, y suelen ser compuestos aromáticos homo o heterociclos (14, 171). Del proceso de fraccionamiento de nuestras muestras en el Sephadex G 25, fino, se pueden dividir cuatro fracciones (F).

FI: Contiene las moléculas de P_m elevado, son proteínas principalmente, y su localización se lleva a cabo mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm de longitud de onda.

FIII: Contiene el pico de las sales, medidas por la osmolalidad y la concentración de electrolitos (Na^+ , K^+ y Cl^-).

FII: Fracción que aparece entre FI y FIII, suele ser un pico con un contenido bajo en proteínas.

FIV: Fracción que aparece inmediatamente después del pico de las sales, y en la cual se ha descrito la presencia del factor natriurético y del inhibidor del transporte de sodio (82,84).

Todas estas fracciones fueron liofilizadas y el extracto seco se almacenó hasta el día del bioensayo a -20°C. Antes del bioensayo de la fracción IV, que es una cantidad muy pequeña y está adherida a las paredes del frasco utilizado para la liofilización, se redisolvió en 3 ml de CINA 150 mM, y se mantuvo a 4°C hasta el momento de infundirla, por duplicado, en ratas despiertas.

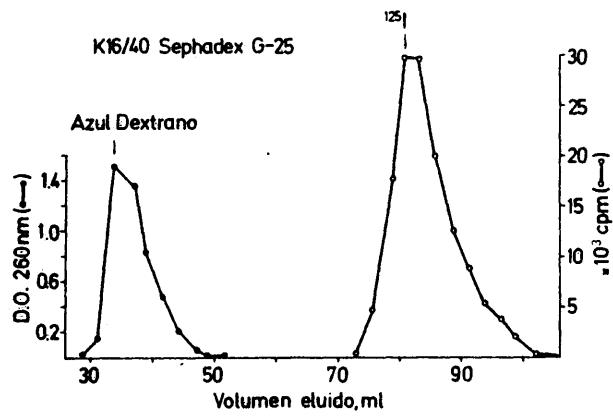


Fig. C.3.c.1.— Representa un perfil de una curva de calibración de una columna K 16 / 40, que contiene Sephadex G 25 fino, y como eluyente acetato de amonio 10 mM, pH 6,8.

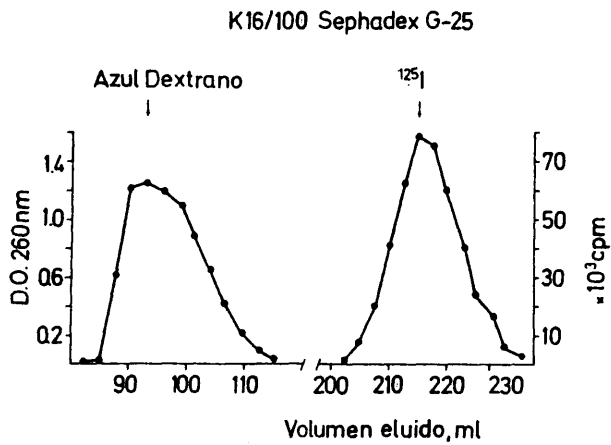


Fig. C.3.c.2.— Representa un perfil de una curva de calibración de una columna K 16 / 100, que contiene Sephadex G 25 fino y como eluyente acetato de amonio 10 mM, pH 6,8.

C.4. Estudio de la actividad natriurética.

Con el objeto de comprobar si hay presente actividad natriurética en las muestras mencionadas (apartado C.3.a.), se ha llevado a cabo el estudio de la influencia de estas muestras en la excreción urinaria de sodio en dos tipos de animales de experimentación, en perros anestesiados y en ratas despiertas.

C.4.a. Experiencias en perros

C.4.a.1. Preparación de los animales y técnicas quirúrgicas.

Consiste en experiencias agudas en perros anestesiados a los que se les realizó la preparación quirúrgica general, y además, se les colocó un cateter de polietileno (PE 50) en la arteria renal izquierda (ver cf. C.2.b. y D.3.a.).

C.4.a.2. El esquema de la experiencia se detalla en el apartado D.3.a. y se representa en la Fig. D.3.a. Brevemente, las muestras de plasma suprahepático se infundieron en la arteria renal izquierda, y la valoración de la actividad natriurética de las mismas sobre el riñón infundido se realiza midiendo los cambios en la excreción de sodio que produce en ese riñón la infusión del plasma SH, el experimental con respecto al basal (tal y como se definió en el apartado C.3.) y además se han comparado las respuestas del riñón infundido con respecto a las del contralateral (no infundido), después de cada tipo de infusión.

C.4.b. Experiencias en ratas despiertas.

C.4.b.1. Preparación de los animales.

Se han utilizado ratas Wistar, previamente al ensayo recibieron el tratamiento siguiente:

a) Nefrectomía unilateral:

Las ratas fueron anestesiadas bien con pentobarbital sodio al 6% intraperitonealmente (Nembutal Abbott), 15 mg/Kg de peso, o bien con éter, mediante la introducción del animal en un recipiente que contenía gasas empapadas en el mismo. En ambos casos se procuró que la anestesia fuera lenta, para una mayor duración y supervivencia posterior del animal. Una vez anestesiado el animal se colocó sobre la mesa de operaciones, y se le inmovilizó. La zona dorsal subcostal (habitualmente, el lado derecho) se rasuró y se limpió con una solución antiséptica (Betadine). El material quirúrgico fue tratado previamente con una solución germicida de Armil al 0,5%. Se realizó una incisión subcostal de 2 cm de longitud en la piel y en la capa muscular y se accedió a la celda renal retroperitonealmente. Se separó cuidadosamente la glándula suprarrenal y su vasculatura, y se ligó el pedículo renal con una sutura de lino, extirpándose seguidamente el riñón. La capa muscular se cerró con una sutura continua y se aplicó una sulfamida en polvo. A continuación, se cerró la piel y en la sutura se aplicó Betadine. A todos los animales después de la cirugía se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de ClNa 150 mM. Esta operación se realizó, al menos, quince días antes de la fecha prevista para utilizarlos en el bioensayo. El objeto de la misma está basado en el hecho conocido de que tanto en el hombre como en animales de experimentación, la sensibilidad de las nefronas, frente a posibles estímulos natriuréticos aumenta, a medida que disminuye la población de las mismas, siempre y cuando el riñón que permanece, haya conseguido su adaptación funcional y mantenga una función renal normal (42,79). Los estudios para bioensayar la actividad natriurética de diferentes factores se realizan muy a menudo en ratas, y otros animales uninefrectomizados (36, 37).

b) Mantenimiento en cajas metabólicas:

Transcurrido el tiempo necesario para que la rata uninefrectomizada restablezca su función

renal normal (42), y antes de realizar la experiencia aguda, todas las ratas permanecieron de 3 a 5 días en cajas metabólicas individuales, una vez pesadas y numeradas en el rabo. Durante estos días recibieron con la dieta estandar (habitualmente 10–13 g de comida Sanders) 3, 42 mEq de sodio al día, en forma de ClNa, de bebida recibieron agua. Durante estos días se controló la ingesta, la bebida, el flujo urinario, la excreción urinaria de Na y de K y la osmolaridad en la orina. Esta última se recogió en probetas de cristal graduadas, que contenían 2 ml de aceite mineral, previamente equilibrado con agua. En algunos casos también se puso en el fondo de la probeta 0,1 ml de azida sódica al 20%. La orina se recogió libre de heces o de restos de comida, debido al diseño especial de las cajas metabólicas. Cuando por diarrea, o cualquier causa, la orina aparecía contaminada por heces o comida, la experiencia se invalidó. Las experiencias se hicieron en períodos de un mínimo de 18 horas y habitualmente de 24 horas. Este pretratamiento con una dieta con alto contenido en sodio, a las ratas que se emplearon en el bioensayo, se ha llevado a cabo, basándose en los datos de la literatura (105, 108) que vienen a apoyar que la dieta con alta concentración de sodio facilita una mayor sensibilidad del riñón frente a estímulos natriuréticos (108, 219, 293, 343).

C.4.b.2. Bioensayo en ratas despiertas.

a) Técnicas quirúrgicas:

Dieciocho horas antes de la experiencia aguda, las ratas permanecieron en las cajas metabólicas sin comer, sólo con acceso al agua. El día de la prueba las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico al 6% (Nembutal. Abbot) (15 mg/Kg de peso intraperitonealmente). Seguidamente se les canuló una vena yugular y una arteria femoral, mediante unos cateteres de polietileno (PE 50, Vygon, Francia) rellenos con salino isotónico (ClNa 150 mM) y en el caso del cateter arterial contenía también una pequeña cantidad de heparina sódica. Los catéteres habían sido previamente colocados subcutáneamente, con ayuda de una aguja de grandes dimensiones, de modo que se exteriorizaban en la parte dorsal del cuello, entre las dos orejas para evitar que estuvieran al alcance del animal. En ese extremo fueron cosidos a la piel con una sutura de lino; por su parte, las incisiones realizadas para la canulación se cosieron con seda, asegurando previamente los catéteres en el interior, mediante una sutura al músculo y a la piel. Asimismo, tras una ligadura alrededor del pene del animal, y mediante una pequeña incisión suprapúbica, la vejiga de la orina se canuló con un catéter de polietileno (PE-50), con el extremo terminado en forma de cazoleta. Este catéter también se exteriorizó detrás del cuello.

El catéter arterial fue conectado a un transductor de presión y éste a su vez a un registro multicanal (Poligraph Grass., Inst. Co. Quincy, Mass.). El catéter venoso fue conectado a una bomba de infusión continua (Unita I. B. Melsugen. W. Germany), mediante la cual se infundió una solución de Inulina-H³ (1,2 μ Ci/ml, en ClNa 150 mM), inicialmente a una velocidad de 1,2 ml/h, para valorar la tasa de filtración glomerular (FG), también se infundió una solución de salino isotónico a la misma velocidad. La orina fue recogida en tubos de plástico, que contenían 0,5 ml de aceite de vaselina, previamente pesados. (Figuras C.4.b.2.a. y b.).

b) Esquema de la experiencia:

Una vez finalizada la cirugía (Fig. D.3.b.2.), los animales fueron colocados en una caja que permitía la libertad de movimientos y bajo la luz de una lámpara, hasta que despertaron completamente de la anestesia, el tiempo mínimo que llevaba este proceso era de 60 min. Una vez despiertos y comprobada la estabilidad de la P.A. y del flujo urinario se daba comienzo a la experiencia. Inicialmente se realizaron de dos a tres períodos de aclaramiento controles de 30 min cada uno, seguidamente se les infundió en la vena yugular un volumen de 1,5 ml de ClNa 150 mM de la fracción IV, el factor natriurético, previamente aislado, a la velocidad de 0,1 ml/min, durante 15 min. Una vez que finalizada esta infusión se continuó con la infusión In-H³ y de ClNa, que momentáneamente se habían interrumpido, y seguidamente se realizaron períodos de aclaramiento de 30 min, hasta un total de seis. Las muestras de sangre se obtuvieron de la arteria femoral, en capilares hepa-



Fig. C.4.b.2.a.— Bioensayo del factor natriurético: rata despierta después de la preparación quirúrgica, mostrando en la cabeza, entre las orejas, los tres catéteres que le fueron colocados previamente, en la vena yugular, en la arteria femoral y en la vejiga de la orina.

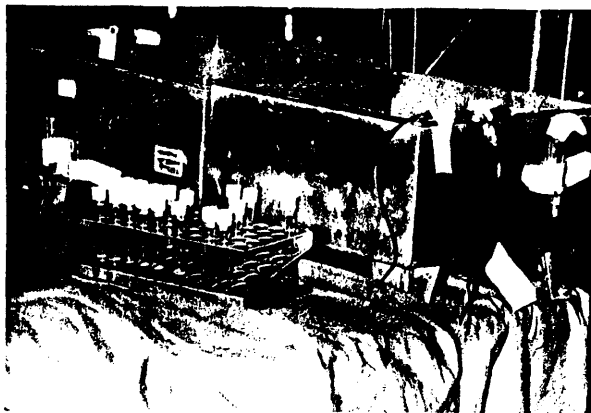


Fig. C.4.b.2.b.— Bioensayo del factor natriurético: aparatos utilizados y preparación de la experiencia, infusión i.v. de muestras y recogida de orina.

rinizados (75 μ l), al principio y al final de cada período de aclaramiento. Si el flujo urinario superaba a la tasa de infusión de las soluciones de mantenimiento, esta última se aumentaba hasta igualarlo. El comienzo del bioensayo tenía lugar si se comprobaba que había una estabilización del flujo urinario en los períodos de aclaramiento control, es decir, si entre ellos no había diferencias superiores al 10%. Si se observaba hematuria en la orina se suspendía la experiencia.

c) Valoración de la actividad natriurética:

La presencia de actividad natriurética en las muestras se valoró por los cambios en la excreción de sodio que inducían en la rata. Para ello se analizaron comparativamente los valores en la excreción urinaria de sodio ($U_{Na}V$), obtenidos en los períodos controles y en los períodos experimentales, corregidos por 100 g de peso de la rata. La carga filtrada de sodio fue corregida por el factor de Donnan 0,95 (42) y la excreción fraccional de sodio se calculó según la fórmula siguiente:

$$FE_{Na} = \frac{U_{Na} V}{P_{Na} \times FG \times 0,95} \times 100, \text{ y el cambio, disminución o aumento se calculó como:}$$

$$\Delta FE_{Na} = \frac{FE_{Na_a} - FE_{Na_b}}{FE_{Na_b}} \times 100$$

donde, FE_{Na_a} = Es la medida de la excreción fraccional de sodio experimental, en un momento "a".

FE_{Na_b} = Es la media de los valores de este parámetro en los períodos controles. por tanto, el valor "basal"

La misma formulación se ha utilizado para calcular los cambios de la excreción absoluta de sodio y de cualquier otro parámetro de la experiencia, como el volumen urinario y la filtración glomerular.

C.5. Métodos de valoración química.

C.5.a. Valoración de la concentración de inulina.

En 1952 Young y Roisz (370) utilizaron por primera vez el reactivo de antrona (9,10dihidro-9-oxoantraceno, PM = 194,22), para la determinación de inulina en estudios de aclaramiento, basándose en que la antrona reacciona con la fructosa resultante de la hidrólisis de la inulina en medio ácido, y desarrolla un cromógeno verde-azulado que absorbe selectivamente a 630 nm. En este método la interferencia química con la glucosa se eliminó sometiendo las muestras de plasma, libres de proteínas, y las de orina a la digestión con hidróxido sódico concentrado en caliente. Las muestras fueron incubadas después de la digestión, con el reactivo de antrona a 75°C, durante 5 min. dando como resultado el cromógeno mencionado. Durante la digestión se destruía no sólo la glucosa sino también la fracción álcali lábil de la inulina. En 1954, Mokrasch (235), mostró que la fructosa podía ser determinada en presencia de glucosa con el reactivo de antrona; este método implicaba la incubación separada de muestras a 80°C, durante 3 min. (color máximo para la fructosa de la inulina) y durante 24 min. (color máximo para la glucosa). La concentración de cada hexosa fue calculada a partir de fórmulas apropiadas. W.D. Davidson y M.A. Sackner en 1963 (77) introdujeron dos cambios importantes en los métodos anteriores:

– La concentración de antrona en el reactivo fue reducida de 0,4 a 0,08%, dando por resultado un descenso relativo y absoluto en la absorción de los blancos de orina y de plasma y también se previno así la precipitación de cristales de antrona durante la determinación.

– Se utilizó un baño de agua a 38°C durante 50 min. para que se desarrollase el complejo coloreado. Este cambio permitió una mayor reproducibilidad en las medidas, que los métodos con temperaturas elevadas, disminuyendo las interferencias por glucosa y otros cromógenos. Estas modificaciones evitaron utilizar hidróxido sódico para destruir la glucosa en condiciones de concentraciones normales de azúcar en sangre y en orina. Este último método es el que nosotros hemos seguido para la valoración de la inulina en todas las experiencias.

La preparación del reactivo de antrona se lleva a cabo del modo siguiente, 500 ml de SO_4H_2 al 96% se añaden lentamente a 130 ml de H_2O destilada, la mezcla se deja enfriar y en ella se disuelven 0,5 mg de antrona. La concentración final de antrona es de alrededor del 0,08%. El reactivo se guarda, una vez enfriado, en una botella oscura, a 4°C y se puede utilizar pasadas las 48 horas. Se ha estudiado la linealidad de una recta patrón, realizada con distintas concentraciones de fructosa y se ha visto que es lineal entre las concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En las experiencias individuales la recta patrón realizada por duplicado, tenía un coeficiente de correlación medio de 0,99142 y con un error estándar de 0,002014 (10 determinaciones) (Fig. C.5.a.).

El procedimiento del método empleado en nuestras experiencias fue el siguiente: En tubos de poliestireno de capacidad máxima de 3 ml, se colocaron 0,2 ml de plasma y 0,4 ml de ácido tricloroacético al 5%, con objeto de producir la precipitación de las proteínas del plasma. Esto se realizó para cada una de las muestras de plasma recogidas durante las experiencias de aclaramiento. Estos tubos se centrifugaron a 3000 rpm, 15 min, a 4°C (IEC; CENTRA. 7R, DAMON, USA). Las muestras de orina se diluyeron adecuadamente con agua destilada según la diuresis del animal, observada durante la experiencia, estas diluciones variaron desde 1/100 a 1/10.000. Seguidamente en tubos de cristal de 3 ml de capacidad (10 x 75 mm) se pipetearon por duplicado:

- a) Alícuotas de 0,1 ml del sobrenadante de los plasmas desproteinizados.
- b) Alícuotas de 0,1 ml de las muestras de orina diluidas.
- c) Alícuotas de 0,1 ml de las soluciones de fructosa que constituyen la recta patrón, antes mencionada.
- d) 0,1 ml de agua destilada.

Los tubos se introdujeron en un baño con hielo y a todos ellos se les añadieron 2 ml del reactivo de antrona (Merck, Alemania), preparado como se mencionó anteriormente. Seguidamente se introdujeron durante 60 min en un baño a 39°C. Transcurrido ese tiempo la reacción se paró introduciendo de nuevo los tubos, en un baño con hielo, durante 10 min. La lectura del cromógeno verde se hizo en un espectrofotómetro (Coleman, Junior II, Coleman Inst., Corporation) a 620 nm de longitud de onda, mediante la utilización de tubos tipo Coleman (Perkin-Elmer, 12x75 mm, Coleman Corporation). Como blanco para ajustar la lectura a cero, se utilizó la muestra que contenía agua destilada.

C.5.b. Determinación de inulina radioactiva.

Para la determinación de la inulina radioactiva en el plasma y en la orina de las ratas en las que se efectuaron los aclaramientos, se pipetearon muestras de 25 a 100 μl de plasma y de orina (diluida o no, según los casos) y se colocaron en viales de cristal, especiales para centelleo líquido (Onuba, SA), que contenían 2 ml de agua destilada. A estos viales se añadieron 8 ml de líquido de centelleo, una solución de Bray modificada (39). Las muestras, por duplicado, fueron leídas en un contador β de centelleo líquido Mark III (Searley Analytic, Inc., Des Plaines Ill.) También se contó una muestra de la solución de In-H^3 que se utilizó durante la infusión.

C.5.c. Valoración de la concentración de ácido para-aminohipúrico (PAH).

La determinación de PAH en plasma y en orina se ha llevado a cabo según el método de Waugh y Beall (350). Este método utiliza como desproteinizante dicloroacetato 1,0 M-p-toluenosulfonato

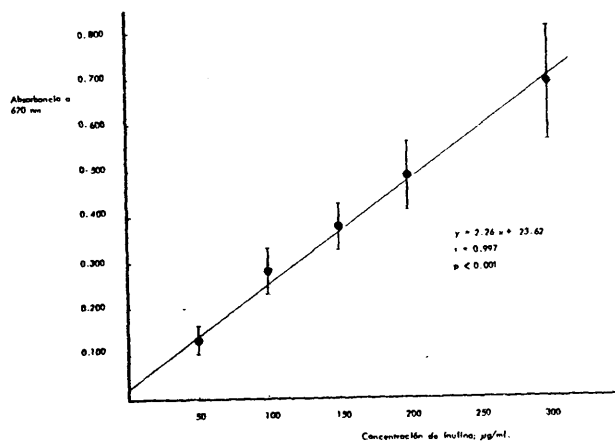


Fig. C.5.a.— Recta patrón de distintas concentraciones de fructuosa, valoradas según el Método de Davidson y Sackner (77) empleado para medir la concentración de inulina.

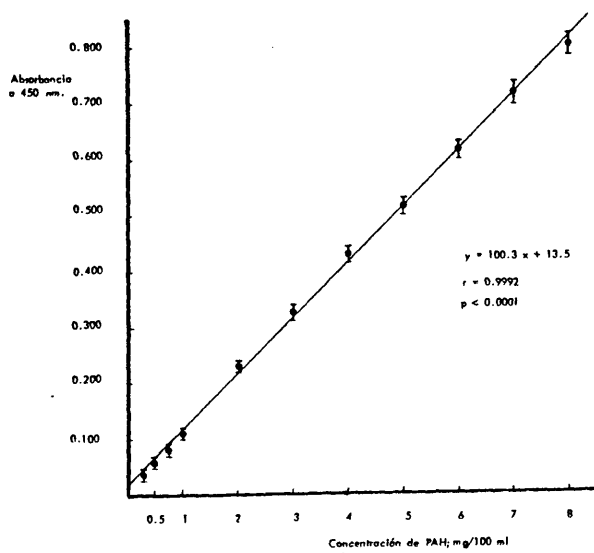


Fig. C.5.c.— Recta patrón de distintas concentraciones de PAH, medida según el método de Waugh y Beall (350) utilizado para valorar la concentración de PAH en nuestras experiencias.

0,3 M, que posee capacidad tampón a pH bajo, de alrededor de 1,4. A las muestras de plasma y orina en este medio se les añade una solución etanólica de p-dimetilaminobenzaldehído que reacciona con los grupos p-amino y se forma una base de Schiff de naturaleza reversible, dando un cromógeno amarillo que absorbe selectivamente a 450 nm. Igual que los métodos colorimétricos anteriores, la concentración de PAH en la muestra se calculó por la medida de la absorbancia a esta longitud de onda, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer. Se ha visto que la recta de regresión entre absorbancia y las concentraciones de PAH, medidas por el método de Waugh y Beall, es lineal entre 0,3 mg/100 ml y 8 mg/100 ml (Fig. C.5.c.). Para que el aclaramiento de PAH represente una medida del flujo plasmático renal se tuvo en cuenta que las concentraciones de PAH en plasma no fueran superiores a la concentración óptima (de 0,1 a 0,15 mg/ml) para evitar que disminuyese la tasa de extracción de PAH. En experiencias individuales la recta patrón de este método tenía un coeficiente de correlación medio de 0,9991 y con un error estandar de : 0,0000948 (5 determinaciones).

La preparación de los reactivos empleados en este método es la siguiente:

– Desproteinizante tamponado a pH: 1,4; su preparación requiere 129 g de ácido dicloroacético, 57 g de ácido para-toluenosulfónico y 34 g de NaOH, todo ello se lleva a 1000 ml de volumen con agua destilada, el pH de este reactivo es estable durante varios meses.

– Solución de p-dimetilaminobenzaldehído al 1% y de etanol al 57%, su preparación requiere 5 g de p-dimetilaminobenzaldehído, y 300 ml de etanol al 95%. Todo ello se lleva a 500 ml de volumen con agua destilada. El procedimiento seguido fue: En tubos de poliestireno (11 x 70 mm), se pipetearon 0,2 ml de plasma y 0,9 ml de desproteinizante, esto se realizó por duplicado. Una vez agitadas las muestras se centrifugaron a 3000 rpm. 15 min. a 4°C. Las muestras de orina se diluyeron en agua destilada en función del flujo urinario en cada período de aclaramiento, las diluciones variaron desde 1/1000 hasta 1/10. Se pipetearon 0,1 ml de la muestra diluida y se mezclaron con 0,9 ml de desproteinizante, por duplicado. Igualmente, se pipetearon 0,1 ml de cada una de las soluciones que componen la curva patrón (desde 0,3 a 8 mg/100 ml) y se mezclaron con 0,9 ml de desproteinizante, por duplicado. Las muestras de orina y de estantares se agitaron ligeramente. Seguidamente, y una vez decantado el sobrenadante después de la desproteización de los plasmas, en tubos de poliestireno se pipetearon 0,8 ml del mismo y se hicieron reaccionar con 0,8 ml de la solución de p-dimetilamino benzaldehído al 1% y de etanol al 57%. Igualmente, a todos los tubos que contenían las muestras de orina y de estandares con el desproteinizante, de 1 ml de volumen, se le añadieron 1 ml del reactivo de p-dimetilamino. La reacción produce un cromógeno amarillo, que es estable a temperatura ambiente, al menos durante dos horas. Una vez agitadas todas las muestras, se dejaron transcurrir 5 min como mínimo antes de leer la absorbancia de cada una de ellas a 450 nm de longitud de onda (tubos Coleman, Perkin-Elmer, 12 x 75 mm cell glass round, y Coleman Junior II Mod. 6/20, ambos de Coleman Instrument Corporation, USA). Como blanco se utilizó la mezcla de 0,1 ml de agua destilada, 0,9 ml de desproteinizante y 1 ml de solución de p-dimetilaminobenzaldehído al 1% y de etanol al 57%.

C.5.d. Valoración de la concentración de proteínas plasmáticas.

La medida de la concentración de proteínas plasmáticas se realizó por medio del reactivo de Fenol de Folin-Ciocalteu (221). En esta reacción colorimétrica se mide un cromógeno azul que absorbe selectivamente a 750 nm. Este cromógeno se produce al añadir el reactivo de fenol a una solución alcalina de proteínas, la intensidad de color está en función principalmente del contenido en tirosinas (Tyr) y triptófanos (Trp) de las proteínas. También parece jugar un papel importante el intervalo de tiempo al cual están expuestas las proteínas al alcali, antes de añadir el reactivo de fenol y la presencia en las moléculas de proteína de grupos reductores como SH y otros. Por este método sólo puede analizarse las proteínas solubles y puesto que las propiedades cromogénicas de las proteínas son distintas unas de otras, puede emplearse para valorar un solo tipo de proteínas o bien una mezcla si es que entre ellas hay unas proporciones bien definidas. El procedimiento seguido

según este método se desarrolla a continuación: La preparación de proteínas a analizar se diluyó convenientemente en una solución salina 0,5 M a pH 7,3. De esta dilución se pipeteó por duplicado 1 ml y se colocó en unos tubos especiales; seguidamente se le añadieron 3 ml de carbonato sódico anhidro al 12,5% y 0,5 ml de sulfato cúprico 5 H₂O al 1%. Se dejó transcurrir una hora, a temperatura ambiente y a continuación, a cada tubo, se le añadió gota a gota 0,5 ml de una dilución 1:3 de reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu en agua destilada. Se esperaron 20 min, se leyó en un espectrofotómetro (Coleman-Junior N II, Perkin-Elmer) a una longitud de onda de 750 nm, frente a un blanco preparado con 1 ml de solución salina 0,5 M y con el resto de los reactivos. Los resultados se obtienen por extrapolación en una recta patrón realizada con distintas concentraciones conocidas de proteína, a partir de una solución madre de proteínas de composición similar a las plasmáticas preparada comercialmente (Lab-trol, Chemistry Control, Dade) y de concentración media 7,0 g/dl.

C.5.e. Valoración de la concentración de electrolitos en plasma y en orina. Excreción urinaria de electrolitos.

Los principales electrolitos medidos en nuestras experiencias fueron el sodio, el potasio, el cloro, el bicarbonato, y los iones hidrógeno.

El sodio y el potasio se midieron indistintamente por dos métodos. Uno de ellos es mediante un fotómetro de emisión de llama (IL 143, Instrumentation Laboratory, Boston USA), que está basado en el método siguiente: una alícuota de la muestra se mide combinada con una alícuota del diluyente, la mezcla es atomizada y pasada a la llama. Tanto el potasio, como el sodio, producen unas bien conocidas, llamas coloreadas de violeta y de amarillo, respectivamente. La intensidad de las mismas es proporcional a la concentración del electrolito presente. Se utiliza como estándar interno el litio (95, 163).

Los iones cloruro se miden mediante un clorómetro (Butchler Cotlove, B. Inst., Fort. Lee, USA), que se basa en la corriente que generan los iones de plata, los cuales se combinan con los iones cloruro presentes en la solución (163). El CO₃H⁻ se midió por microgasometría (Natelson Microgasometer, Scientific Industries, Springfield, USA). Este método gasométrico consiste en la acidificación de la solución, el CO₃H⁻ se convierte en CO₂, y la cantidad total de CO₂ presente se mide volumétricamente. El contenido total de CO₂ más que el de CO₃H⁻ es el componente del resultado (163).

Los tres primeros electrolitos mencionados también fueron medidos en numerosas ocasiones en un analizador de electrolitos automático (Stat/Ion, Technicon Instruments, Corp., Tarrytown, N.Y., 10591) que utiliza electrodos selectivos de vidrio, para cada electrolito. Su funcionamiento está basado en que a ciertos pH elevados, los electrodos de vidrio modificados son sensibles a las concentraciones de cationes monovalentes de una forma específica, y su utilización, al igual que los pH-metros, se fundamenta en la ecuación de Nernst. En este mismo aparato también se valoró la concentración de CO₃H⁻ mediante un método de titulación colorimétrica. Así la muestra, concretamente de plasma, se trata con un ácido, liberándose CO₂, que se absorbe con un tampón carbonato-bicarbonato con fenoltaleína. El cambio de color de la fenoltaleína es proporcional al contenido de CO₂ en la muestra (163).

La concentración de iones hidrógeno se midió potenciométricamente, mediante un electrodo de vidrio específico para este ión. Este método también está basado en la ecuación de Nernst. Se utilizó un pH-metro (24).

La excreción urinaria de los distintos electrolitos se calculó mediante la fórmula siguiente: Concentración en la orina de un tipo de electrolito, multiplicada, el flujo urinario. Las unidades en las que habitualmente vienen dados estos parámetros son: mM/l x ml./min. = μM/min. En las tablas y en las figuras, la excreción urinaria de un electrolito cualquiera "x" viene simbolizada por: U_xV (188).

C.5.f. Otras determinaciones.

La osmolaridad: La actividad del agua puede ser medida por cuantificación de una de las propiedades coaligativas de las soluciones acuosas: El descenso del punto de congelación, el descenso del punto de fusión, la elevación del punto de ebullición, el descenso de la presión de vapor, y la presión osmótica. Las propiedades coaligativas de una solución, son las que dependen del número de partículas que hay en ella y no de su naturaleza. El método habitual y el que ha sido empleado aquí, ha sido la medida del descenso del punto de congelación (159) que nos da la medida de la osmolalidad de las muestras de plasma y de orina (Osmómetro Fiske, Fiske, Mass., USA). Esta se expresa como miliosmoles por kilogramo de agua: mOsm/kg de H₂O.

El volumen hematocrito en las muestras de sangre, se determinó mediante el empleo de microcapilares heparinizados, de capacidad de 75 µl de muestra, que tras cerrar uno de sus extremos con plastilina, se centrifugan 3 min. en una microcentrifuga (Hereaus, Christ GMBH Osterode, RFA), la lectura del volumen de células se hace sobre un lector circular de microhematocritos (International Equipment, Co., Needham Heights, Mass. USA).

La urea se determinó mediante un método enzimático (Ureasa) en un analizador automático (Technicon).

C.6. Análisis de los resultados y métodos estadísticos.

El análisis de los resultados se ha realizado, en el caso de los trabajos realizados en perros, agrupando dos períodos consecutivos, de 20 min. cada uno, y tomando como valor para cada parámetro la media de su valor en ambos períodos. El valor medio de los parámetros obtenidos en los períodos controles se consideró como BASAL. Los datos se expresan en valores absolutos, y en sus unidades correspondientes, los cambios respecto al valor del parámetro respectivo en el período BASAL, se expresaron bien en valores absolutos, o bien en tanto por ciento de variación. En cualquier caso los resultados dentro de cada grupo de experiencias se representan, salvo que se mencione expresamente otra fórmula, como media \pm error estandar de la media ($\bar{x} \pm eem$).

Los resultados de los bioensayos en ratas se expresan como la media del valor del parámetro respectivo en los períodos controles por un lado y en los períodos experimentales por otro (cf. D.3. b), corregidos dichos valores por 100 g de peso de la rata. Los cambios se han calculado en números absolutos y en % (apartado C.4.b.2.c.). Estos resultados se expresan también como media \pm eem.

Los datos se han analizado estadísticamente mediante el test *t* de Student, para datos emparejados y no emparejados (89), según los casos, con la oportuna corrección de los grados de libertad del coeficiente de ensayo en el caso de la no homogeneidad de las varianzas (89). Las rectas de regresión y el cálculo de los coeficientes de correlación se ha llevado a cabo utilizando la técnica de los mínimos cuadrados (89). Para estos cálculos se han empleado, una calculadora programable Olivetti 101 Programma, y una calculadora, también programable, Hewlett-Packard 9815A.

D. GRUPOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS.

D.1. Respuestas renales a los cambios en la concentración de electrolitos en el lecho vascular portal. Especificidad a distintos electrolitos.

D.1.a. Procedimiento general.

Este estudio se ha llevado a cabo en perros callejeros, machos y hembras, de peso medio $23,4 \pm 1,4$ kg., anestesiados y con la preparación quirúrgica general que se especificó en el apartado C.2.b.. Además de la cirugía mencionada, se les aisló y cateterizó la vena porta, a través de una vena mesentérica secundaria, mediante un catéter fino de polietileno (PE 50). La posición de esta cánula se comprobó al final de cada una de las experiencias (fig. D.1). A los animales que no se les realizaba esto último se les colocaba transcutáneamente una aguja de 21", en una vena cubital de una pata, para la administración de infusiones por esta vía. En estos animales se han llevado a cabo experiencias de aclaramiento corto, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado C.1.e.. El esquema detallado de las mismas se representa en la fig. D.1.a. y consiste en el estudio comparativo de las respuestas renales a la infusión de una solución hipertónica, de distintos electrolitos, en la vena porta con respecto a la infusión de la misma solución en una vena cubital. Ambas infusiones se realizaron a la velocidad de $0,05$ ml/min/kg de peso, durante 30 min, mediante una bomba de infusión continua (Braun Melsugen. Unita I).

D.1.b. Infusión en el sistema porta de una solución de ClNa hipertónico (855 m mol/l). Comparación con la infusión sistémica de la misma solución.

Este estudio se ha llevado a cabo en 10 perros preparados para experiencias de aclaramiento, a 5 de ellos se les infundió una solución de ClNa 855 mM (1700 mOsm /kg de agua) en la vena porta (VP) (Fig. D.1) y otros 5 se les infundió la misma solución, en una vena cubital (VC) de una pata. La experiencia se desarrolló según el esquema mencionado en la fig. D.1.a.. Los resultados se han analizado para cada riñón por separado, y se expresan como diferencias del valor de cada parámetro en un período experimental, respecto a la media del valor de dicho parámetro en los períodos controles (BASAL). De este modo el control para cada perro, son los valores de los distintos parámetros en el período basal. Se representan los resultados por su media \pm eem, y el nivel de significación estadística que se ha considerado es el de $p < 0,05$.

La tabla D.1.b.1. resume la media de los parámetros más importantes de la función renal en los períodos controles, tanto de los perros que recibieron una infusión salina en la vena porta como en la vena cubital. Durante los experimentos individuales se observaron pequeñas diferencias entre estos parámetros, pero la media de los mismos, corregidos previamente por el peso de cada perro, no presentó diferencias significativas entre estos valores en los perros que recibieron posteriormente la infusión en la VP, con respecto a los que la recibieron en la VC.

En la fig. D.1.b.1. se representan los cambios en la $U_{Na} V$, $U_{Cl} V$ y en el V_u , que induce la infusión de ClNa hipertónico en cada una de las 2 vías. Cuando esta solución se infundió en una vena cubital la excreción de sodio aumentó ligeramente respecto al basal, pero este aumento no fue significativo, aproximadamente un 10%, manteniéndose a este nivel en los períodos postinfusión siguientes. Sin embargo, cuando la infusión hipertónica se realizó en la vena porta, la excreción de sodio aumentó significativamente respecto al basal ($\approx 87\%$), y estos aumentos fueron significativamente mayores que los observados durante la infusión cubital. La respuesta natriurética a la infusión en la VP se mantuvo significativamente elevada en los períodos postinfusión siguientes, siendo superior significativamente a los valores en los mismos períodos después de la infusión en la VC.

Los aumentos en la excreción de cloro tienen un comportamiento bastante similar a los de la $U_{Na} V$. La infusión de cloruro sódico hipertónico en la vena porta produce también aumentos en $U_{Cl} V$ significativos respecto al basal, mientras que esta misma solución en una VC no produce casi

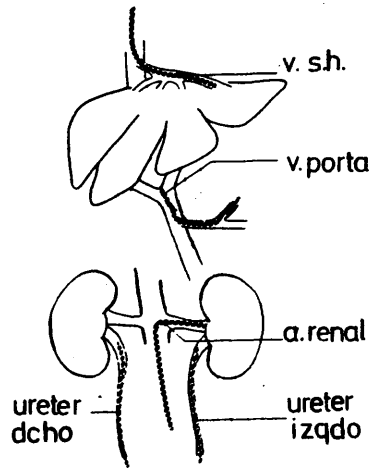


Fig. D.1.- Esquema de la preparación quirúrgica utilizada en las distintas experiencias en perros.

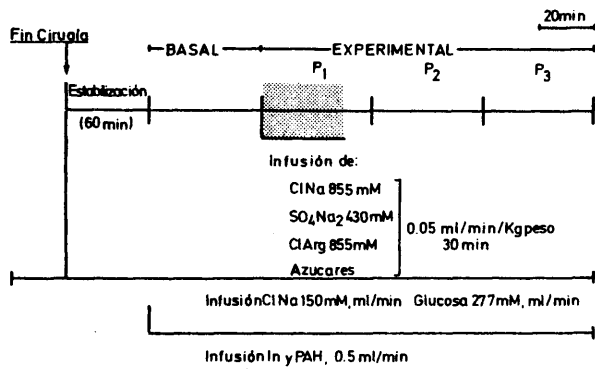


Fig. D.1.a.- Protocolo experimental utilizado para el estudio en perros de las respuestas renales a los cambios en la concentración de electrolitos (cf. D.1.b., D.1.c. y D.1.d.) y de la osmolaridad (cf. D.2.) en el lecho vascular portal. El área rayada corresponde al espacio de la infusión hiperosmolar.

TABLA D.1.b.1.: Valores basales de distintos parámetros de la función renal de los perros que recibieron una infusión de $ClNa$ 855 mM en la v.porta y en una v.cubital.

GRUPO PERROS:	PESO kg	C _{In} ml/min/kg	C _{PAH} ml/min/kg	U _{NaV} uM/min/kg	U _{CLV} uM/min/kg	V _u ul/min/kg	FE _{Na}	FE _{CL}
<u>INF. PORTA:</u>								
(n=5)	\bar{X} : 23,8	2,12	6,16	0,7	0,61	7,9	0,3	0,31
	+ eem	2,9	1,25	0,2	0,19	1,7	0,06	0,09
<u>INF. CUBITAL:</u>								
(n=5)	\bar{X} : 23	2,4	5,2	0,99	0,9	12,2	0,43	0,39
	+ eem	1,6	0,33	0,6	0,5	3,4	0,24	0,2
p:	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(test t de Student para datos no emparejados)								

61

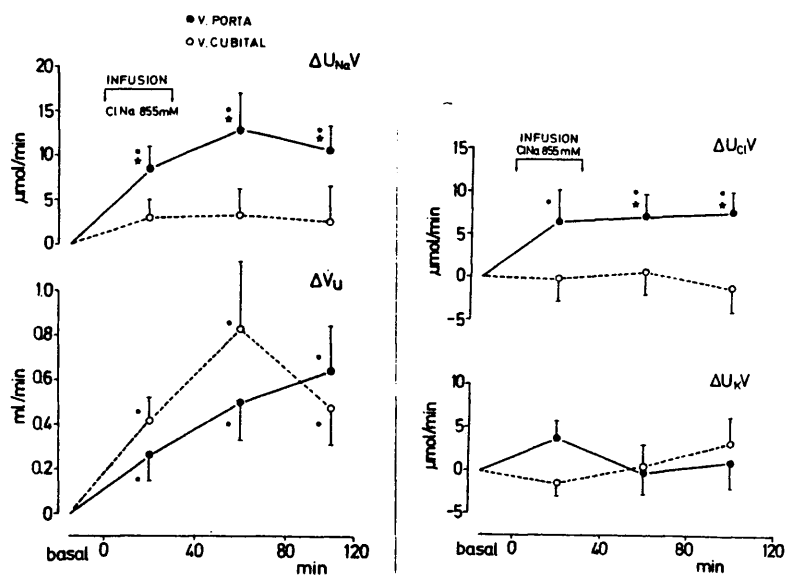


Fig. D.1.b.1.— Cambios respecto a los valores basales (Δ) en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}), de cloro (U_{ClV}) y de potasio (U_{KV}) y en el volumen urinario (V_U) después de la infusión de ClNa hipertónico, durante 30 min. en la VP y en una vena cubital (símbolos en la gráfica).
 — Los resultados se expresan como media \pm eem.
 — * : $p < 0,05$ respecto al valor basal (test. t. de Student para datos emparejados).
 — * : $p < 0,05$ respecto a la otra vía de infusión (test. t. de Student para datos no emparejados).

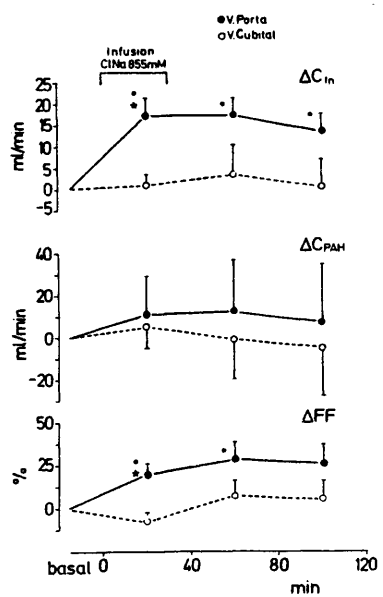


Fig. D.1.b.2.— Cambios respecto a los valores basales (Δ) en el aclaramiento de inulina (C_{In}) y de ácido p-amino hipúrico (C_{PAH}) y porcentaje de aumento respecto al basal de la fracción de filtración (FF); otras aplicaciones en la fig. D.1.b.1.

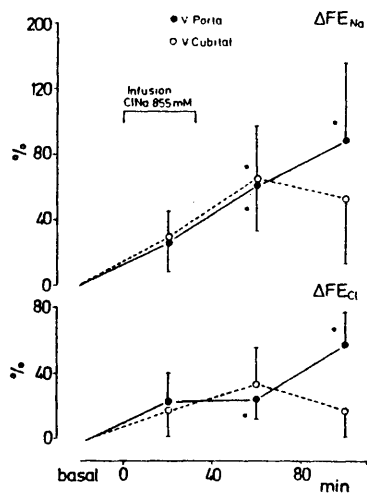


Fig. D.1.b.3.— Porcentaje de aumento respecto a los valores basales de la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}) y de cloro (FE_{Cl}); otras explicaciones en la fig. D.1.b.1.

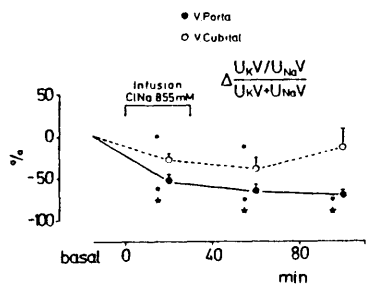


Fig. D.1.b.4.— Porcentaje de cambio respecto a los valores basales de la fracción $U_K V / U_{Na} V$ corregida por la oferta distal de sodio $U_K V + U_{Na} V$; otras aplicaciones en la fig. D.1.b.1.

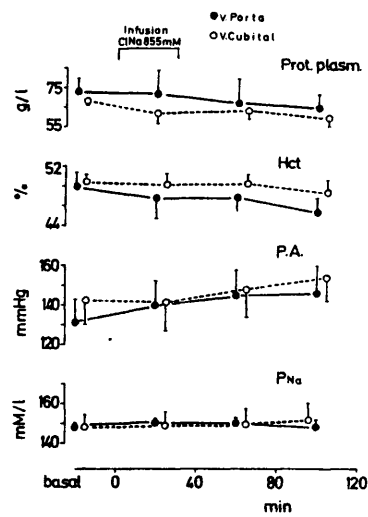


Fig. D.1.b.5.- Valores de las proteínas plasmáticas, del valor hematocrito, de la presión arterial y de la concentración de sodio en plasma (P_{Na}), antes y después de la infusión de cloruro sódico hipertónico en la VP y en una VC, otras explicaciones en la fig. D.1.b.1.

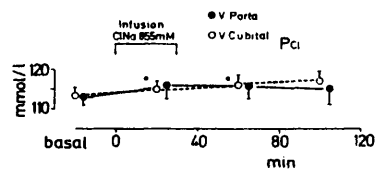


Fig. D.1.b.6.- Valores de la concentración de cloro en plasma (P_{Cl}) antes y después de la infusión de ClNa hipertónico en una y otra vena; otras explicaciones en la fig. D.1.b.1.

variaciones en este parámetro. Los aumentos después de la infusión intraportal son superiores significativamente a las variaciones observadas después de la infusión cubital. Por el contrario, el flujo urinario aumentó significativamente como consecuencia de la infusión de salino hipertónico y de un modo similar en los perros infundidos por una y otra vía (Fig. D.1.b.1.). La excreción urinaria de potasio ($U_{K V}$) no varió significativamente respecto a los valores basales después de la infusión de cloruro sódico hiperosmolar, en ninguna de las dos vías (Fig. D.1.b.1.).

Si comparamos los cambios producidos en la filtración glomerular (FG) y en el flujo plasmático renal (FPR) en los perros que recibieron la infusión hipertónica en la VP, con los que la recibieron en la VC (Fig. D.1.b.2.), observamos que la FG aumentó de un modo significativo respecto al basal sólo como consecuencia de la infusión portal. Este aumento fue significativamente superior a la respuesta observada durante la infusión en la VC. La FG después de la infusión VC no varió prácticamente respecto al basal, presentando cambios casi inapreciables. El flujo plasmático renal, valorado por el aclaramiento de PAH (CPAH), no varió de modo significativo con respecto a los valores en el basal, tanto para los perros que recibieron la infusión salina en la VP como para los que la recibieron en la VC. Por consiguiente, la fracción de filtración (FF, calculada como % de aumento respecto al valor basal) aumentó respecto al basal de un modo significativo en el grupo que recibió la infusión en la VP. El flujo sanguíneo renal, registrado durante toda la experiencia en la arteria renal izquierda (Fig. C.2.c.), mediante un flujómetro magnético (cf. C.2.c.), no experimentó cambios sustanciales durante, ni después de la infusión hipertónica por ninguna de las dos vías.

En la fig. D.1.b.3., se exponen los cambios, en porcentaje de aumento respecto al basal, en la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}) y de cloro (FE_{Cl}), según los cálculos expuestos en el apartado C.4.b.2.c.. Cuando se administró la solución de salino hipertónico intraportalmente, estos parámetros aumentaron de un modo significativo respecto al basal en dos períodos siguientes a esta infusión. Después de la infusión sistémica, de la solución mencionada, tanto FE_{Na} como FE_{Cl} aumentaron también respecto al basal y de un modo similar a como tuvo lugar después de la infusión en la VP.

En la fig. D.1.b.4. se exponen los cambios, también en % respecto al basal, de la relación $U_{K V}/U_{Na V}$ corregida por la oferta distal de sodio ($U_{K V} + U_{Na V}$) que puede considerarse como un índice de la actividad de la aldosterona. Se ha observado que esta relación disminuye de un modo significativo, tanto en los perros que reciben la infusión en VP como en los que la reciben sistémicamente. Pero el descenso en este parámetro después de la infusión intraportal es mayor significativamente que el observado después de la infusión en VC.

La concentración plasmática de proteínas y de sodio (P_{Na}), el valor hematocrito y la PA (Fig. D.1.b.5.), fueron similares en los dos conjuntos de perros, tanto en el período basal, como a lo largo de la experiencia. Estos parámetros no se alteraron como consecuencia de la infusión de salino hipertónico. Las concentraciones de cloruro (P_{Cl}) (Fig. D.1.b.6.) y de bicarbonato ($P_{CO_3 H^-}$) en plasma, permanecieron dentro de los límites de la normalidad y tampoco se alteraron a lo largo de las experiencias, como consecuencia de la infusión hiperosmolar, por ninguna de las dos vías.

D.1.c. *Papel específico del sodio: Infusión intraportal de una solución de $SO_4 Na_2$ hipertónica (430 mmol/l).*

Este grupo de experiencias se ha llevado a cabo en seis perros, preparados para experiencias de aclaramiento como en el grupo anterior y siguiendo el esquema experimental descrito en la fig. D.1.a.. El objeto de este estudio es evaluar la influencia de los cambios agudos de la concentración de sodio en la sangre de la vena porta, en ausencia de cambios en la concentración de Cl, sobre la excreción de electrolitos y de agua por el riñón. Para ello se infundió una solución de $SO_4 Na_2$ (430 mmol/l) con una concentración de sodio similar a la de la solución de ClNa 855 mM, utilizada en las experiencias anteriores. A tres de estos perros se les infundió la solución mencionada en la vena porta y a otros tres en una vena cubital de una pata durante 30 min, a una velocidad de 0.05

TABLA D.1.C.: Valores basales de distintos parámetros de la función renal de los perros que recibieron una infusión hiperosmolar de SO_4Na_2 430 mM en la v.porta y en una v. cubital.

GRUPO	PESO kg	C_{In} ml/min/kg	C_{PAH} ml/min/kg	FF %	U_{NaV} uM/min/kg	U_{CLV} uM/min/kg	\dot{V}_u ul/min/kg	FE_{Na} %	FE_{CL} %
<u>INF. PORTA:</u>									
(n=3)	\bar{X} : 18	1,4	3,93	0,34	0,45	0,54	6,41 [#]	0,24	0,42
	\pm eem	1,9	0,56	0,05	0,28	0,17	1,3	0,14	0,11
<u>INF. CUBITAL:</u>									
(n=3)	\bar{X} : 20,3	2,2	5,7	0,39	0,27	0,53	12,1	0,08	0,23
	\pm eem	3,2	0,33	0,04	0,09	0,07	1,9	0,02	0,03

$P < 0,05$, entre los dos grupos de perros (test t de Student para datos no emparejados).

Abreviaturas pag. viii.

ml/min/kg de peso. Los resultados se expresan al igual que en los grupos anteriores (D.1.b.), como variaciones, en números absolutos, respecto a los valores del parámetro respectivo en el basal.

En la tabla D.1.c. se exponen los valores basales de los parámetros más importantes de la función renal, que han sido analizados en estas experiencias, corregidos por el peso de cada perro. Se puede observar que durante el período basal, tanto los perros que recibieron la infusión de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ en la VP como los que la recibieron en la VC no presentaron diferencias significativas entre estos parámetros.

Así también, se puede observar que estos valores son de una magnitud similar a los que mostraban los perros utilizados en otras experiencias (ver tablas D.1.b. y D.1.d.) realizadas en este trabajo.

La excreción de sodio experimentó un aumento agudo y muy significativo respecto al basal, como consecuencia de la infusión de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ hipertónico, tanto intraportal como sistémicamente (Fig. D.1.c.1.). Estos aumentos fueron bastante más superiores en los perros que recibieron la solución en la VC. Sin embargo, no hubo diferencias entre los aumentos registrados como consecuencia de la infusión en una u otra vena. La excreción de sodio se mantuvo elevada una vez finalizada la infusión hipertónica, hasta el final de la experiencia. La magnitud de estos aumentos, en $\mu\text{mol}/\text{min}$. en su pico máximo, fue muy superior a la observada en $U_{\text{Na}} \text{V}$, como consecuencia de la infusión de otras soluciones de electrolitos isotónicas a la de sulfato sódico (ver fig. D.1.b.1 y fig. D.1.d.1., respectivamente). Los aumentos, en las excreciones de cloro y de potasio (fig. D.1.c.1.) durante y después de la infusión hipertónica $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 430 mM, fueron significativos respecto al basal, y similares en los perros infundidos en la VP y en la VC. Estos aumentos fueron bastante inferiores a los observados en la excreción de sodio.

Si se comparan las variaciones, en ml./min., en la filtración glomerular, valorada mediante el aclaramiento de inulina, y en el flujo plasmático renal, estimado mediante el C_{PAH} (fig. D.1.c.2.) se puede decir que, tanto los perros que reciben el $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ en la VP, como los que lo reciben en la VC, no presentan cambios significativos en estos parámetros respecto a los valores que poseían previamente a la infusión hipertónica y que las variaciones que se observan son similares, tanto para los perros infundidos en una u otra vena. Las variaciones, en la fracción de filtración, muestran la ausencia de cambios significativos respecto al basal, tanto en los perros que recibieron la solución hipertónica intraportal como sistémicamente, y el paralelismo de las respuestas observadas como consecuencia de la administración en una y otra vena.

En la fig. D.1.c.3. se exponen, en % de variación respecto al basal, la excreción fraccional de sodio y de cloro. Como consecuencia de la administración de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 430 mM, la FE_{Na} aumentó, clara y muy significativamente respecto al basal, estos aumentos fueron sin embargo mayores durante la infusión en VC, aunque no hubo diferencias significativas entre las respuestas por ambas vías. Una vez finalizada la infusión, este parámetro fue disminuyendo, aunque se mantuvo significativamente elevado. La infusión hiperosmolar también produjo aumentos significativos en la FE_{Cl} , aunque comparativamente inferiores a los de la FE_{Na} . Dentro de este rango menor, los aumentos en la excreción fraccional de cloro fueron paralelos a los de la de sodio, y similares por una u otra vía de administración de la solución hipertónica.

Se han analizado los cambios en % de variación respecto al basal, en la relación $U_{\text{K}} \text{V} / U_{\text{Na}} \text{V}$, corregida por $U_{\text{K}} \text{V} + U_{\text{Na}} \text{V}$, que se exponen en la fig. D.1.c.4., observándose un descenso agudo y muy significativo en este parámetro como consecuencia de la administración intravenosa de sulfato sódico y de idéntica magnitud, tanto si se realiza intraportal como sistémicamente.

El flujo urinario, así como el aclaramiento osmolar (Cosm) (fig. D.1.c.5.) aumentaron significativamente respecto al basal al realizar la infusión hipertónica de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$. Estos aumentos fueron similares como consecuencia de la administración intraportal o sistémica. Los incrementos observados en estos parámetros se mantuvieron significativamente elevados durante los períodos postinfusión, disminuyendo lentamente hacia el término de la experiencia. El aclaramiento de agua libre aumentó significativamente después de la infusión hiperosmolar, aunque no hay diferen-

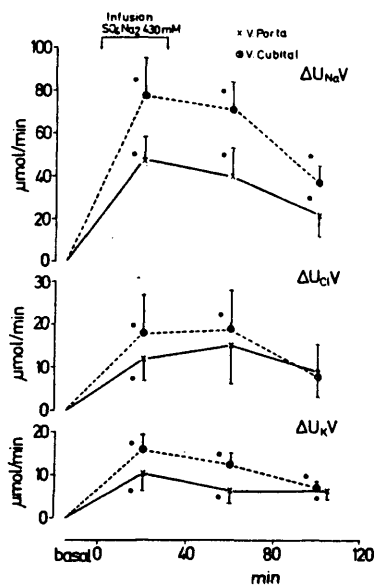


Fig. D.1.c.1.— Cambios respecto a los valores basales (Δ) en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}), de cloro (U_{ClV}) y de potasio (U_{KV}), después de la infusión de sulfato sódico hipertónico, durante 30 min., en la VP y en una VC (símbolos en la figura).

Los resultados se expresan como media \pm eem.

- * $p < 0,05$ respecto al valor basal (test. t. de Student para datos emparejados).
- * $p < 0,05$ respecto a la otra vía de infusión (test. t. de Student para datos no emparejados).

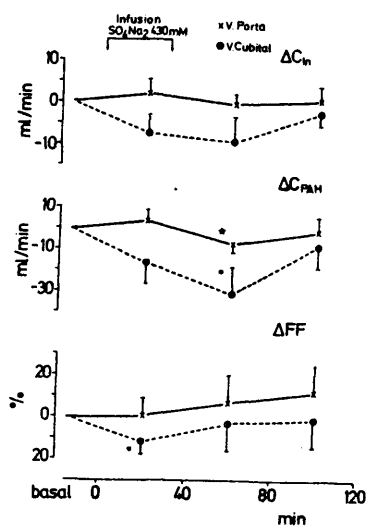


Fig. D.1.c.2.— Cambios respecto a los valores basales (Δ) en el aclaramiento de inulina (C_{IN}) y de PAH (C_{PAH}) y porcentaje de cambio respecto al valor basal de la fracción de filtración (FF); otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

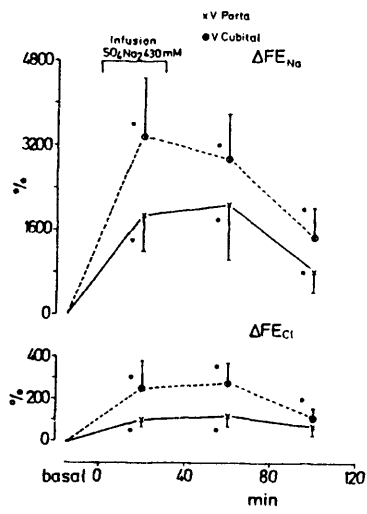


Fig. D.1.c.3.— Porcentaje de aumento (Δ) respecto a los valores basales de la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}) y de cloro (FE_{Cl}); otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

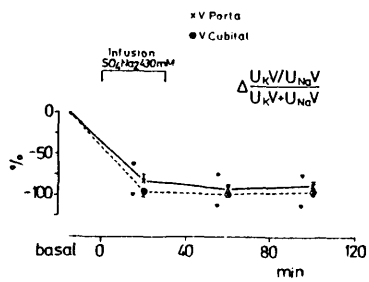


Fig. D.1.c.4.— Porcentaje de cambio (Δ) respecto a los valores basales de la fracción $U_KV / U_{Na}V$ corregida por la oferta distal de sodio: $U_KV + U_{Na}V$; otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

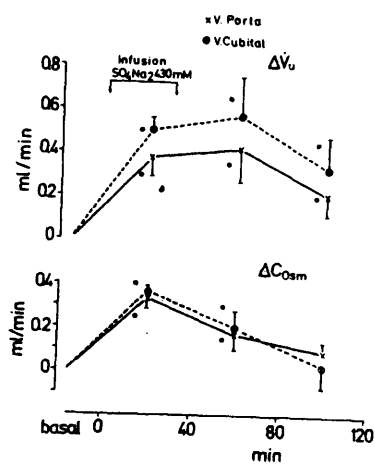


Fig. D.1.c.5.— Cambios respecto a los valores basales en el volumen urinario (\dot{V}_u) y en el aclaramiento osmolar (C_{osm}); otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

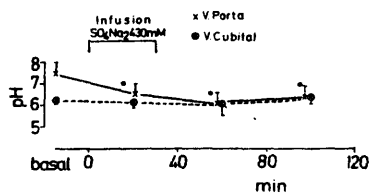


Fig. D.1.c.6.— Valores del pH en la orina, antes y después de la infusión de sulfato sódico hipertónico en la vena porta y en una vena cubital; otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

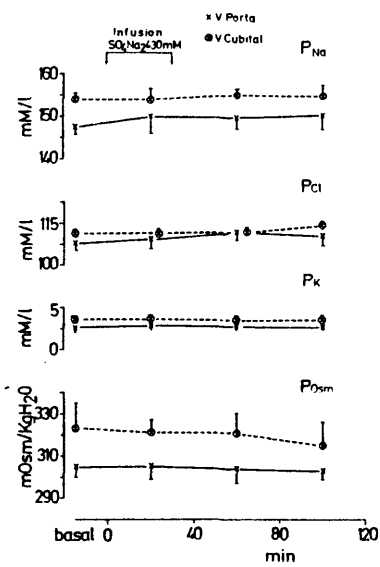


Fig. D.1.c.7.- Valores de las concentraciones plasmáticas de sodio (P_{Na}), cloro (P_{Cl}) y potasio (P_K) y de la osmolalidad en plasm, antes y después de la infusión de sulfato sódico hipertónico en la vena porta y en la vena cubital; otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

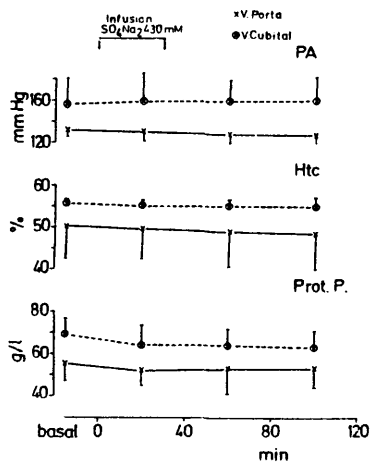


Fig. D.1.c.8.- Valores de la presión arterial, hematocrito y proteínas plasmáticas, antes y después de la infusión de sulfato de sodio hipertónico por una y otra vía; otras explicaciones en la fig. D.1.c.1.

cias significativas entre los perros que reciben la solución en VP con respecto a los de los que la reciben en VC.

Los valores del pH en la orina disminuyeron, aunque sólo lo hicieron significativamente después de la administración intraportal de la solución. No hay diferencias entre los valores de este parámetro en relación con la vía de administración de la solución de sulfato (fig. D.1.c.6.).

Los valores de la concentración plasmática de los electrolitos, sodio, potasio, cloro y de la osmolalidad, no se vieron alterados como consecuencia de la infusión de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ por ninguna de las dos vías (fig. D.1.c.7.). Asimismo no se observaron diferencias entre estos parámetros, entre los dos conjuntos de perros. La presión arterial (fig. D.1.c.8.) monitorizada a lo largo de las experiencias, no varió como consecuencia de la infusión hiperosmolar. Igualmente, el flujo sanguíneo renal, registrado también a lo largo de las pruebas, mostró ligeras variaciones, no significativas, coincidentes con las del FPR, corregidas por el valor hematocrito. Este último y las proteínas plasmáticas tampoco variaron a lo largo de las experiencias, según se muestra en la fig. D.1.c.8.

D.1.d. Papel específico del cloro: Infusión intraportal de una solución de monoclóhidrato de L-Arginina (855 m mol/l.).

Este estudio se ha llevado a cabo en diez perros preparados para experiencias de aclaramiento, como en los grupos anteriores y siguiendo el esquema experimental detallado en la fig. D.1.a. En este grupo se han estudiado comparativamente las respuestas renales a la infusión de una solución de monoclóhidrato de L-Arginina 18% (855 mmol/l.) en la vena porta y en una vena periférica. El objeto de estas experiencias es evaluar la influencia de los cambios agudos en la sangre portal de la concentración de iones cloruro, en ausencia de cambios en la concentración de Na^+ , sobre la excreción renal de agua y de electrolitos. Para ello, la solución que se infunde posee una concentración de iones cloruro similar a la de cloruro sódico 855 mM, pero carece por completo de sodio. A cinco de estos perros se les infunde la solución mencionada, a una velocidad de 0,05 ml./min. kg. de peso durante 30 min., en la vena porta y a otros cinco en la vena cubital. Los resultados se expresan como en los grupos anteriores, salvo lo que se mencione de un modo específico.

En la tabla D.1.d. se resumen las medias de los valores basales del conjunto de parámetros de la función renal, que fundamentalmente han sido valorados en este estudio. De estos datos se puede decir que los valores basales de las excreciones de electrolitos, flujo urinario, filtración glomerular y flujo plasmático renal, entre otros, no fueron diferentes entre los perros que recibieron la infusión hiperosmolar en la VP, con respecto a los que la recibieron en la VC. Asimismo si se comparan estos datos con los de otros grupos anteriores, se puede observar que hay una gran homogeneidad en cuanto a condiciones basales de las que parten los perros en los que se realizan las experiencias.

Los cambios respecto a los valores basales en la excreción renal de electrolitos como consecuencia de la infusión de Cl Arg hipertónico se exponen en la fig. D.1.d.1. Durante la infusión intraportal de esta solución, la excreción de sodio experimentó un marcado y significativo aumento respecto al basal. Este incremento fue a su vez significativamente mayor que el observado durante la infusión VC. En los períodos post-infusión, tanto intraportal como sistémica, la excreción de sodio aumentó significativamente, pero de igual magnitud en ambas series de perros. La excreción de cloro aumentó también significativamente respecto al basal, durante y después de la administración de ClArg, y de un modo similar en los perros que la recibieron intraportal como en los que la recibieron en una VC. En los períodos post-infusión, tanto por una vía como por otra, la excreción de potasio aumentó progresivamente y de modo significativo. Los aumentos después de la infusión cubital fueron mayores significativamente que los observados después de la infusión intraportal.

En la fig. D.1.d.2. se representan entre otros los cambios en la tasa de filtración glomerular y en el flujo plasmático renal. Durante la infusión hipertónica de ClArg, tanto portal como sistémica, la FG permaneció inalterada. Sin embargo después de la infusión en la VC, la FG aumenta

TABLA D.1.d.: Valores basales de distintos parametros de la función renal de los perros que recibieron una infusión hiperosmolar de CLHAg 855 mM en la v.porta y en la v.cubital.

GRUPO	peso	C _{In}	C _{PAH}	FF	U _{Na} V	U _{CL} V	V _u	FE _{Na}	FE _{CL}
PERROS:	kg	ml/min/kg	ml/min/kg	†	uM/min/kg	uM/min/kg	ul/min/kg	†	†
<u>INF. PORTA</u>									
(n=5)	\bar{X} 25	1,36	3,72	0,4	0,33	0,61	11,3	0,22	0,5
	± eem 1,5	0,23	0,5	0,02	0,12	0,18	2,95	0,07	0,1
<u>INF. CUBITAL</u>									
(n=5)	\bar{X} 24	1,54	4,82	0,33	0,6	1,4	45	0,26	0,8
	± eem 2,4	0,18	0,91	0,03	0,25	0,41	13	0,06	0,13
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(test t de Student, para datos no emparejados)									

de un modo significativo y estos incrementos fueron superiores a los cambios registrados en este mismo parámetro después de la infusión en la VP. El FPR no varió significativamente durante la infusión de ClArg, después de la infusión de esta solución en la VP disminuyó ligeramente, mientras que, después de la infusión sistémica se observaron ligeros aumentos no significativos respecto al basal. En esta misma figura se representan los cambios en la fracción de filtración, en % de variación respecto al basal. Este parámetro aparece aumentado significativamente sólo en el conjunto de perros que recibieron el cloruro Arg hipertónico en la vena cubital. El flujo sanguíneo renal izquierdo y la PA, controlados ambos a lo largo de la experiencia y registrados en la misma gráfica, no variaron sustancialmente como consecuencia de la infusión hipertónica en ninguna de las dos vías.

Las medias de los valores absolutos (%) de la excreción fraccional de sodio se presentan en la fig. D.1.d.3. La administración de ClArg 18%, tanto en la VP como en la VC, produce aumentos en este parámetro que son significativos respecto al basal. Si estos aumentos se expresan en % de variación respecto al valor basal de FE_{Na} para cada perro, se puede observar que la infusión intraportal de ClArg produce unos incrementos en FE_{Na} que son significativamente superiores a los que induce la misma solución al infundirla en una vena cubital. En la fig. D.1.d.4. se exponen los cambios en % de variación respecto al basal de la excreción fraccional de cloro. La solución de ClArg produce aumentos en este parámetro que son significativos respecto al basal, al administrarla tanto en la VC como en la VP. Pero FE_{Cl} aumentó significativamente más después de la infusión intraportal, que después de la infusión sistémica. Los efectos de la administración de ClArg en el flujo urinario, el aclaramiento osmolar y en el de agua libre, se presentan en la fig. D.1.d.5. Cuando ClArg se infundió en la VP el \dot{V}_u aumentó de modo significativo y de forma brusca, continuando elevado en los períodos siguientes, una vez acabada la infusión. Sin embargo, los perros que reciben esta solución en la VC presentaron aumentos significativos en \dot{V}_u sólo durante el tiempo que duró la infusión. El C_{osm} aumentó también durante la infusión de ClArg, tanto en una vena como en otra, siendo significativamente mayor el aumento en los perros que recibieron la infusión en la porta; en los períodos post-infusión, los incrementos de este parámetro fueron similares en los dos grupos de perros. Durante la infusión hiperosmolar se produjeron aumentos en el C_{H_2O} , similares para las dos vías de administración.

En la fig. D.1.d.6. se representan las variaciones, en forma de porcentaje de cambio respecto al valor del parámetro en el período basal, de la relación U_{KV} / U_{NaV} , corregidas por la oferta distal de sodio $U_{NaV} + U_{KV}$. La infusión de ClArg, tanto intraportal como sistémica, produce una disminución significativa de este índice respecto al basal, que es de una magnitud similar en ambos casos.

En la fig. D.1.d.7. se representan los valores observados en las concentraciones plasmáticas de sodio, cloro y potasio basalmente y a lo largo de las experiencias. Se puede observar unas variaciones similares en estos parámetros tanto si la solución de cloruro de arginina se infunde en la vena porta como en una vena cubital. P_{Cl} y P_K aumentaron significativamente respecto al basal después de la infusión de ClArg, mientras que P_{Na} sólo varió respecto al basal en el último período post-infusión cubital.

Los valores de la osmolaridad y de la concentración de proteínas plasmáticas (fig. D.1.d.8.) sólo variaron de un modo significativo respecto al basal en los dos últimos períodos post-infusión portal de ClArg, mientras que, no se observan alteraciones después de la infusión cubital. El valor hematocrito disminuyó ligeramente sólo durante la infusión sistémica. No se observaron diferencias significativas en los valores de los parámetros anteriormente mencionados entre las dos series de perros.

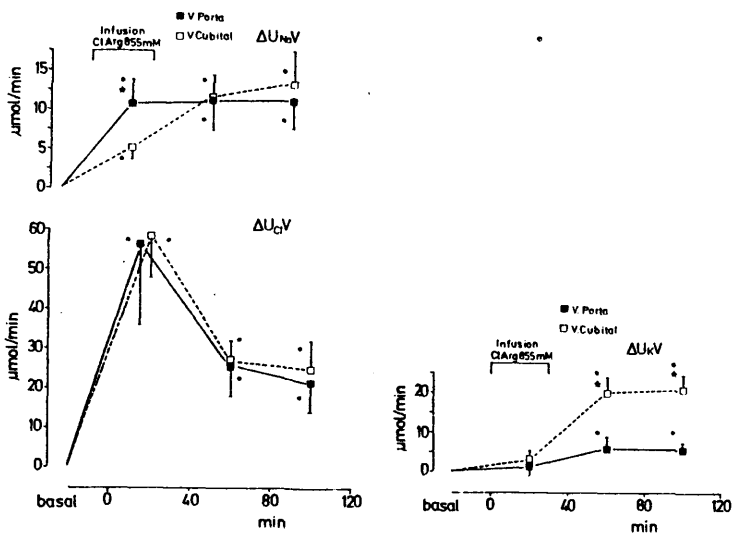


Fig. D.1.d.1.- Cambios respecto a los valores basales (Δ) en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}), de cloro (U_{ClV}) y de potasio (U_{KV}), después de la infusión de una solución de monoclóhidrato de L-Arginina hiperosmolar en la vena porta y en la vena cubital (símbolos en la figura).

Los resultados se expresan como media \pm eem.

- ● $p < 0,05$, respecto al valor basal (test t. de Student para datos emparejados).
- ★ $p < 0,05$, respecto a la otra vía de infusión (test t. de Student para datos no emparejados).

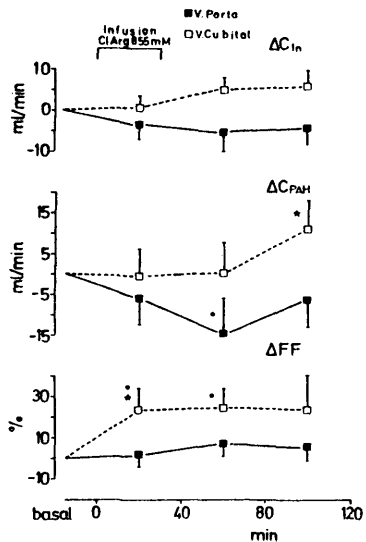


Fig. D.1.d.2.- Cambios respecto a los valores basales (Δ) en el aclaramiento de inulina (C_{In}) y de PAH (C_{PAH}) y porcentaje de cambio respecto al basal de la fracción de filtración (FF); otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

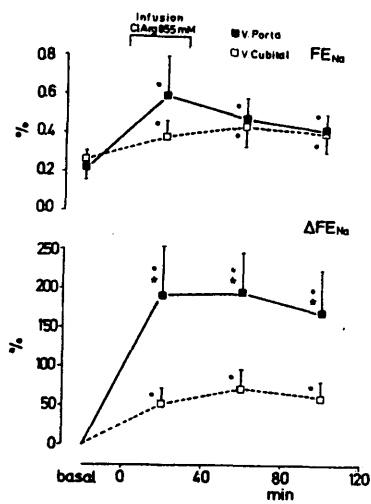


Fig. D.1.d.3.— Cambios respecto al valor basal (Δ) en la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}) y porcentaje de cambio, también respecto al basal del mismo parámetro; otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

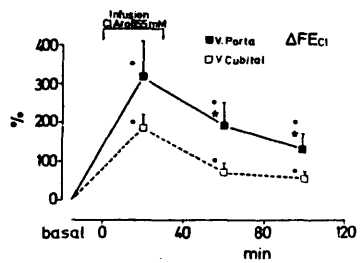


Fig. D.1.d.4.— Porcentaje de cambio respecto al valor basal de la excreción fraccional de cloro (FE_{Cl}); otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

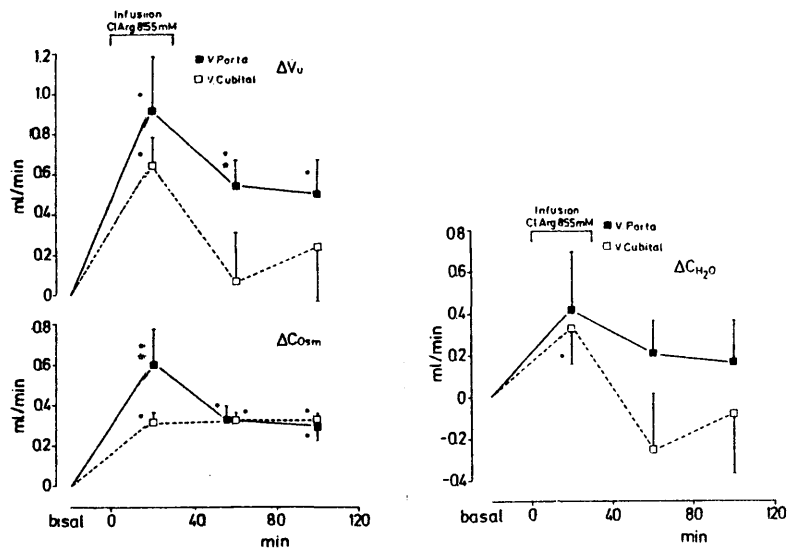


Fig. D.1.d5.— Cambios respecto a los valores basales en el volumen urinario (\dot{V}_U), y en el aclaramiento osmolar (C_{osm}) y le agua libre (C_{H_2O}); otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

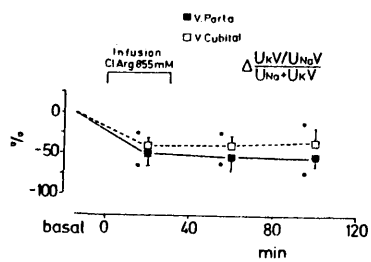


Fig. D.1.1.6.— Porcentaje de cambio respecto al valor basal de la fracción $U_K V / U_{Na} V$ corregida por la oferta distal de sodio $U_K V + U_{Na} V$; otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

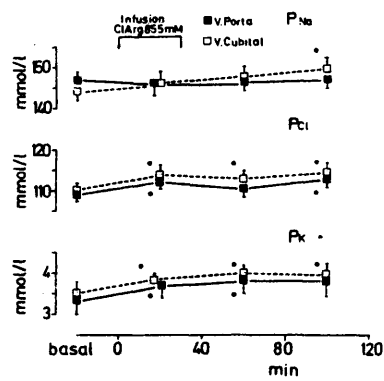


Fig. D.1.d.7.— Valores de las concentraciones plasmáticas de sodio (P_{Na}), de cloro (P_{Cl}) y de potasio (P_K) antes y después de la infusión de cloruro de L-Arginina hipertónico en la vena porta y en una vena cubital; otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

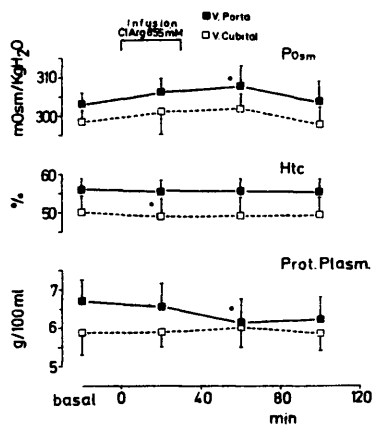


Fig. D.1.d.8.— Valores de la osmolaridad en plasma, del valor hematocrito y de las proteínas plasmáticas, antes y después de la infusión de cloruro de L-Arginina hipertónico en la vena porta y en una vena cubital; otras explicaciones en la fig. D.1.d.1.

D.2. Respuestas renales a cambios en la osmolaridad de la sangre de la vena porta, mediante la infusión de una solución hiperosmolar de azúcares.

El objetivo de este estudio es evaluar la influencia específica de los cambios agudos en la osmolaridad de la sangre portal, como consecuencia de infusiones de soluciones no electrolíticas, sobre la excreción renal de agua y de sal. Estas experiencias se han llevado a cabo en 10 perros preparados para aclaramiento, como en los grupos anteriores y siguiendo el esquema experimental expuesto en fig. D.1.a. En este grupo se han estudiado comparativamente las respuestas renales a la infusión de una solución hiperosmolar de D-glucosa al 25%, en ClNa 0,9%, o de sacarosa al 50% en ClNa 0,9% (1.800–2.100 mOsm/Kg. de agua, respectivamente) en la vena porta y en una vena cubital.

La solución que se infundió en estos perros, tiene una osmolaridad similar a la de la solución de ClNa 855 mM pero sin la presencia de electrolitos. A cinco de estos perros se les infundió la solución mencionada, a una velocidad de 0,05 ml./min./kg. de peso, 30 min., en la vena porta y a otros cinco en una vena cubital, según se explicó en el apartado C.1.e.

Los resultados se han analizado para cada ríñón por separado y se expresan como diferencias del valor de cada parámetro en un período experimental, respecto a la media del valor del mismo parámetro, en los períodos controles (Basal) (fig. D.1.a.).

En la tabla D.2.1. se exponen las medias \pm eem de los valores en la etapa basal de los parámetros más significativos de la función renal. Se puede decir que aunque dentro de cada experimento individual hubo diferencias, la media de los mismos no son diferentes entre los dos grupos, salvo una ligera diferencia estadística en los valores del CPAH.

La infusión i.v. de una solución hiperosmolar de azúcares, indistintamente si se realiza en la VP o en la VC, produce unos aumentos significativos en la excreción de sodio, que al menos durante los 40 primeros min., son de magnitud similar a los que producía la infusión de ClNa 855 mM en la VP (fig. D.1.b.1.). La respuesta natriurética a la administración de los azúcares hiperosmolares, disminuye en los siguientes períodos post-infusión, aunque se mantiene bastante elevada. (fig. D.2.1.).

La infusión de pequeñas cantidades de esta solución de azúcares en la VP produce un aumento significativo en la excreción de cloro (fig. D.2.1.) y de potasio, que disminuye lentamente en los períodos post-infusión. Sin embargo, esta misma solución de azúcares por vía sistémica no produce apenas aumentos en estos parámetros.

La filtración glomerular y el flujo plasmático renal aumentaron más en los perros a los que se infunden los azúcares en la vena VP, que cuando se hace en una VC. Este último caso, las variaciones respecto al basal no fueron apreciables (fig. D.2.2.). La fracción de filtración presentó un significativo aumento entre los 30 min. y 60 min. de finalizada la infusión en la vena porta, mientras que no se alteró en los perros que recibieron la infusión en una VC.

Se puede resaltar que la solución hiperosmolar de azúcares administrada intraportalmente produce aumentos significativos y similares en V_u y Cosm ($\Delta = +0,6$ ml./min.). Esta misma solución infundida en una VC produce también aumentos significativos en V_u ($\Delta = +0,2$ ml./min.) y en el Cosm ($\Delta = +0,3$ ml./min.) aunque de menor magnitud. Sin embargo no hay diferencias significativas, entre las respuestas a la infusión por una u otra vena (fig. D.2.3.).

La excreción fraccional de sodio aumentó de modo significativo después de la infusión de la solución de azúcares en la VC (fig. D.2.4.). Estos aumentos fueron superiores a los observados durante la administración de la misma solución en la vena porta, sólo hubo diferencias significativas hacia el final de las experiencias (120 min.). La infusión de azúcares, tanto en la VP como en la VC, causa, aumentos en la FE_{Cl} .

Las concentraciones de sodio y cloro y la osmolaridad en plasma a lo largo de las experiencias, fueron similares para los dos grupos de perros (fig. D.2.5.).

Las proteínas plasmáticas, PA y hematocrito, presentaron ligeras variaciones a lo largo de las experiencias, siendo similares los valores para los dos grupos de perros (fig. D.2.6.).

TABLA. D.2.1. VALORES BASALES DE DISTINTOS PARAMETROS DE LA FUNCION RENAL DE LOS PERROS QUE RECIBIERON UNA INFUSION HIPERMOLAR DE AZUCARES EN LA V. PORTA Y EN UNA V. CUBITAL.

GRUPO DE PERROS	Peso	C _{In}	C _{PAH}	FF	U _{Na} V	FE _{Na}	FE _{CL}	V _u	Cosm	C _{H₂O}
	kg	ml/min/kg	ml/min/kg	§	umol/min/kg	§	§	ul/min/kg	ul/min/kg	ul/min/kg
<u>INF. PORTA</u>	\bar{x} : 22	1,74	5,06*	0,34	0,57	0,21	0,34	20,2	18,2	-1,8
(n=5)	\pm eem 2,2	0,16	0,45	0,05	0,27	0,08	0,11	3,4	7	6
<u>INF. CUBITAL</u>	\bar{x} : 25,2	1,54	3,57	0,42	0,33	0,13	0,23	23	14,2	-8,9
(n=5)	\pm eem 2,63	0,29	0,52	0,04	0,11	0,03	0,06	2,8	2,6	2,5

* p<0,05 , entre los dos grupos de perros (Test "t" de Student para datos no emparejados).

Abreviaturas pag. viii

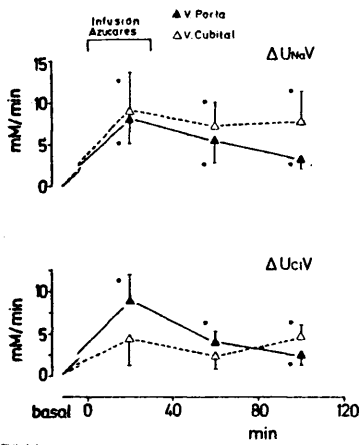


Fig. D.2.1.— Cambios respecto a los valores basales (Δ) en la excreción urinaria de sodio ($U_{Na}V$) y de cloro ($U_{Cl}V$), después de la infusión en la vena poria y en una vena cubital de una solución hiperosmolar de azúcares; isosmótica a las de los electrolitos utilizados en las experiencias anteriores (símbolos en la figura).

- Los resultados se expresan como media \pm eem.
- * $p < 0,05$, respecto al valor basal (test t de Student, para datos emparejados).
- * $p < 0,05$, respecto a la otra va de infusión (test t de Student, para datos no emparejados).

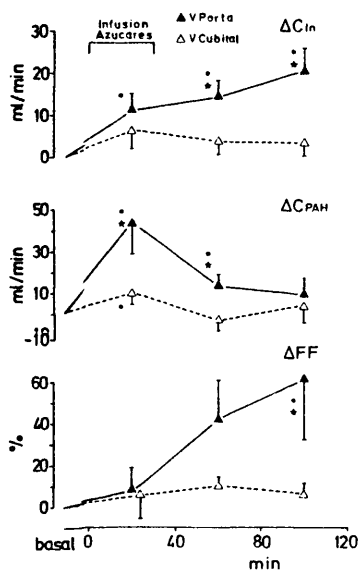


Fig. D.2.2.— Cambios respecto a los valores basales (Δ) en el aclaramiento de inulina (C_{I_n}) y de PAH (C_{PAH}), y porcentaje de cambio respecto al basal de la fracción de filtración (FF); otras explicaciones en la fig. D.2.1.

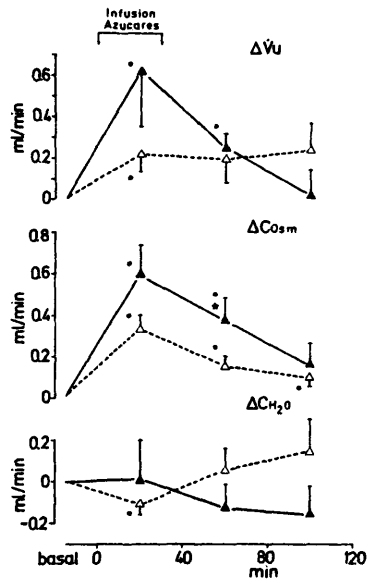


Fig. D.2.3.— Cambios respecto a los valores basales en el volumen urinario (V_u), y en el aclaramiento osmolar (C_{osm}) y de agua libre (CH_2O); otras explicaciones en la fig. D.2.1.

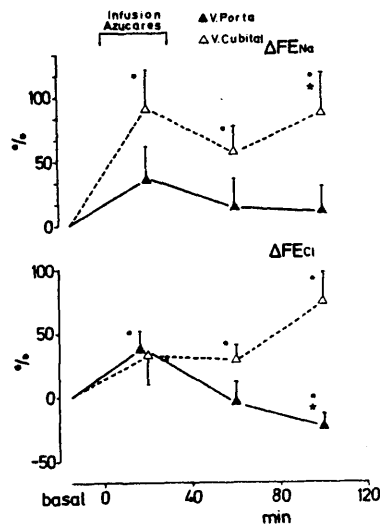


Fig. D.2.4.— Porcentaje de cambio respecto a los valores basales de la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}) y de cloro (FE_{Cl}); otras explicaciones en la fig. D.2.1.

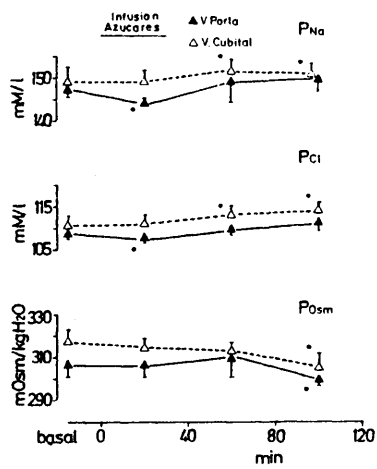


Fig. D.2.5.— Valores de las concentraciones plasmáticas de sodio (P_{Na}), de cloro (P_{Cl}) y de la osmolalidad en plasma, antes y después de la infusión de una solución hiperosmolar de azúcares en la vena porta y en una vena cubital; otras explicaciones en la fig. D.2.1.

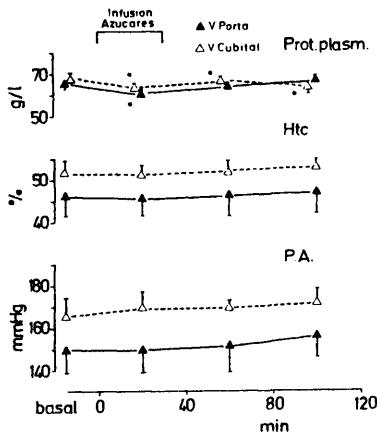


Fig. D.2.6.— Valores de la concentración de proteínas plasmáticas, del valor hematocrito y de la presión arterial, antes y después de la infusión de una solución hiperosmolar de azúcares en la vena porta y en una vena cubital; otras explicaciones en la fig. D.2.1.

D.3. Papel de un factor humoral en el aumento específico de la excreción de sodio, causado por la infusión de soluciones hiperosmolares de electrolitos en la vena porta.

En estas experiencias se ha planteado profundizar en el estudio de los posibles mecanismos que están implicados en la mayor respuesta natriurética que tiene lugar al infundir (apartados D.1.b. y D.1.d.) una solución salina hiperosmolar en la vena porta, con respecto a la infusión de la misma solución en una vena cubital. Entre los mecanismos propuestos está postulada la mediación de un factor humoral, de características no delimitadas y de posible origen hepático (291).

En este apartado se ha estudiado la presencia de actividad natriurética, mediante bioensayos (perros y ratas), en el plasma suprahepático, plasma arterial sistémico y orina, que pueda correlacionarse con los aumentos específicos en la $U_{Na}V$ que tienen lugar al infundir una solución de ClNa 855 mM en el territorio porta. Se ha caracterizado esta actividad, investigando por un lado la presencia de una sustancia humoral responsable de la misma y alguna de las propiedades fisicoquímicas de la mencionada sustancia, la comparación de estas propiedades con respecto a las de otros factores natriuréticos estudiados por otros autores. Asimismo se ha estudiado la posibilidad de su origen hepático, y su presencia a nivel circulante, y se ha planteado un posible papel de la misma en la respuesta natriurética específica a las infusiones salinas en la VP.

D.3.a. Estudio de la actividad natriurética en el plasma suprahepático después de la infusión intraportal de ClNa hipertónico.

El objeto de estas experiencias es investigar la presencia de actividad natriurética en la sangre que sale del hígado en el momento de la máxima excreción renal de sodio inducida por la infusión aguda de una pequeña cantidad de ClNa 855 mM en la vena porta.

Las experiencias se han llevado a cabo en ocho perros, anestesiados y preparados para técnicas de aclaramiento, según la metodología general expuesta en los apartados C.1.e. y C.2.b. Los animales fueron subdivididos en dos subgrupos, de 4 perros cada uno. En el grupo D.3.a.1. además de canularles la vena porta, como se realizó en las experiencias descritas en D.1. y D.2., mediante la colocación de un catéter de polietileno (PE 50) en una vena mesentérica secundaria, se les colocó en la vena suprahepática otro catéter de polietileno, de 12", intravenosamente (Trocaflex 125/20, Vygon, Francia) sujeto mediante una sutura circular a la pared de la vena (sutura monofilamento, Ethibond W 6935), sin interrupción del flujo sanguíneo, (fig. D.1.). A los animales del grupo D.3.a.2. se les aisló la arteria renal izquierda (ARI), y se les introdujo en su luz un catéter fino de polietileno (PE 50) mediante una punción; éste se fijaba a la pared de la arteria mediante una sutura circular (Ethibond W 6936), de tal modo que el catéter no alteró la circulación sanguínea, y permitió la infusión de muestras para ver su acción sobre ese riñón de un modo específico.

El procedimiento experimental utilizado, se esquematiza en la fig. D.3.a. y ha sido el siguiente: A los animales del grupo D.3.a.1. se les infundió una solución de ClNa 855 mM en la vena porta, a una velocidad de 0,05 ml./min. kg. de peso, 30 min., mediante una bomba de infusión continua y se extrajeron dos muestras de sangre suprahepática, de 40 ml. cada una, la primera (SH_1) antes de la infusión hipertónica intraportal y la segunda a los 50 min. de finalizada dicha infusión (SH_2) y coincidiendo con la máxima respuesta natriurética observada (ver fig. D.1.b.1. y D.3.a.1.1.). Una vez centrifugadas las muestras de sangre, a 4 °C, 2.800 rpm, durante 15 min.; unos 15 ml. de plasma se completaron con 5 ml. de tampón Ringer, y se almacenaron congelados a -20 °C hasta el día de su bioensayo.

Las muestras SH_1 y SH_2 fueron bioensayadas en los perros del grupo D.3.a.2. del modo siguiente (fig. D.3.a.): Una vez finalizada la preparación quirúrgica y realizados dos periodos de aclaramiento control, de 20 min. cada uno, SH_1 se infundió en la arteria renal izquierda (ARI)

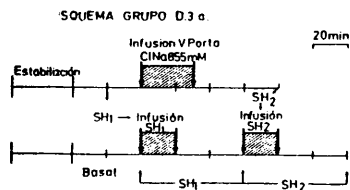


Fig. D.3.a.— Protocolo experimenta utilizado para el estudio de la actividad natriurética en el plasma suprahepático después de la infusión intraportal de ClNa 855 mM. La infusión de los plasmas SH se realizó en la arteria renal izquierda de un perro. El área rayada corresponde a periodos de infusión.

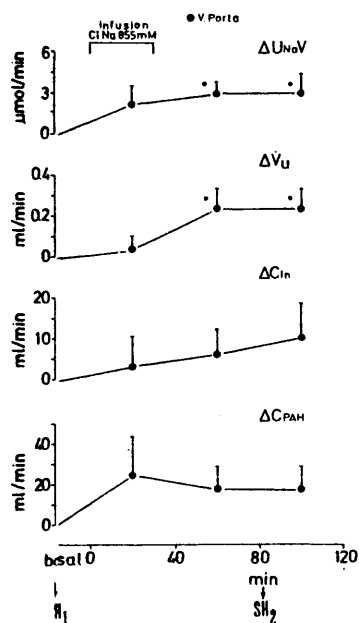


Fig. D.3.a.1.1.— Cambios respecto los valores basales en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}), volumen urinario (V_U), y en el aclaramiento de inulina (C_{IN}) y de PAH (C_{PAH}); después de la infusión en la vena porta de una solución de ClNa hipertónico (símbolos en la figura).

- Los resultados se expresan como media \pm eem.
- * $p < 0,05$, respecto al valor respectivo en el basal (test t de Student para datos emparejados).

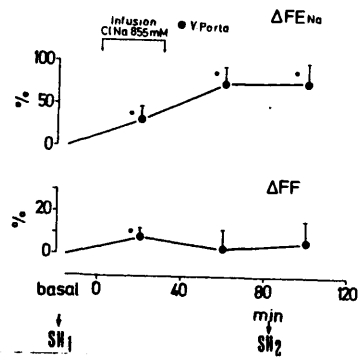


Fig. D.3.a.1.2.— Porcentaje de cambio respecto a los valores basales de la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}) y de la fracción de filtración (FF); otras explicaciones en la fig. D.3.a.1.1.

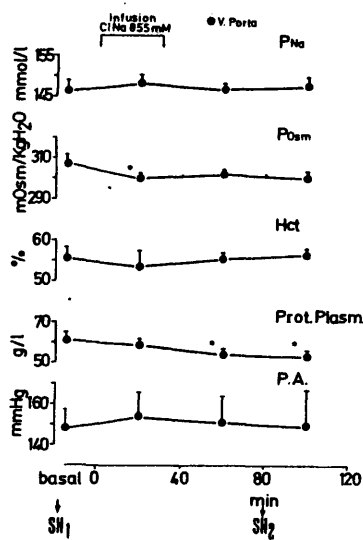


Fig. D.3.a.1.3.— Valores de la concentración plasmática de sodio (P_{Na}), de proteínas, de la osmolalidad en plasma (P_{osm}), del valor hematocrito, y de la presión arterial, antes y después de la infusión de ClNa hipertónico en la vena porta; otras explicaciones en la fig. D.3.a.1.1.

de estos perros, a una velocidad de 1 ml./min, durante 20 min. Esto fue seguido por dos períodos de aclaramiento, de 20 min. cada uno. Seguidamente SH₂ se infundió en la ARI, a la misma velocidad y tiempo que la muestra anterior, y se realizaron posteriormente otros dos períodos de aclaramiento post-infusión-SH₂.

Los resultados han sido analizados para cada riñón por separado, y se expresan en porcentaje de variación, respecto a la media de los valores de cada parámetro en el período basal. Por lo tanto, el control de cada parámetro en cada perro, es su respectivo valor en el período basal.

En las fig. D.3.a.1.1., D.3.a.1.2., se exponen los cambios en las respuestas renales de los perros del grupo D.3.a.1. inducidos por la infusión en la vena porta de ClNa 855 mM, y a los que se les ha extraído las muestras de sangre SH, según se ha comentado anteriormente. La excreción urinaria de sodio (μ mol/min.) y el flujo urinario (ml./min.) aumentaron significativamente respecto a los valores en el basal a los 30 y 70 min. de haber finalizado la infusión hipertónica intraportal. La segunda muestra de sangre suprahepática (SH₂) se extrajo en la mitad de esta respuesta natriurética aumentada. La tasa de filtración glomerular y el flujo plasmático renal, valorados por el C_{In} y de Cp_{AH}, respectivamente, aumentaron ligeramente, pero de forma no significativa, respecto al basal. La infusión intraportal de salino hipertónico produjo también aumentos, significativos respecto al basal, en la excreción fraccional de sodio. La fracción de filtración aumentó significativamente sólo durante la infusión portal, manteniéndose posteriormente alrededor de los valores basales. La infusión de esta solución hipertónica y la extracción de las muestras de sangre suprahepática no indujeron cambios relevantes, respecto a los valores basales, en la osmolaridad del plasma, en las concentraciones plasmáticas de sodio, de proteínas, en el valor hematocrito ni en la presión arterial (fig. D.3.a.1.3.).

Los resultados del grupo experimental D.3.a.2., correspondientes al bioensayo de las muestras de plasma SH₁ y SH₂, se expresan en % de variación respecto al valor del parámetro respectivo en el basal (Δ %). Los datos representados en las figuras son la media \pm eem, de estos valores para cada parámetro, durante la correspondiente infusión de plasma-SH y los dos períodos siguientes de aclaramiento post-infusión.

Los aumentos en la excreción de sodio, durante y después de las infusiones de los plasmas SH₁ y SH₂ en la ARI, se representan en la fig. D.3.a.2.1. La excreción de sodio después de la infusión del plasma SH₂ aumentó significativamente respecto al basal. Igualmente se observó un aumento de la natriuresis después de la infusión de SH₁. Los aumentos observados después del bioensayo del plasma SH₂, tanto en el riñón infundido como en el contralateral, fueron superiores significativamente a los observados después de bioensayar SH₁. A pesar de mostrar el riñón infundido una mayor respuesta natriurética al serle administrado el plasma SH₂, que el contralateral (no infundido), no hubo diferencias significativas entre los aumentos en la excreción de sodio, entre ambos riñones. La excreción urinaria de cloro, representada en la fig. D.3.a.2.2. presenta aumentos significativos respecto al basal, y de orden similar después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente. Como consecuencia del bioensayo de las muestras de plasma suprahepático, la excreción urinaria de potasio aumentó más en el riñón infundido (izquierdo) que en el contralateral. Estos aumentos no fueron significativamente distintos entre ambos riñones, ni respecto a sus valores en el basal (fig. D.3.a.2.3.).

En la fig. D.3.a.2.4. se representan las variaciones en el flujo urinario y en el aclaramiento osmolar después de los bioensayos de los plasmas suprahepáticos. En ambos bioensayos el flujo urinario aumentó más en el riñón izquierdo (infundido) que en el derecho, pero no hubo diferencias significativas, ni entre los dos riñones ni con respecto al basal. El riñón izquierdo presentó unos valores del aclaramiento osmolar después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente, significativos respecto al basal, mientras que el riñón contralateral (no infundido) presentó unos ligeros descensos en este mismo parámetro, no significativos, respecto al basal. (fig. D.3.a.2.5.).

Todas estas respuestas tuvieron lugar en ausencia de alteraciones significativas en la filtra-

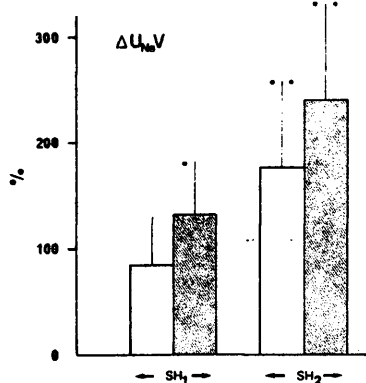


Fig. D.3.a.2.1. Porcentaje de variación respecto al período basal ($\Delta\%$) de la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}) después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente, en la arterial renal izquierda (ARI). Área sayada (riñón infundido: izqdo.), área blanca (riñón contralateral: dcho.).

- Los resultados de cada infusión se han calculado como la media de los valores obtenidos durante la infusión de plasma SH y los obtenidos durante los dos períodos de aclaramiento post-infusión SH, respectivamente.
- Estos resultados se expresan como media \pm eem.
- * $p < 0,05$ respecto a los valores basales (test t de Student para datos emparejados).
- ** $p < 0,05$ respecto a los valores obtenidos por el mismo riñón, en el período de infusión SH₁ (test t de Student para datos emparejados).

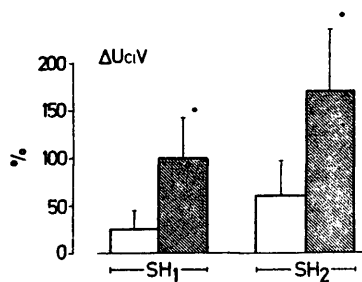


Fig. D.3.a.2.2.- Porcentaje de variación respecto a los valores en el período basal, de la excreción urinaria de cloro (U_{ClV}) después de la infusión de SH₁, y de SH₂, respectivamente, en la ARI; otras explicaciones en la fig. D.3.a.2.1.

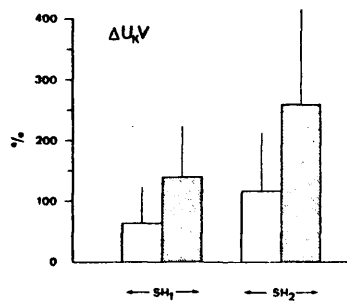


Fig. D.3.a.2.3.— Porcentaje de variación respecto a los valores basales de la excreción urinaria de potasio (U_{KV}), después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente, en la ARI; otras explicaciones en la fig. D.3.a.2.1.

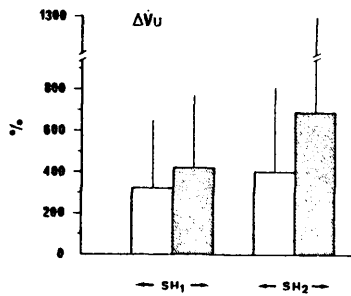


Fig. D.3.a.2.4.— Porcentaje de variación respecto a los valores basales del volumen urinario (\dot{V}_u), después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente, en la ARI; otras explicaciones en la Fig. D.3.a.2.1.

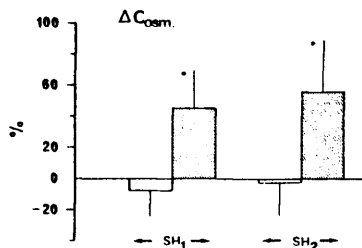


Fig. D.3.a.2.5.— Porcentaje de variación respecto a los valores basales del aclaramiento osmolar (C_{osc}), después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente, en la ARI; otras explicaciones en la Fig. D.3.a.2.1.

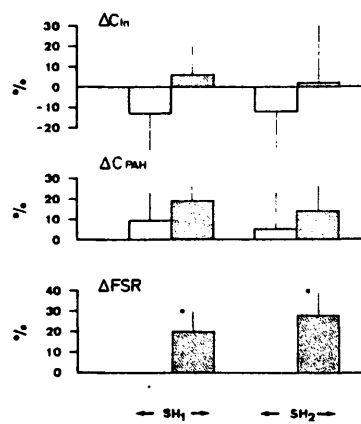


Fig. D.3.a.2.6.— Porcentaje de variación respecto a los valores basales del aclaramiento de inulina (C_{I_n}), de PAH (C_{PAH}) y del flujo sanguíneo renal (FSR) (este último valorado mediante flujometría electromagnética), después de la infusión de los plasmas SH₁ y SH₂ respectivamente, en la ARI; otras explicaciones en la Fig. D.3.a.2.1.

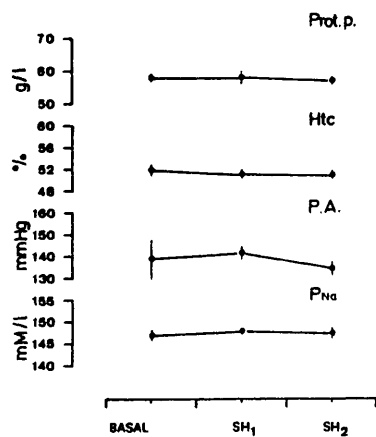


Fig. D.3.a.2.7.— Valores de las concentraciones plasmáticas de proteínas, de sodio (P_{Na}), de la presión arterial y del valor hematocrito, antes y después de la infusión en la ARI de los plasmas SH₁ y SH₂, respectivamente; otras explicaciones en la Fig. D.3.a.2.1.

ción glomerular y en el flujo plasmático renal, según se muestra en la fig. D.3.a.2.6. Sin embargo, el flujo sanguíneo renal, monitorizado en la arteria renal izquierda a lo largo de la experiencia, presentó aumentos significativos respecto al basal, y de orden similar para las respectivas infusiones de los plasmas SH₁ y SH₂ (fig. D.3.a.2.6.).

La presión arterial no varió significativamente como consecuencia de las infusiones de plasmas suprahepáticos (fig. D.3.a.2.7.). En esta misma figura podemos observar que la concentración plasmática de sodio no se alteró a lo largo de las pruebas. Asimismo, los bioensayos en la ARI de los plasmas SH no indujeron cambios en la concentración plasmática de proteínas, ni en el valor hematocrito.

D.3.b. Caracterización de una sustancia humoral con actividad natriurética en relación con la infusión de ClNa 855 mM en la vena Porta.

En este apartado hemos tratado de investigar si un factor humoral de bajo P_m, aislable del plasma y/o de la orina mediante cromatografía en Sephadex G-25 fino, media la respuesta natriurética que observamos en perros a los que se les infunde agudamente una pequeña cantidad de ClNa hiperosmolar en la vena porta. Asimismo investigar acerca del posible origen hepático de dicho factor.

D.3.b.1. Preparación de dicha sustancia a partir de plasma suprahepático, plasma arterial sistémico y de orina. Características físico-químicas.

a) Experiencias en perros:

Siguiendo un protocolo de estudio idéntico al desarrollado en el apartado D.3.a de los Resultados, y según se esquematiza en la fig. D.3.b.1. En perros anestesiados y preparados para técnicas de aclaramiento, se infundió, por medio de una vena mesentérica secundaria, una solución de ClNa 855 mM (0,05 ml./min./kg. de peso, 30 min.) y se extrajeron muestras de sangre para estudio de actividad natriurética (10 ml. cada una) tanto de la vena suprahepática, mediante el cateter instalado en ella (fig. D.1.) como de la arterial femoral, antes de la infusión hipertónica intraportal y a los 20, 60 y 100 min. de haber comenzado dicha infusión. Asimismo, de las muestras de orina recogidas para los aclaramientos, se formaron dos pools, uno previo y otro post-infusión portal, y coincidentes en el tiempo, respectivamente, con los pools de las muestras de sangre.

Las excreciones urinarias de sodio y de potasio (μ mol/min.) de estos perros aumentaron significativamente respecto al basal, como consecuencia de la infusión intraportal de ClNa 855 mM, y coincidiendo con el momento de dos tomas de muestras de sangre SH y arterial (fig. D.3.b.1.1.). Los aclaramientos de inulina y de PAH (fig. D.3.b.1.2.) no presentan variaciones significativas respecto al basal. El flujo urinario aumentó significativamente, mientras que el aclaramiento osmolar aumentó ligeramente, salvo al final, que lo hace de forma significativa (figs. D.3.b.1.1. y 2.).

b) Fraccionamiento de las muestras. P_m de la sustancia humoral.

Las muestras de sangre y de orina de estos perros siguieron el procesamiento descrito en los apartados de los Métodos C.3.a.2. y C.3.c. Estas muestras se fraccionaron en Sephadex G-25 fino y la fracción que eluyó justamente detrás del pico de las sales (F IV) se bioensayó en ratas uninefrectomizadas y despiertas. En las figuras D.3.b.1.3., 4. y 5., se representan tres perfiles cromatográficos representativos de muestras de plasma SH, arterial y de orina. En el perfil cromatográfico de la muestra de orina, se puede observar un alto contenido cromogénico, de color amarillo, que también absorbe a 280 nm, y que no posee proteínas, valoradas éstas mediante el método de Folin y precipitación con ácido tricloroacético al 10%. Estos hechos coinciden totalmente con los descritos por Clarkson y col. en 1976 (67).

El cálculo del P_m de esta sustancia, en base a la cromatografía en Sephadex G-25 resulta difícil, su elución, después del pico de las sales le asignaría un P_m < 1.000 daltones, pero en la ac-

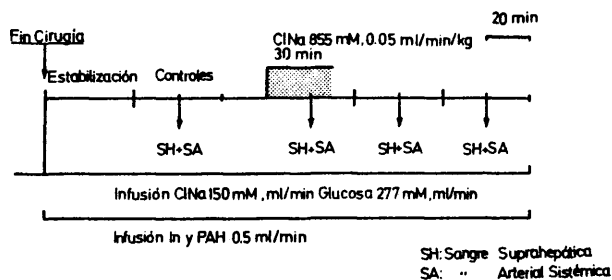


Fig. D.3.b.1.— Protocolo experimental utilizado para el estudio de la actividad natriurética en muestras de plasma (arterial sistémico y suprahepático) y en muestras de orina, después de la infusión intraportal de CINA hipertónico. El área rayada corresponde a la infusión en la vena porta.

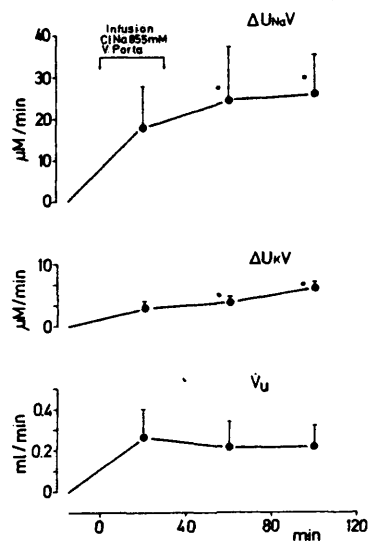


Fig. D.3.b.1.1.— Cambios respecto a los valores basales en la excreción urinaria de sodio ($U_{Na}V$), de potasio (U_KV) y en el volumen urinario (V_U), después de la infusión intraportal de CINA hipertónico, según se esquematizó en la Fig. D.3.b.1. (símbolos en la figura).

— Los resultados se expresan como media \pm eem.

•: $p < 0,05$ respecto al valor respectivo en el período basal (test-t de Student para datos emparejados).

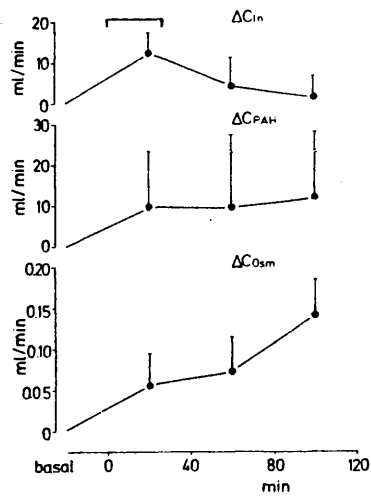


Fig. D.3.b.1.2.— Cambios respecto a los valores basales en el aclaramiento de inulina (C_{In}), de PAH (C_{PAH}) y osmolar (C_{Osm}), otras explicaciones en la fig. D.3.b.1.1.

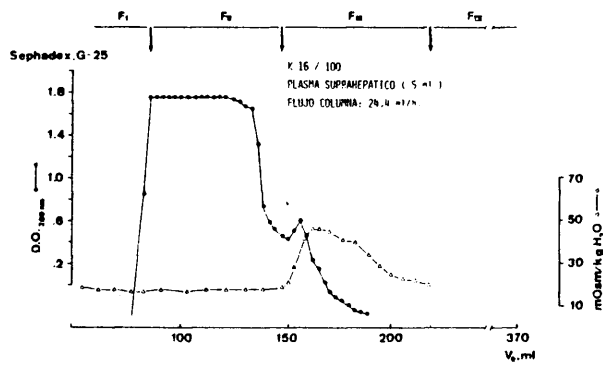


Fig. D.3.b.1.3.— Modelo de fraccionamiento de un plasma suprahepático de perro, obtenido a través de una filtración en gel de Sephadex G-25 fino, en una columna K 16/100, y utilizando como eluyente acetato de amonio 10 mM, pH:6.8. La fracción IV que eluye después del pico de las sales (Δ) es la que se liofilizó y se bioensayó en ratas despiertas.

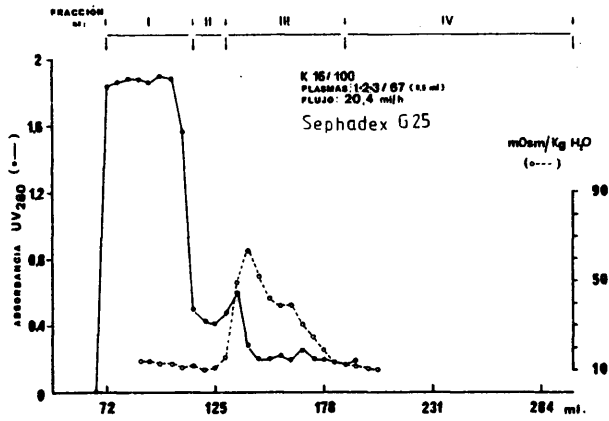


Fig. D.3.b.1.4.— Modelo de fraccionamiento de un plasma arterial sistémico de perro, obtenido mediante una filtración en gel de Sephadex G-25 fino, en una columna K 16/100, y utilizando como eluyente acetato de amonio 10 mM, pH: 6,8. La F IV, que eluye inmediatamente detrás del pico de las sales (O—) (medidas por la osmolaridad) se liofilizó y se bioensayó para el estudio de actividad natriurética.

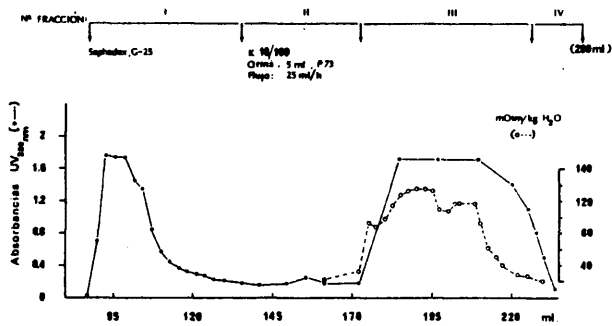


Fig. D.3.b.1.5.— Modelo de fraccionamiento de una muestra de orina de perro concentrada por liofilización, obtenida mediante una filtración en gel de Sephadex G-25 fino, en una columna K 16/100 y con el mismo eluyente que los fraccionamientos anteriores: otras explicaciones en Fig. D.3.b.1.3. y 4.

tualidad se sabe que le corresponde un P_m del orden de ≤ 500 daltones, calculado este último mediante membranas de ultrafiltración AMICON UM 05, de tamaño de poro $0,22 \mu m$ (55, 56, 66, 67), y se cree que su elución después del pico de las sales se debe a fenómenos de adsorción (14, 171) al gel de Sephadex. Por ello, aunque el fraccionamiento de las muestras no permita un cálculo exacto de su P_m , sí permite una preparación exacta del factor, ya que parece tener siempre un comportamiento específico en estas circunstancias.

D.3.b.2. Actividad biológica de esta sustancia. Bioensayo en ratas uninefrectonizadas y despiertas.

La actividad biológica de la F IV de las muestras de plasma y de orina recogidas de los perros anteriores se midió mediante su efecto sobre la excreción renal de sodio en la rata. El método quirúrgico y preparatorio previo de estos animales se ha descrito en el apartado de Métodos C.4.b. El esquema de la experiencia se expone en la fig. D.3.b.2. El efecto de los distintos extractos de F IV, en las respuestas renales de la rata, se expresan en las unidades respectivas de cada uno de los parámetros de la función renal estudiados, corregidas por 100 g. de peso de rata. Se han utilizado ratas Wistar machos de 200 a 300 g. de peso. La media de la excreción urinaria de sodio durante los 90 min. a partir de la inyección del extracto de F IV, se comparó con la media de excreción de sodio durante los períodos controles; esta misma comparación se ha realizado para \dot{V}_u , C_{In} y FE_{Na} . El primer período experimental incluye la inyección del extracto de F IV (1,5 ml./15 min.) y se prolonga 15 min. más, hasta completar los 30 min. habituales de cada período de aclaramiento.

De acuerdo con los criterios utilizados previamente por investigadores como Favre y col. (108), Clarkson y col. (65, 66, 67) y con objeto de que los resultados de nuestras investigaciones pueden ser comparables a los obtenidos por ellos, en nuestras experiencias hemos conceptualizado como "Bioensayo positivo de actividad natriurética" aquellos en los cuales la rata presenta aumentos en la $U_{Na}V$ del orden de $1 \mu mol / min. / 100 g.$ y aumentos en la FE_{Na} del orden del 1%, durante los 90 min. posteriores al comienzo de la infusión del extracto F IV.

D.3.b.2.a. Efecto de los extractos F IV obtenidos de plasma suprahepático pre y post-infusión salina hipertónica en la V. Porta.

1. Efecto de los extractos F IV de plasma-SH recogido después de la infusión portal.

En la tabla D.3.b.2.a.1. se puede observar que la excreción urinaria de sodio, en 10 ratas que recibieron este extracto, aumentó desde una media de $1,25 \mu mol / min / 100 g.$, correspondiente a los 60 min. previos a la inyección-F IV, a una media de $2,184 \mu mol / min / 100 g.$, correspondientes a 90 min. siguientes a la inyección. Según se puede ver también en la fig. D.3.b.2. a.1., estos aumentos en la excreción de sodio son significativos respecto a los valores preinfusión ($p < 0,0025$).

La inyección de esta F IV causó aumentos en el flujo urinario significativos respecto a los valores previos a la misma. La tasa de filtración glomerular, valorada mediante el aclaramiento de inulina, descendió ligeramente, aunque de forma significativa, durante las dos horas y media subsiguientes a la inyección de F IV. La excreción fraccional de sodio media aumentó significativamente con respecto al valor en los períodos controles como resultado de la inyección de F IV. (Tabla y figuras mencionadas antes).

2. Efecto de la inyección de F IV obtenida de plasma-SH recogido previamente (basal) a la infusión intraportal.

En la excreción urinaria de sodio de un conjunto de cinco ratas (tabla D.3.b.2.a.2.) produce un aumento medio del orden de $0,467 \mu mol / min. / 100 g.$ de peso, que es significativo respecto a los valores de este parámetro previos a la inyección de la fracción ($p < 0,01$) (fig. D.3.b.2.a.1.). Este aumento fue la mitad del que produjo el extracto de F IV de plasma SH post-infu-

BIOENSAYO DE ACTIVIDAD NATRIURÉTICA :

- RATAS (200-300 g) UNINEFRECTOMIZADAS (15-30 DIAS ANTES).
- CIRUGIA : VENA YUGULAR, ARTERIA FEMORAL, VESIGIA.
- ACLARAMIENTOS DE INULINA - H^2 (Cin), EXCRECION DE ELECTROLITOS, HEMATOCRITO Y PA.

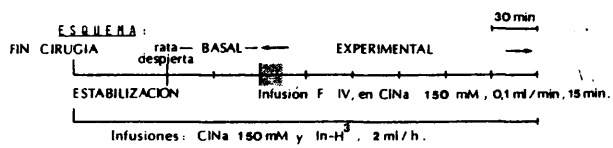


Fig. D.3.b.2.— Protocolo experimental de bioensayo de actividad natriurética en ratas.

TABLA: D.3.b.2.a.1.: Respuestas renales a la inyección de F IV de PLASMA SUPRAHEPÁTICO recogido POST-
 (PRE: X valores controles)
 (Δ : X cambios respecto a PRE, 90' de bioensayo).

RATA Nº	U _{Na} V: μM/min/100g		V _u : μl/min/100g		C _{IN} : ml/min/100g		FE _{Na} : %		BIOENSAYOS POSITIVOS :
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	0,146	+0,5	2,49	+2,58	1,04	-0,45	0,13	+0,63	
2	0,47	-0,17	3,94	-1,3	0,464	-0,24	0,76	+0,17	
3	1,75	+0,45	15,03	-1,52	0,48	-0,12	2,6	+2	
4	1,2	+1,4	1,2	+1,36	0,49	-0,06	1,81	+2,7	+
5	2,6	+1,1	2,61	+1,05	0,48	-0,05	3,92	+2,38	+
6	0,59	+0,5	2,26	+0,55	0,53	-0,29	0,81	+2,89	
7	2,06	+2,24	10,05	+18,1	0,39	-0,09	4,3	+5,53	+
8	2,28	+0,32	15,54	+5,42	0,46	-0,2	3,74	+3,6	
9	0,62	+1,42	5,37	+9,33	0,17	-0,03	2,62	+7,73	+
10	0,8	+1,61	4,62	+9,48	0,21	-0,06	2,7	+9,7	+
Media:	1,25	+0,934	6,31	+4,5	0,313	+0,16	2,34	+3,73	5/10
t eem	0,28	0,25	2,97	2,06	0,047	0,05	0,48	1,02	50% (+)
t-test emp.		4,013		2,303		-3,679		3,867	
p <		0,0025		0,025		0,005		0,0025	

Abreviaturas pag. viii

TABLA D.3.b.2.a.2.:Efecto de F IV de PLASMA SUPRAHEPÁTICO recogido previamente-BASAL- a la infusión intraportal de $ClNa$ 855 mM, sobre $U_{Na}V$, $\dot{V}u$, C_{In} , $\dot{V}u$, C_{In} , y FE_{Na} *

RATA N°	$U_{Na}V: \mu M/min/100g$		$\dot{V}u: \mu l/min/100g$		$C_{In}: ml/min/100g$		$FE_{Na}: \%$		BIOENSAYOS POSITIVOS
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	0,11	-0,002	1,29	+0,18	0,081	+0,03	0,92	-0,05	
2	0,23	-0,09	2,87	+1,3	0,105	+0,19	1,63	-1,25	
3	1,91	+0,55	11,21	+4,92	0,65	-0,23	2,19	+2,38	
4	0,54	+0,98	6,15	+8,95	0,49	-0,17	0,81	+2,98	+
5	0,78	+0,56	6,01	+7,8	0,23	-0,13	2,51	+6,7	
Media:	0,714	+0,4	5,51	+4,63	0,5	-0,063	1,61	+2,2	1/5
t _{em}	0,55	0,22	1,9	1,63	0,19	0,084	0,38	1,58	20% (+)
* t-test emp.		2,032		3,176		0,838		1,558	
p <		ns		0,025		ns		ns	

PRE : \bar{X} valores en los periodos controles,previos al bioensayo de F IV.

Δ : \bar{X} cambios respecto a PRE,durante 90 min de bioensayo a contar desde la inyección de F IV.

* test t de Student para datos emparejados.

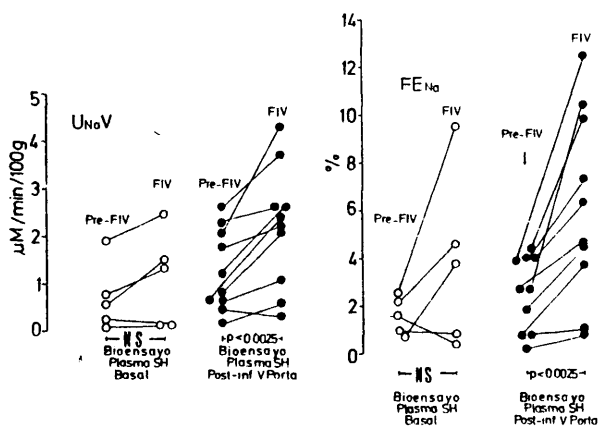


Fig. D.3.b.2.a.1.- Efectos de la inyección en ratas, de los extractos F IV de plasma suprahepático, basal y post-infusión portal de ClNa hipertónico, en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV} , $\mu mol/min/100 g$) y en la excreción fraccional de sodio (FE_{Na} : %). Cada punto representa los resultados obtenidos en una sola rata, se comparan los valores previos con los valores obtenidos durante los 90 min experimentales desde el inicio de la inyección de F IV (ver c.f. D.3.b.2.). Se utiliza un test-t. de Student para datos emparejados.

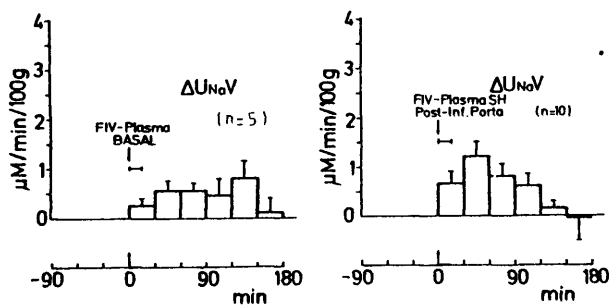


Fig. D.3.b.2.a.2.- Modelos de respuesta natriurética obtenidos durante los bioensayos de los extractos F IV de plasma SH , basal y post-infusión hipertónica portal. Se han representado las medias de los incrementos respecto al basal, en la excreción de sodio, como consecuencia de los bioensayos a lo largo de los períodos de aclaramiento experimentales, según se esquematizó en la Fig. D.3.b.2. El número de ratas va entre paréntesis.

TABLA: D.3.b.2.a.3.: Electrolitos en plasma y peso de las ratas utilizadas en el bioensayo de los extractos de FIV de PLASMA SUPRAHEPÁTICO, BASAL Y POST-INFUSION de ClNa 855 mM en 1a v. PORTA.

	P Na mM/l	P K mM/l	P Cl mM/l	P Osm mOsm/kg H ₂ O	PESO g
BASAL:					
n=5 Media:	143,4	3,54	114,7	297,6	337
+ eem	0,94	0,15	0,38 *	2,93	12,6
POST-INF. PORTA:					
n=10 Media:	144	3,6	116	294,5	315
+ eem	0,54	0,13	0,87	1,8	15,6

sión portal. El flujo urinario aumentó en todas las experiencias al inyectar F IV plasma SH basal; la FG presentó un descenso medio del orden de 0,057 ml./min./100 g. durante los 90 min. desde el inicio de la inyección F IV, descenso que no es significativo con respecto a los valores basales. La inyección de F IV de plasma SH basal produjo un aumento medio significativo en la FE_{Na} desde un 3,49% a un 7,18%. No hay diferencia entre los aumentos en la excreción fraccional de sodio inducidos por la inyección de F IV de los plasmas obtenidos de la vena suprahepática antes y después de la infusión portal de salino hipertónico (fig. D.3.b.2.a.1.).

3. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis producida por los dos tipos de extractos F IV de plasma SH.

De acuerdo con los criterios expuestos anteriormente, los extractos de plasma-SH-post-infusión producen una incidencia de ensayos positivos del 50%. Mientras que los extractos de plasma-SH basal producen un 20% de ensayos positivos. Si se comparan los modelos de respuesta natriurética (media de Δ ; μ mol/min./100 g. de peso) en cada período de aclaramiento de cada una de las ratas (fig. D.3.b.2.a.2.) se puede observar que el bioensayo F IV del plasma SH-post-infusión portal produce unos aumentos que presentan un pico máximo entre los 30 y 60 min. después de la inyección del extracto, descendiendo hasta aproximarse a los valores basales hacia las dos horas después de la administración de F IV. Por el contrario la infusión de F IV-plasma-SH-basal no produce un pico máximo definido.

4. Parámetros fisiológicos generales de las ratas

En la tabla D.3.b.2.a.3. se presentan los valores de las concentraciones de electrolitos plasmáticos al final de los bioensayos, y del peso de las ratas utilizadas en estas experiencias. Se observa la ausencia de alteraciones en estas concentraciones como consecuencia de los bioensayos. Los valores pre-F IV y post-F IV del hematocrito y la presión arterial, se exponen en la tabla D.3.b.2.b.4. y no presentaron alteraciones significativas a lo largo de la experiencia.

D.3.b.2.b. Efectos de los extractos F IV obtenidos de plasma arterial sistémico pre y post-infusión salina hipertónica en la vena porta.

1. Efecto de los extractos F IV de plasma arterial recogido después de la infusión portal.

Estos extractos producen en la excreción urinaria de sodio un aumento desde 1,305 a 2,447 μ mol / min. / 100 g ($p < 0,005$) (tabla y fig. D.3.b.2.b.1.). El flujo urinario medio aumentó significativamente por efecto de la inyección de F IV. La filtración glomerular no se alteró de modo importante como consecuencia de los extractos, aunque hubo ligeros descensos individuales en algunas ratas. La FE_{Na} (%) media pasó de 2,99% a 6,24% aunque este aumento no fue significativo respecto al valor basal (Tabla y fig. D.3.b.2.b.1.).

2. Efecto de los extractos F IV de plasma arterial, recogido previamente (basal) a la infusión portal.

La infusión de estos extractos causa un aumento significativo de +0,58 μ mol / min. / 100 g. en la excreción urinaria de sodio (Tabla D.3.b.2.b.2.). Si se observa la fig. D.3.b.2.b.1. se ve que el aumento absoluto en la U_{Na}^V (+1,142 μ mol / min. / 100 g.), después de la infusión de F IV de plasma arterial post-infusión portal es un 96% mayor que los que produce el extracto F IV del plasma arterial basal. El flujo urinario y el aclaramiento de inulina no variaron significativamente durante los 90 min. siguientes a la inyección de F IV-plasma basal. La excreción fraccional de sodio aumentó durante el mismo intervalo de tiempo pero no significativamente.

TABLA D.3.b.2.b.1.:Efecto de extractos F IV de PLASMA ARTERIAL recogido POST-INFUSION de C1Na 855 mM en la vena PORTA, sobre $U_{Na}V$, V_u , C_{In} Y FE_{Na} .

RATA N°:	$U_{Na}V: \mu M/min/100g$		$V_u: \mu l/min/100g$		$C_{In}: ml/min/100g$		$FE_{Na}: \%$		BIOENSAYOS POSITIVOS :
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
	1	2,84	+1,24	2,88	+1,18	0,16	-0,04	12,73	
2	0,89	+1,41	2,49	+7,41	0,66	-0,03	0,87	+2,08	+
3	0,78	+0,97	3,35	+5,66	0,75	-0,21	0,61	+1,79	+
4	0,69	+0,21	4,3	+0,5	0,47	+0,15	0,66	+0,36	+
5	1,51	+0,97	4,95	+5,96	0,63	+0,06	1,7	+0,96	+
6	1,12	+2,05	5,4	+12,65	0,69	-0,03	1,36	+2,27	+
Media:	1,305	+1,142	3,9	+5,56	0,56	-0,017	2,99	+3,25	5/6
+ eem	0,36	0,26	0,52	1,96	0,09	0,049	2,14	1,95	83,3% (+)
* t-test emp.		4,662		3,067		-0,378		1,824	
p<		0,005		0,025		ns		ns	

PRE: \bar{X} valores en los periodos controles previos al bioensayo de F IV.

Δ : \bar{X} cambios respecto a PRE durante 90 min de bioensayo a contar desde la inyección de F IV. -

* test t de Student para datos emparejados.

TABLA: D.3.b.2.b.2.: Efecto de los extractos F IV de PLASMA ARTERIAL recogido previamente-BASAL-a la infusión de ClNa 855 mM en la vena PORTA, sobre U_{Na} , V_u , C_{In} y FE_{Na} .

RATA N°:	U_{Na} : μ M/min/100g		V_u : μ L/min/100g		C_{In} : mL/min/100g		FE_{Na} : %		BIOENSAYOS POSITIVOS:
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	1,95	-0,42	7,85	-3,62	0,32	+0,05	4,64	-1,5	
2	1,1	+0,69	10,7	+2,17	0,4	-0,06	2,1	+1,3	
3	0,91	+0,74	3,11	+3,4	0,89	-0,17	0,915	+0,84	
4	0,51	+1,25	2,17	+4,03	ND	-	ND	-	+
5	1,04	+1,41	4,8	+4,43	0,8	0	0,99	+1,37	+
6	0,395	-0,015	3,13	+0,12	ND	-	ND	-	
7	0,25	+0,43	2,2	+1,1	ND	-	ND	-	
Media:	0,88	+0,58	4,85	+1,66	0,603	-0,0315	2,16	+0,5	2/7
+ eem	0,23	0,26	1,32	1,14	0,16	0,051	0,99	0,78	28,6% (+)
* t-test emp.		2,3608		1,5685		-0,926		0,9799	
p <		0,05		ns		ns		ns	

PRE: \bar{X} valores en los periodos controles previos al bioensayo de F IV.

Δ : \bar{X} cambios respecto a PRE durante 90 min de bioensayo a contar desde la inyección de F IV.

* test t de Student para datos emparejados.

ND: no determinado.

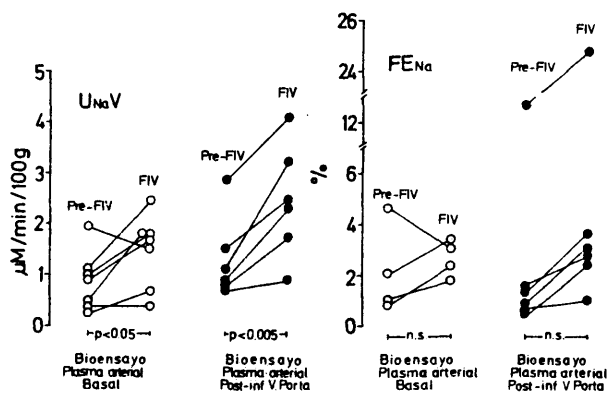


Fig. D.3.b.2.b.1.— Efecto de la inyección en ratas, de los extractos F IV de plasma arterial sistémico, basal y post-infusión portal de ClNa hipertónico, en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV} : $\mu mol/min/100 g$) y en la excreción fraccional de sodio (FE_{Na} : %). Cada punto representa los resultados de una rata y se comparan los valores previos con los valores obtenidos durante los 90 min experimentales, desde el inicio de la inyección de F IV. Se utiliza un test-t de Student para datos emparejados.

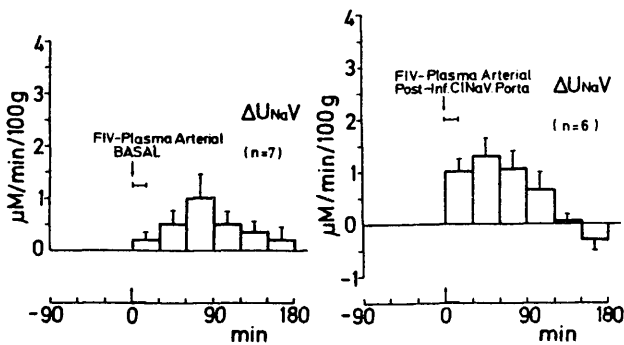


Fig. D.3.b.2.b.2.— Modelo de respuesta natriurética durante los bioensayos de F IV de plasma arterial sistémico, basal y post-infusión portal. Se han representado las medias de los cambios respecto al basal, en la excreción urinaria de sodio después de una inyección de los extractos F IV, y durante los 180 min siguientes desde el inicio de la misma. El número de ratas va entre paréntesis.

TABLA: D.3.b.2.b.3. Valores de los electrolitos en plasma y del peso de las ratas utilizadas en bioensayos de los extractos de FIV de PLASMA ARTERIAL, BASAL Y POST-INFUSION de CINA 855mM en la v. PORTA.

	P _{Na} mM/l	P _K mM/l	P _{Cl} mM/l	P _{Osm} mOsm/kg H ₂ O	PESO g
BASAL:					
n=7,Media:	144,4	3,7	117,3	297	339
± eem	1,02	0,12	0,93	1,8	15,9
POST-INF. V. PORTA:					
n=6,Media:	144,2	3,43	114,2	296,7	352
± eem	1,07	0,08	0,8	1,25	6,5

TABLA D.5.b.2.b.4. Variaciones del valor HEMATOCRITO y de la P.A. en los distintos bioensayos de FIV- de PLASMA, pre y post infusión de CINA 855 mM en la v. PORTA.

	FIV-PLASMA SH BASAL (n=5)	FIV-PLASMA SH POST-INF. V. PORTA (n=10)	FIV-PLASMA ART. BASAL (n=7)	FIV-PLASMA ART. POST-INF. V. PORTA (n=6)
<u>Hct (% Células)</u>				
<u>PRE-FIV:</u>				
Media:	47,1	45,45	52	50,8
± eem	1,21	1,20	1,35	1,8
<u>INYECCION Y POST-FIV:</u>				
Media:	45,16	41,06	46,1	46
± eem	2,38	0,9	1,38	2,06
<u>P.A. (mmHg)</u>				
<u>PRE-FIV:</u>				
Media:	98,43	99,5	104,2	99,5
± eem	0,84	2,66	3,14	0,54
<u>INYECCION Y POST-FIV:</u>				
Media:	99,2	98,95	100,3	99,6
± eem	1,47	1,13	2,17	0,45

3. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis producida por los dos tipos de extractos F IV de plasma arterial.

De acuerdo con los criterios expuestos, los extractos de F IV de plasma arterial post-infusión portal de ClNa hipertónico producen una incidencia del 83,3% de ensayos positivos, mientras que, los extractos de F IV de plasma arterial basal producen sólo un 28,6% de ensayos positivos.

Si observamos la representación de las medias de los incrementos en $U_{Na}V$, como consecuencia de la administración de los extractos F IV (μ mol / min. / 100 g.), a lo largo de los distintos períodos de aclaramiento, y en cada uno de los dos grupos de ratas (fig. D.3.b.2.b.2.), se puede ver que los modelos de respuesta natriurética son distintos. El bioensayo de F IV-plasma arterial post-infusión portal produce mayor respuesta natriurética y presenta un aumento importante de la misma en el primer período, con un máximo entre los 30 y 60 min. Los extractos F IV-plasma arterial basal no actúan sobre la $U_{Na}V$ hasta pasados unos 60 min. de la infusión de los mismos, presentando un corto aumento hacia ese tiempo (60-90 min.) y disminuyendo a continuación hacia los valores pre-F IV.

4. Parámetros generales de las ratas.

Los valores plasmáticos de distintos electrolitos y la osmolaridad, en muestras de sangre de rata obtenida al final de los bioensayos F IV de plasma arterial, se presentan en la tabla D.3.b.2.b.3. se observa la ausencia de alteraciones en los mismos y al igual que se comentó en el apartado anterior los valores del hematocrito y de la PA de las ratas no se alteraron significativamente como consecuencia de la administración de los extractos F IV plasma arterial (Tabla D.3.b.2.b.4.).

D.3.b.2.c. Efecto de los extractos F IV de orina recogida pre y post-infusión de ClNa hipertónico en la vena porta.

1. Efecto de los extractos F IV de orina post-infusión de ClNa hipertónico en la VP.

La infusión de estos extractos F IV en diez ratas produce en todos ellos aumentos en la $U_{Na}V$. El aumento medio ($1,23 \mu$ mol / min. / 100 g.) es significativo respecto al valor medio de $U_{Na}V$ durante los períodos de pre-F IV ($1,76 \mu$ mol / min / 100 g.) (Tabla y fig. D.3.b.2.c.1.) El volumen urinario medio aumentó significativamente de $12,36 \mu$ l/min/100 g durante los períodos controles, a $18,9 \mu$ l/min/100 g durante los 90 min subsiguientes a la administración de FIV. Se observó un descenso significativo en el C_{In} , pasando de $0,446$ a $0,374$ ml/min/100 g. La excreción fraccional de sodio aumentó también de modo significativo respecto al valor medio pre-inyección FIV (ver Tabla y fig. D.3.b.2.c.1.).

2. Efecto de los extractos F IV de orina recogida antes de la infusión intraportal de ClNa.

La infusión de estos extractos no produjo cambios significativos en la $U_{Na}V$ (Tabla D.3.b.2.c.2.), en el flujo urinario ni en FE_{Na} . Se observó un descenso significativo en el C_{In} . Las diferencias entre los aumentos respecto a sus propios basales, en $U_{Na}V$ y FE_{Na} , producidos por el bioensayo de los F IV de orina basal y F IV post-infusión hipertónica portal, respectivamente, pueden observarse en la fig. D.3.b.2.c.1.

3. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis producida por los extractos F IV de orina basal post-infusión portal.

La inyección de los extractos F IV, de orina recogida post-infusión de ClNa hipertónico en la vena porta, produce un 70% de bioensayos positivos, mientras que los extractos F IV obtenidos de orinas basales producen sólo un 14,3% de bioensayos positivos. Si observamos las medias de los incrementos en la $U_{Na}V$ como consecuencia de la administración de los extractos F IV de orina post-infusión portal se produce un modelo de respuesta natriurética opuesta a las respuestas que tienen lugar cuando se inyectan las F IV de orina basal (fig. D.3.b.2.c.2.). Así, el aumento de la excreción urinaria

TABLA D.3.b.2.c.1.: Efecto de los extractos F IV de URINA recogida POST-INFUSION de CINA 855 mM en la vena PORTA, sobre la excreción, absoluta y fraccional, de sodio, el flujo urinario y el aclaramiento de inulina.

RATA N°:	U _{Na} V: μM/min/100g		V _u : μl/min/100g		C _{In} : ml/min/100g		FE _{Na} : %		BIOENSAYOS POSITIVOS :
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	1,65	+1,1	8,34	+4,46	0,49	-0,09	2,48	+2,6	+
2	0,94	+0,97	10,44	+10,37	ND	-	ND	-	+
3	2,2	+1,01	17,4	+0,3	0,48	-0,08	3,5	+2,82	+
4	1,96	+1,96	10,98	+14,17	0,45	+0,012	3,02	+3,29	+
5	0,97	+0,06	10,4	-3,7	0,31	-0,11	2,27	+1,44	+
6	2,9	+1,81	17,88	+12,37	0,35	+0,09	6,2	+1,7	+
7	1,2	+1,5	7,91	+7,7	0,5	-0,15	1,78	+4,03	+
8	2,34	+2,7	16,37	+10,63	0,45	-0,15	3,8	+10,12	+
9	0,59	+0,65	4,55	+5,88	0,39	+0,01	1,12	+0,98	+
10	2,85	+0,5	19,45	+3,08	0,6	-0,18	3,55	+1,98	+
Media:	1,76	+1,23	12,37	+6,53	0,446	-0,07	3,08	+3,22	7/10
+ eem	0,27	0,25	1,68	1,87	0,03	0,031	0,516	0,97	70% (+)
* t-test emp.	5,05	3,6677	3,6677	0,005	-2,399	0,05	3,5127	0,025	
p <		0,0005							

PRE: X valores en los periodos controles previos al bioensayo de F IV.

Δ : X cambios respecto a PRE durante 90 min de bioensayo a contar desde la inyección de F IV.

* test t de Student para datos emparejados.

ND: no determinado.

TABLA D.3.b.2.c.2.: Efecto de los extractos F IV de URINA recogidos previamente - BÁSAL- a la infusión de CINA 855 mM en la vena PORTA , sobre $U_{Na}V$, V_u , C_{In} y FE_{Na} .

RATA N°:	$U_{Na}V$: $\mu M/min/100g$		V_u : $\mu l/min/100g$		C_{In} : $ml/min/100g$		FE_{Na} : %		BIOENSAYOS POSITIVOS:
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	2,25	-1,21	10,4	-5,7	0,2	-0,09	8,7	-1,39	
2	0,405	+0,07	2,85	-0,71	0,215	-0,141	2,3	+2,49	
3	3,77	-0,96	39	-18,4	0,605	-0,26	4,7	+1,26	
4	1,51	+0,7	4,9	+7,1	0,63	-0,24	1,81	+2,37	
5	1,63	+1,8	9,42	+16,1	0,42	+0,01	2,89	+3,04	+
6	3,4	+0,03	21,4	+0,73	0,53	+0,004	5,91	-0,96	
7	3,22	-0,42	15,7	+3,9	0,635	-0,24	3,83	+1,69	
8	1,76	-1,02	12,54	-7,04	0,365	-0,025	3,65	-1,95	
Media:	2,24	-0,126	14,5	-0,502	0,45	-0,122	4,22	+0,818	1/7
+ eem	0,43	0,38	4,3	3,8	0,067	0,04	0,84	0,74	14,5% (+)
* t-test emp.		-0,3514		-0,1378		-3,136		1,186	
p <		ns		ns		0,01		ns	

PRE: \bar{X} valores en los periodos controles previos al bioensayo de F IV.

Δ : \bar{X} cambios respecto a PRE durante 90 min de bioensayo a contar desde la inyección de F IV.

* test t de Student para datos emparejados.

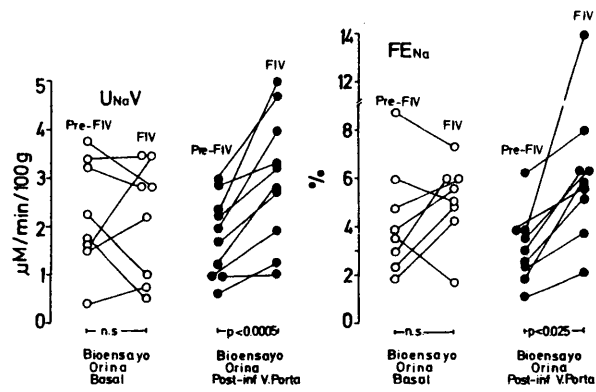


Fig. D.3.b.2.c.1.- Efecto de la inyección de los extractos F IV de orina, basal y post-infusión portal, en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV} ; $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ g}$) y en la excreción fraccional de sodio (FE_{Na} ; %). Cada punto representa el resultado de una rata. Se comparan los valores previos con los observados durante los 90 min de bioensayo de F IV, a contar desde la inyección del extracto. Se utiliza el test-t de Student para datos emparejados.

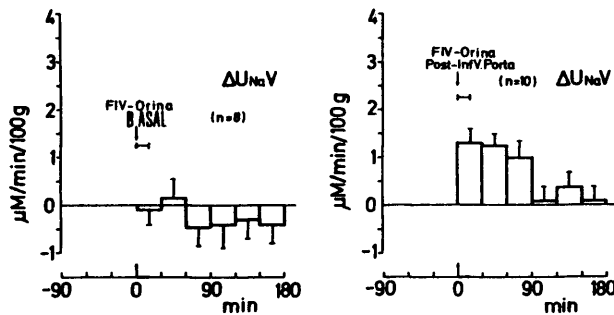


Fig. D.3.b.2.c.2.- Modelo de respuesta natriúrica durante los bioensayos de F IV de orina basal y post-infusión hipertónica en la vena porta. Se han representado las medias de los cambios respecto al basal, en la excreción urinaria de sodio, después de la inyección de los extractos F IV y durante los períodos siguientes post-infusión. El número de ratas va entre paréntesis.

TABLA: D.3.b.2.c.3.: Electrolitos plasmáticos y peso de las ratas utilizadas en bioensayos: F IV de URINA, BASAL y POST-INFUSION de ClNa hiperosmolar en la v. PORTA

	P Na mm/I	P K mm/I	P CL mm/I	P osm mOsm/kg de H ₂ O	PESO g
<u>BASAL:</u>					
n=8 Media:	141,2	3,69	113,6	291,1	320
+ eem	0,94	0,12	1,61	2,07	16,7
<u>POST-INF.PORTA:</u>					
n=10 Media:	143,2	3,57	114,3	294,1	304
+ eem	0,75	0,10	0,66	2,06	17,4

de sodio es máximo en los primeros 30 min. desde el bioensayo de F IV-orina post-infusión, manteniéndose en niveles elevados hasta los 90 min, a partir de ahí desciende hacia los valores basales.

4. Parámetros generales de las ratas.

La osmolaridad y los electrolitos plasmáticos de las ratas no se alteraron con el bioensayo de los extractos F IV de orina basal y post-infusión portal (Tabla D.3.b.2.c.3.). El peso medio de las ratas utilizadas para los dos tipos de bioensayos fue del orden similar. El valor hematocrito y la presión arterial no se alteraron significativamente como consecuencia de los bioensayos FIV de orina basal y FIV de orina post-infusión portal, respectivamente (Tabla D.3.b.2.d.3.).

D.3.b.2.d. Efecto de los extractos FIV de orina recogida después de la infusión de ClNa 855 mM en una vena cubital.

Con objeto de hacer un estudio comparativo, se ha investigado la presencia de actividad natriurética en la orina de perros, a los que según el protocolo experimental llevado a cabo en el apartado D.1.b. se les realizó la infusión de una solución de ClNa 855 mM (0,05 ml/min/Kg de peso, 30 min) en una vena cubital. Como se muestra en la fig. D.1.b.1. dicha infusión produce una natriuresis significativamente menor que la que se observa si esta misma solución se infunde en la vena porta. El procedimiento de preparación de las muestras de orina ha sido descrito en los apartados anteriores (cf. D.3.b.1.).

1. Efecto de los extractos F IV de orina post-infusión de ClNa 855 mM en la V. cubital.

La infusión de los extractos F IV de orina post-infusión cubital produce un aumento de la U_{NaV} desde $0,99 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g}$ (valor medio durante los 60 min pre-inyección F IV) a $1,73 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g}$, durante los 90 min subsiguientes al inicio de la misma; este incremento fue significativo (Tabla y fig. D.3.b.2.d.1.). Si se compara con los aumentos en U_{NaV} como consecuencia del bioensayo de F IV-orina postinfusión portal, vemos que estos últimos extractos producen mayores aumentos en este parámetro (Tabla y fig. D.3.b.2.c.1.). El flujo urinario también aumentó pero no significativamente. En este mismo espacio de tiempo el C_{In} descendió significativamente. El bioensayo de F IV-orina postinfusión cubital se asoció con aumentos en FE_{Na} menores a los observados en los bioensayos de F IV-orina postinfusión portal.

2. Bioensayos positivos y modelo de natriuresis.

La infusión de los extractos de F IV de orina post-infusión cubital, en ocho ratas, produjo un 37,54% de bioensayos positivos. El modelo de respuesta natriurética se representa en fig. D.3.b.2.d.2., el aumento en la excreción urinaria de sodio tardó más tiempo en producirse y es menor, que el que tiene lugar en los bioensayos de la F IV-orina postinfusión portal (Fig. D.3.b.2.c.2.).

3. Parámetros generales de las ratas.

Según se observa en la tabla D.3.b.2.d.2. no hay alteración en la osmolaridad y concentración de electrolitos plasmáticos y observamos que los valores son de orden similar al de los otros grupos de ratas empleadas para anteriores bioensayos. El peso medio fue también similar al utilizado en otros bioensayos anteriores. El valor hematocrito y la P.A. no se modificaron significativamente (Tabla D.3.b.2.d.3.).

TABLA D.3.b.2.d.1.: Efecto de los extractos F IV de ORINA recogida POST-INFUSION de ClNa 855 mM en una vena CUBITAL, sobre la excreción, absoluta y fraccional, de sodio; el flujo urinario y el aclaramiento de inulina.

RATA N°:	U _{Na} V: μM/min/100g		V _u : μl/min/100g		C _{In} : ml/min/100g		FE _{Na} : %		BIOENSAYOS POSITIVOS:
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	1,4	+1,22	11,02	+6,05	0,55	+0,11	1,95	+1,05	+
2	0,8	+1	3,05	+6,45	0,67	+0,03	1,13	+0,81	+
3	1,4	-0,87	12,9	-9,16	0,94	-0,53	1,1	-0,187	
4	1,43	+0,3	6,14	+2,94	0,85	-0,27	1,16	+1,04	
5	0,8	+0,6	4,05	+2,2	0,625	-0,195	1,2	+1,2	
6	1,46	+2,52	10,14	+19,8	0,83	-0,12	1,33	+2,87	+
7	0,3	+0,63	3,08	+1,77	0,495	-0,045	0,494	+2,35	
8	0,33	+0,52	2,63	+1,61	0,91	-0,18	0,26	+0,6	
Media:	0,99	+0,74	6,63	+3,96	0,734	-0,15	1,078	+1,22	3/8
+ eem	0,18	0,35	1,54	3,02	0,064	0,074	0,193	0,37	37,5 % (+)
* t-test emp.	2,2032	1,4	ns			-2,1536	3,5574		
p <	0,05					0,05	0,01		

PRE: \bar{x} valores en los periodos controles previos al bioensayo de F IV.

Δ : \bar{x} cambios respecto a PRE durante 90 min de bioensayo a contar desde la inyección de F IV.

* test t de Student para datos emparejados.

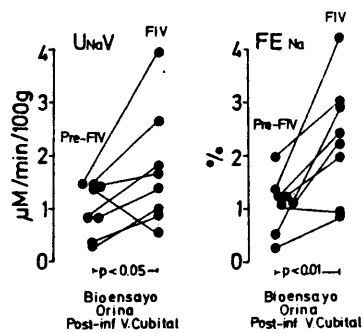


Fig. D.3.b.2.d.1.— Efecto de la inyección de los extractos F IV de orina post-infusión de ClNa hipertónico en una vena cubital, en la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}) y en la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}). Cada punto representa el resultado de una rata. Se comparan los valores previos con los obtenidos durante los 90 min de bioensayo, a contar desde el momento de la inyección del extracto. Se utiliza el test-t de Student para datos emparejados.

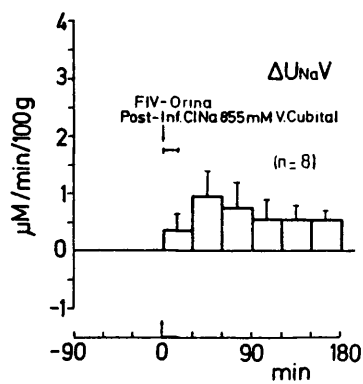


Fig. D.3.b.2.d.2.— Modelo de respuesta natriurética durante el bioensayo de los extractos F IV de orina post-infusión hipertónica de ClNa en una vena cubital. Se representan los cambios respecto al basal, en la excreción urinaria de sodio después de la inyección de F IV y durante los períodos siguientes post-infusión. El número de ratas va entre paréntesis.

TABLA D.3.b.2.d.2.: Electrolitos plasmáticos y peso de las ratas utilizadas en bioensayo de FIV de ORINA POST-INFUSION DE ClNa 855 mM en v. CUBITAL

	$\frac{P_{Na}}{mM/l}$	$\frac{P_K}{mM/l}$	$\frac{P_{Cl}}{mM/l}$	$\frac{P_{Osm}}{mOsm/kg H_2O}$	$\frac{PESO}{g}$
Media:	144	3,52	115	298	299
\pm eem (n=8)	0,56	0,14	0,49	1,69	21,2

Abreviaturas pag viii

TABLA D.3.b.2.d.3.: Valor hematocrito y P.A. en bioensayos de extractos FIV DE ORINA

	FIV-ORINA PRE-INF. CINA V. PORTA (n=8)	FIV-ORINA POST-INF. CINA V. PORTA (n=10)	FIV-ORINA POST-INF. CINA V. CUBITAL (n=8)
Hct (% cél)			
<u>PRE-FIV:</u>			
Media:	49	46	49,4
+ eem	1,43	0,8	1,8
<u>INYECCION Y</u>			
<u>POST-FIV:</u>			
Media:	44	43	44
+ eem	1,28	0,71	1,54
<u>P.A. (mmHg)</u>			
<u>PRE-FIV:</u>			
Media:	99,4	107,2	100,2
+ eem	1,2	2,5	0,17
<u>INYECCION Y</u>			
<u>POST-FIV:</u>			
Media:	99	106	100,3
+ eem	1,2	3,03	0,49

D.4. Comparación de las características biológicas de la sustancia humoral obtenida en el apartado D.3.b. con las de otras hormonas natriuréticas.

D.4.a. Aislamiento de un factor humoral de bajo Pm en la orina de perros con expansión crónica del V E C.

Algunos investigadores (108, 185), han demostrado la presencia en la orina de perros tratados durante varios días consecutivos con mineralocorticoides y una dieta con un contenido de sodio elevado, de una sustancia que inhibe el transporte de sodio en vejiga de rana y que induce natriuresis en la rata. Este factor es aislable mediante cromatografía en Sephadex G-25 apareciendo inmediatamente detrás del pico de las sales (F IV) y su Pm, determinado mediante membranas de ultrafiltración es de unos 500 daltones (55, 56, 66, 67).

Por nuestra parte hemos llevado a cabo una serie de experiencias en cuatro perros, los cuales recibieron durante cuatro días consecutivos una dieta estandar a la que se le añadía sodio (258 mM/día) en forma de ClNa y simultáneamente 0,2 mg de 9 α -fluorhidrocortisona (Astonin, Merck). El objeto era inducirles una retención crónica de sodio, que según se ha descrito en la literatura produce el denominado fenómeno de "escape" a dicha retención (108, 185). Existe evidencia que correlaciona este hecho con la presencia en orina de actividad natriurética, aislable mediante cromatografía en Sephadex G-25 fino. Al quinto día, con objeto de realizar una experiencia de aclaramiento corto, fueron anestesiados siguiendo el procedimiento habitual y para la recogida de orina se les realizó una talla vesical, mediante una pequeña incisión suprapúbica. La toma de muestras de sangre y la infusión de las soluciones de inulina, de PAH y de salino isotónico se realizaron en venas cubitales de la pata, no se registró la P.A., ni se realizó laparotomía. Durante la experiencia de aclaramiento se recogieron muestras de orina, que se unieron en un único pool por perro, y se fraccionaron después de previa liofilización para concentrarlas según el procedimiento descrito en C.3.a., b y c, en columnas con Sephadex G-25 fino, utilizado acetato de amonio 10 mM pH 6.8, a 4°C y la fracción IV, que eluye inmediatamente detrás del pico de las sales principales, se aisló, liofilizó y se bioensayó en ratas despiertas uninefrectomizadas.

D.4.a.1. Experiencias de aclaramiento corto en perros pretratados con 9 α -fluorhidrocortisona y con 258 mM de sodio al día.

Los parámetros más significativos de la función renal de estos perros se exponen en la tabla D.4.a.1. Estos parámetros representan la media de cinco períodos de aclaramiento, de 20 min cada uno. Se puede resaltar la presencia de una excreción de sodio, tanto absoluta como fraccional, elevada, manteniendo una filtración glomerular y flujo plasmático renal normales. La excreción de cloro fue similar a la de sodio. Si comparamos estos datos con los obtenidos por Favre y col. en 1975, en experiencias de este tipo, se ve que existe una gran similitud (108).

D.4.a.2. Cromatografía de las muestras de orina.

Se presenta un perfil cromatográfico del aislamiento de una sustancia de bajo Pm de muestras de orina de perros pretratados durante 4 días con 9 α -FHC y dieta con un contenido en sodio elevado (Fig. D.4.a.2.).

D.4.b. Actividad biológica de los extractos F IV de orina de los perros con expansión crónica del V E C.

El bioensayo de estos extractos F IV se realizó según el esquema descrito en D.3.b.2. y comentado en el apartado C.4.b.2. de los Métodos. La infusión de los extractos F IV de orina en perros

TABLA D.4.a.a.1: Parametros de la función renal durante las experiencias de aclaramiento en los perros tratados con $9 \times \text{FHC}$ y 258 mM de sodio/día.

PERRO N°:	PESO kg	\dot{V}_u ml/min/kg	U_{NaV} uM/min/kg	U_{KV} uM/min/kg	U_{CLV} uM/min/kg	C_{In} ml/min/kg	C_{PAH} ml/min/kg	FF %	FE_{Na} %
1	20	$0,09 \pm 0,01$	$14,2 \pm 1,9$	$5,7 \pm 0,6$	$12,5 \pm 1,5$	$4,1 \pm 0,5$	$11,1 \pm 1,4$	$0,4 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,3$
2	17	$0,15 \pm 0,04$	$5,4 \pm 1,6$	$0,4 \pm 0,2$	$6,1 \pm 1,8$	$4,1 \pm 0,2$	$8 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,04$	$1 \pm 0,3$
3	15	$0,07 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,05$
4	18,5	$0,25 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,6$	ND	$5,6 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,8$	$18,2 \pm 3,5$	$0,3 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,2$
Media:	17,6	0,138	7,25	2,17	6,73	3,77	10,71	0,36	1,212
\pm eem	1,23	0,04	2,44	1,77	2,1	0,84	2,7	0,05	0,44
n=	4	4	4	3	4	4	4	4	4

ND: No determinado.

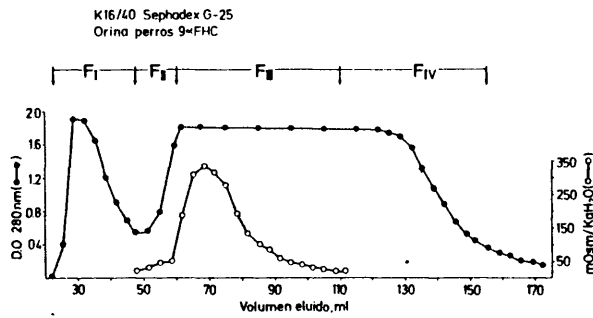


Fig. D.4.a.2. – Modelo de fraccionamiento de una muestra de orina de perro (concentrada por liofilización) pretratado con 9α -FHC y con una dieta rica en sodio. Esta muestra se filtró en un gel de Sephadex G-25 fino, en una columna K 16/100 y se utilizó como eluyente acetato de amonio 10 mM, pH:6.8. La F IV, que eluye inmediatamente detrás del pico de las sales, –medidas por la osmolalidad–, se liofilizó y se bioensayó en ratas.

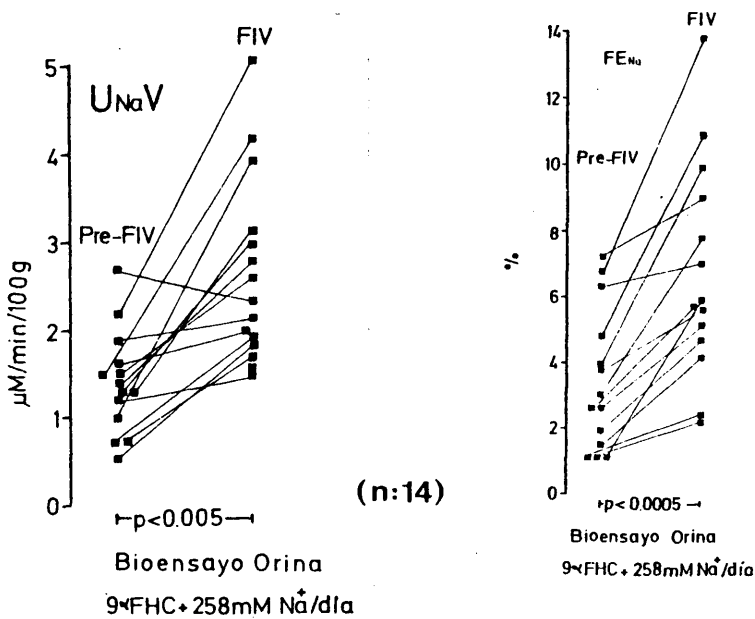


Fig. D.4.b.1. – Efecto de la inyección de los extractos F IV de orina de perros pretratados con 9α -FHC y 258 mM de sodio al día, sobre la excreción urinaria de sodio (U_{NaV}) y la excreción fraccional de sodio (FE_{Na}). Cada punto representa el resultado de una rata. Se comparan los valores previos con los obtenidos durante los 90 min. de bioensayo, desde el momento de la inyección del extracto. Se utiliza el test t de Student, para datos emparejados.

TABLA D.4.b.1.: Efecto de los extractos F IV de ORINA de perros pretratados con 9αFHC y una dieta con alto contenido en sodio, sobre U_{Na} , V_u , C_{In} , V_u , C_{In} y FE_{Na} .

RATA N°:	U_{Na} V: μ M/min/100g		V_u : μ l/min/100g		C_{In} : ml/min/100g		FE_{Na} %		BIOENSAYOS POSITIVOS:
	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	PRE	Δ	
1	1,3	+1,5	8	+10,4	0,28	-0,127	6,8	+7	+
2	1,9	+0,24	11,7	+1,54	0,39	-0,097	3,8	+1,8	
3	0,75	+1,15	5,66	+18,8	0,31	-0,01	1,9	+2,84	+
4	0,74	+0,8	20,8	+3,94	0,23	+0,02	2,58	+1,98	
5	1,3	+1,7	25	+8,3	0,39	0	2,58	+3,13	+
6	0,56	+1,14	9,6	+14,03	0,41	+0,1	1,04	+1,4	+
7	1,2	+0,3	19	+5,74	0,83	-0,34	1,05	+1,18	
8	1,5	+1,1	18,6	+0,8	0,6	-0,14	1,94	+2,25	+
9	1	+2,93	13,5	+19	0,78	-0,3	1,09	+4,81	+
10	1,42	+1,75	9,4	+2,83	0,28	-0,04	3,91	+5,95	+
11	1,58	+0,39	9,46	-2,8	0,18	+0,016	6,28	+0,69	
12	1,5	+2,7	8,83	+26,6	0,41	-0,01	2,97	+4,8	+
13	2,7	-0,37	26	+2	0,28	-0,09	7,2	+1,85	
14	2,2	+2,93	19,8	+27,3	0,34	+0,01	4,8	+6,1	+
Media:	1,4	+1,31	14,67	+9,9	0,41	-0,07	3,42	+3,27	9/14
t eem	0,16	0,28	1,85	2,71	0,05	0,03	0,58	0,57	64,3 %
* t-test emp.		4,758	3,78			-2,177		6,759	
p<		0,0005	0,0025			0,05		0,0005	

(Para explicaciones a cerca de las abreviaturas, ver Tablas anteriores).

tratados con 258 mM sodio y 0.2 mg de 9α FHC al día, produce un aumento significativo en la excreción urinaria de sodio (Tabla y Fig. D.4.b.1.). Estos aumentos fueron similares también a los descritos por Favre y col. (108) al bioensayar muestras F IV de orina, de los perros que ellos trataban con 9α FHC y 258 mM de sodio, en ratas de peso similar a las utilizadas por nosotros. Estos extractos F IV orina de perros con 9α FHC, producen aumentos significativos en el flujo urinario. El C_{In} descendió ligeramente. Estos descensos fueron de orden similar a los que hemos observado al bioensayar distintos extractos F IV de plasma y orina (Apartado D.3.b.). La excreción fraccional de sodio aumentó significativamente, durante los 90 min. siguientes al inicio de la administración de las muestras F IV de orina de estos perros. Estos aumentos fueron similares a los observados anteriormente al bioensayar los extractos F IV de orina y de plasma (arterial y SH) post-infusión portal. (fig. D.4.b.1.).

D.4.c. Comparación de los porcentajes de bioensayos positivos y de los modelos de respuesta natriurética.

1. Siguiendo los criterios anteriormente expuestos para calificar a un bioensayo de actividad natriurética como positivo, la prueba de los extractos F IV, de orinas recogidas de perros pretratados con 9α FHC, produce un 64,3% de ensayos positivos (fig. D.4.c.1.). Si se compara la incidencia de bioensayos positivos, entre todos los realizados en este trabajo (apartado D.3.b. y D.4.) en primer lugar se sitúan los bioensayos realizados con extractos de F IV procedentes de plasma arterial sistémico, recogido después de la infusión portal de $ClNa$ 855 mM (83,3%) seguidos de los realizados con extractos F IV de orina postinfusión portal de $ClNa$ 855 mM (70%), y de los realizados con la F IV de orina de perros con 9α FHC, y en el límite del 50%, se encuentran los realizados con extractos F IV de plasma SH post-infusión portal de $ClNa$ 855 mM, según se puede ver en la figura D.4.c.1. Los restantes bioensayos dieron un % de positivos inferior al 50%. Favre y col. (108) obtuvieron con extractos F IV de orinas de perros tratados con 9α FHC un 83% de pruebas positivas, según un criterio idéntico al utilizado aquí.

2. En cuanto al modelo de natriuresis que producen los extractos F IV de orina de perros tratados previamente con 9α FHC, presentaron un aumento de la $U_{Na}V$ que es progresivo desde el tiempo cero de la infusión del extracto, siendo máximo a los 30 y 90 min. de bioensayo. Si se comparan las figuras D.3.b.2.a.2., b.2., c.2., y D.4.b.2., se puede decir que el perfil de la excreción de sodio, producido por la infusión de F IV, obtenido de las orinas de los perros tratados con 9α FHC, es básicamente igual al obtenido con la infusión de las fracciones IV preparadas de la orina o del plasma (arterial y suprahepático) recogido después de la infusión en la vena porta de $ClNa$ hipertónico.

En la fig. D.4.c.2. se exponen las medias \pm eem, de los incrementos máximos (pico máximo) de $U_{Na}V$, que presentan cada una de las ratas durante los 90 min. subsiguientes al bioensayo de los extractos de F IV, de los plasmas y de las orinas analizados en las experiencias anteriores. Aquí se viene a confirmar lo expresado al estudiar comparativamente los diagramas de los modelos de respuesta natriurética al bioensayo de cada uno de los extractos F IV, viéndose que la mayor respuesta la producen los extractos F IV de orina de perros tratados con 9α FHC, seguidos a continuación por la de los extractos F IV de orina postinfusión portal de $ClNa$ hiperosmolar y por la producida por F IV de plasma arterial y SH, recogidas también post-infusión portal de $ClNa$ hipertónico.

En las tablas D.4.b.2. y D.4.b.3. se exponen los valores de las concentraciones plasmáticas de los electrolitos, así como el peso, valor hematocrito y la P.A. de las ratas en las que se bioensayaron los extractos F IV de orina de perros pretratados con 9α FHC.

TABLA D.4.b.2. Valores plasmáticos de distintos electrolitos y del peso de las ratas utilizadas para el bioensayo de los FIV-ORINA , perros 9 α FHC

	$\overline{\text{P Na}}$ mM/l	$\overline{\text{P K}}$ mM/l	$\overline{\text{P Cl}}$ mM/l	$\overline{\text{P Osm}}$ mOsm/kg H ₂ O	$\overline{\text{PESO}}$ g
Media :	142	3,71	114,4	290	212
± eem (n=14)	0,61	0,09	0,69	2,04	8,64

Abreviaturas pag. viii

TABLA: D.4.b.3. Valor Hematocrito y P.A. en bioensayos de FIV
ORINA perros pretratados con SaFHC y dieta rica en Na.

	Hematocrito (% Células)		P.A. (mmHg)	
	<u>Pre-FIV</u>	<u>Inyección y Post-FIV</u> (n=14)	<u>Pre-FIV</u>	<u>Inyección y Post-FIV</u> (n=14)
Media:	45	41	102,2	101,7
± eem	0,89	0,89	3	2,6

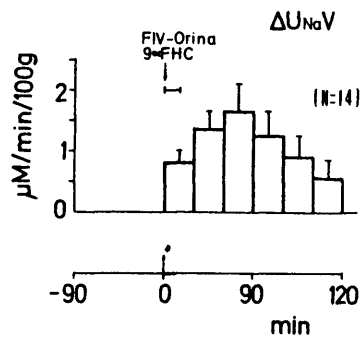


Fig. D.4.b.2.— Modelo de respuesta natriúrica durante el bioensayo de los extractos F IV de orina de perros con expansión crónica del VEC. Se representan los cambios respecto al basal, en la excreción urinaria de sodio después de la inyección de F IV y durante los períodos siguientes post-infusión. El número de ratas va entre paréntesis.

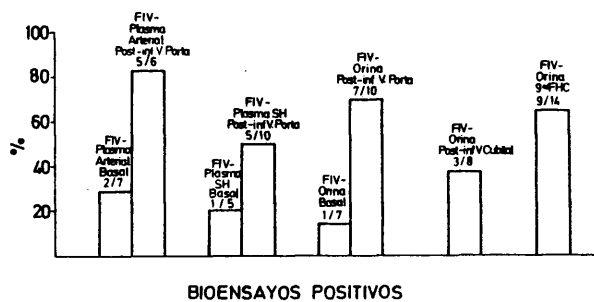


Fig. D.4.c.1.— Comparación de los porcentajes de bioensayos positivos observados a lo largo de las pruebas de los distintos extractos F IV de las muestras de plasma (arterial y suprahepático) y de orina, según los criterios expuestos en el apartado C.3.b.2.

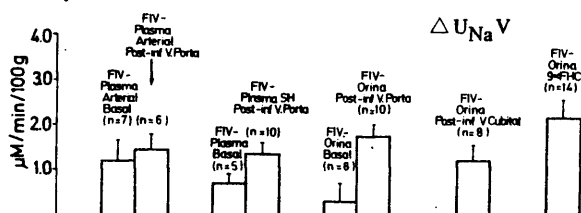


Fig. D.4.c.2.— Comparación de las medias \bar{x} de los incrementos máximos en la excreción urinaria de sodio, que presentaron cada una de las ratas, durante los 90 min subsiguientes al bioensayo de los extractos F IV, de las distintas muestras de plasma y de orina analizadas en las experiencias anteriores.

E. DISCUSION.

1. Nuestras experiencias (cf. D.1.b.), realizadas en perros anestesiados, demuestran que la infusión aguda de una pequeña cantidad de ClNa hipertónico en la vena porta produce un aumento rápido y significativo en la excreción de sodio que es superior al que se observa al infundir la misma solución en una vena cubital (Fig. D.1.b.1.). La FG aumentó significativamente sólo cuando el ClNa hipertónico se infundió en la vena porta, y este hecho se presentó asociado al aumento en la natriuresis (Fig. D.1.b.2.). El FPR, el FSR y la P.A. no variaron como consecuencia de la infusión salina hiperosmolar por ninguna de las dos vías. Las excreciones fraccionales de sodio y de cloro, respectivamente, aumentaron de forma similar después de la infusión salina hipertónica tanto si es infundida en la vena porta como en la vena cubital.

Estos resultados confirman estudios previos realizados por Daly y col. (75) y Strandhoy y col. (325) en perros anestesiados, así como Passo y col. (263) en gatos, también anestesiados, que describen que la infusión intraportal de una solución de ClNa hipertónico produce una respuesta natriurética que es significativamente superior a la que observan si la misma solución se infunde en una vena sistémica. Sin embargo, estos mismos resultados no fueron encontrados por autores como Potkay y Gilmore (278) en perros despiertos, cuando repitieron los experimentos de Daly y col. (75). Recientemente, Kapteina y col. (179) encontraron en perros despiertos, una respuesta natriurética y diurética similar a la infusión intraportal y en la vena cava de una solución de ClNa 855 mM. Hay que resaltar la utilización habitual por todos estos investigadores, de un tratamiento a los perros con mineralocorticoides y vasopresina, previo a las experiencias agudas, que puede situar al sistema hormonal, en función de las dosis y el tiempo de tratamiento, en condiciones tales que un pequeño y agudo estímulo hipertónico intraportal se vea totalmente enmascarado por estímulos más permanentes e intensos causados por las hormonas administradas.

En este sentido un pretratamiento, que posiblemente, no pueda dejar de afectar a los resultados, es el de Kapteina y col. (179); sus perros recibieron durante 8-10 días, 400 ml de agua destilada intragástricamente y una dieta que contenía un 75% de agua. De acuerdo con lo postulado por Haberich (ver apartado A.3.c.), este volumen de agua a nivel porta-hepático, puede producir continuamente un estímulo hipotónico, aumentando el flujo urinario, unido a descensos en la concentración plasmática de ADH, tal que un estímulo hipertónico puntual, ClNa 855 mM, 0.05 ml/min/Kg de peso, 40 min, puede solaparse con el estímulo hipotónico anterior y que este último quede disminuido (120, 150).

En ratas despiertas Perlmutter y col. (268) ha encontrado que la administración intraportal de ClNa isotónico produce mayor respuesta natriurética, que si infunde esta solución en la cava. Asimismo si la velocidad de infusión aumenta por encima de 0,075 ml/min/Kg de peso, este efecto no se produce. Esto mismo lo encontró Strandhoy y col. (325). Estos hechos hay que tenerlos en cuenta a la hora de comparar los distintos resultados obtenidos por los distintos investigadores. El fundamento de los mismos parece estar en que en el territorio porta-hepático hay presentes también receptores sensibles a cambios en la presión y/o tensión de las paredes vasculares, según han encontrado Ohm y col. (259), Liang (207) Nijima (254) y Selkurt (306). En un trabajo reciente de Valdívieso y col. (343), siguiendo un diseño experimental idéntico al de Perlmutter, encuentran una mayor excreción absoluta y fraccional de sodio después de la infusión de salino isotónico intraportal, que en una vena sistémica, y además esta respuesta se magnificaba si las ratas eran previamente tratadas con una dieta rica en sodio. En relación con la dieta, Blake y Lin (31) han encontrado que la infusión de ClNa hipertónico en la porta en ratas sedientas, reduce su ingesta de salino isotónico y sin embargo mantiene igual la ingesta de agua.

Con objeto de ver en qué medida otras respuestas renales, concomitantes a la natriuresis específica, obtenida en nuestros resultados, después de la infusión portal, pueden contribuir a activar los mecanismos responsables de esta última, seguidamente analizaremos las respuestas renales más significativas. En nuestros resultados, los valores plasmáticos de sodio y de cloro durante la infusión

salina hipertónica no variaron y presentan valores similares en los perros que reciben la infusión en la porta y los que la reciben en la v. cubital. Nashat y col (248) han encontrado asociada natriuresis y valores de P_{Na} elevados, después de una infusión salina hipertónica, y han atribuido a los aumentos en P_{Na} un papel responsable en la natriuresis. En nuestras experiencias no hay alteraciones en P_{Na} que puedan justificar su contribución a la natriuresis específica después de la infusión intraportal de $ClNa$. Se conoce que tanto P_{Na} como FG afectan ambos a la carga filtrada de sodio, pero tienen efectos diferentes en la resorción tubular. Kady y col. (174) han encontrado aumentos en la FE_{Na} , se acompañan de cambios proporcionales en la resorción tubular de sodio, si se deben a aumentos en la FG , pero no cuando se debe a aumentos en P_{Na} . En nuestros resultados, no podemos atribuir los aumentos específicos en la excreción de sodio después de la infusión portal, más a un aumento específico en la carga filtrada, que a un descenso en la resorción tubular de sodio. Tampoco esta diferencia en la respuesta natriurética puede ser explicada debido a hipotéticos cambios dilucionales, ya que el valor hematocrito, la concentración de proteínas plasmáticas, de electrolitos y la P.A. no variaron cuando se infunde $ClNa$ hipertónico en la v. porta, de forma distinta a cuando se infunde en la v. cubital.

Daly y col. (75), encontraron que, en algunos casos, la mayor respuesta natriurética después de una infusión de $ClNa$ hipertónico en la porta, estaba asociada a aumentos en la FG . Pero, a la vez, otros perros con igual respuesta natriurética no presentaban aumentos sino más bien descensos en el FG . Perlmutter (268) y Valdivieso (343) tampoco observaron asociación entre aumentos en la excreción después de la infusión de salino isotónico en la porta y aumentos en la FG . Por otro lado, Scherman y col. (298) y Gerber y col. (125) entre otros, han encontrado que la infusión en la arteria renal de una solución de $ClNa$ hipertónico, origina un descenso en la FG , que es proporcional al que se observa en el FSR . Nashat y col. (248), encuentran resultados parecidos al infundir sistémicamente $ClNa$ hipertónico. Estos hechos estaban en aparente contradicción con la vasodilatación observada en vasos sanguíneos aislados y en otros órganos distintos del riñón al infundir $ClNa$ hipertónico. Los mencionados investigadores han demostrado que hay un mecanismo específico a nivel renal, que es el mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular que media esos descensos en la FG , observados después de las infusiones hipertónicas. Según han planteado, la causa aparente de activación del mismo es la inhibición de la resorción proximal de sodio, que produce aumentos del flujo tubular que llega al asa de Henle y pone en marcha el mecanismo de retroalimentación negativa (125, 127, 248, 298). En base a todo ello, podría sugerirse que, en nuestras experiencias, después de la infusión de salino hipertónico en la v. porta, el riñón parece recibir una "información" distinta a la que le llega después de infundir la misma solución sistémicamente, ya que los mecanismos intrarrenales esperados, parecen no actuar después de la infusión portal e incluso podrían actuar otros distintos.

En otro tipo de experiencias, Uranga y col. (338, 339), han caracterizado una sustancia humoral, de bajo P_m , que puede ser aislada del efluente sanguíneo hepático del sapo *Bufo arenarum* después de una expansión del volumen de plasma. A esta sustancia se le denomina glomerulopresina (GPS), que produce, al ser infundida en un riñón aislado, aumentos en la FG , presión de filtración y del volumen urinario (337, 338). En este sentido, podría argumentarse que la diferente respuesta natriurética a la infusión portal, puede deberse a un distinto grado de expansión del VEC con respecto a la infusión salina sistémica. Por los datos que poseemos de estos perros, esta diferencia no es factible, además, la composición, y la velocidad a la que fueron administradas las soluciones de $ClNa$ 855 mM fueron idénticas en la v. porta y en la v. cubital. Se ha descrito en la literatura, la capacidad del hígado para acumular grandes volúmenes de líquido, luego si se argumentara este fenómeno como durante de las diferentes respuestas renales, el aumento del VEC después de la infusión portal, sería menor después de la infusión intraportal (120, 150, 196).

La infusión sistémica de salino hipertónico induce inhibición de la actividad de renina (125, 178). Esto mismo encontró Kapteina y col. (179) al infundir $ClNa$ 5% en la v. porta. Esta inhibición también ha sido descrita por otros autores al infundir $ClNa$ hipertónico a nivel renal (125), o bien al administrar comida salada a perros (173). Nosotros no hemos valorado la actividad de renina, ni de



la aldosterona, en la respuesta específica a la infusión portal, pero hemos estudiado los cambios en el índice: U_{K^+V}/U_{Na^+V} , corregido por la carga de sodio que llega al túbulo distal, $(U_{K^+V} + U_{Na^+V})$, que nos da una idea de la actividad de la aldosterona (Fig. D.1.b.4.), y, en concreto, hemos observado que hay un descenso significativo en este índice como consecuencia de la infusión de CNa hipertónico, siendo más importante cuando ésta se realiza en la v. porta. Sin embargo, de estos resultados no podemos explicar la relación que puede existir entre la respuesta natriurética significativa a la infusión de CNa hipertónico en la porta y estas importantes disminuciones en la actividad de la aldosterona.

El papel de la ADH entre los mecanismos que median las respuestas a la estimulación de los osmorreceptores porto-hepáticos, ha sido sugerido primeramente por Haberich y col. (150). Estos autores han encontrado evidencia de que infusiones hipotónicas en la v. porta causan aumentos superiores en el flujo urinario que las mismas infusiones en la vena cava, mientras que infusiones intraportales hipertónicas producen un descenso del flujo urinario, que no se observa si se infunden en la v. cava (150), y postulan que alteraciones en la osmolaridad en la sangre portal pueden causar liberación de ADH, mediante un mecanismo nervioso, implicando la rama hepática del nervio vago (150). Lydtin encuentra unos resultados similares en perros (222). Posteriormente Schneider y col. (297) y Glasby y col. (133) y Kapteina y col. (179) no confirmaron estos resultados en experiencias con diseño similar realizadas en perros despiertos. Recientemente Chwalbinska-Moneta (64), también en perros despiertos, ha encontrado que la infusión de CNa hipertónico en la v. porta produce un aumento muy acusado, aunque transitorio, de la concentración de ADH en plasma. Otros investigadores han descrito que tanto la denervación hepática (2), como la hepatectomía parcial (269) producen disminución de la capacidad para desprenderse de sobrecargas acuosas y un empeoramiento en la capacidad de concentración de la orina y así como una menor respuesta natriurética a infusiones de CNa isotónicas, respectivamente. Sin embargo, nosotros hemos observado que la infusión de CNa 855 mM causó un aumento en el flujo urinario, que es similar tanto si se infunde en la porta como en la v. cubital (Fig. D.1.b.1.). Luego no hay asociación aparente entre natriuresis específica post-infusión de CNa hiperosmolar en la porta y diuresis específica. De esto no se puede extraer la consecuencia de que la ADH medie en las respuestas obtenidas en nuestro trabajo.

De las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos por los distintos investigadores, muchas veces se ha planteado como una razón que las justifique, el hecho de que las experiencias se han llevado a cabo en distintos tipos de animales de experimentación y así como la utilización de soluciones diferentes (isotónicas, hipotónicas, y/o hipertónicas) y los diferentes criterios para valorar las variaciones en la excreción renal de sodio subsiguientes a las infusiones (291).

En investigaciones acerca del papel del SGI y en concreto de los receptores presentes en la circulación esplácnica en la regulación de la excreción renal de sodio, Lennane y col. (200, 201) y Carey y col. (61, 62), han encontrado en conejos y en humanos, ligeramente depleccionados de sodio, una respuesta natriurética mayor cuando se les administra una solución de CNa hipertónico intragástricamente que cuando se les infunde sistémicamente. Recientemente Hanson y col. (155) y Obika y col. (257), han administrado CNa hipertónico intragástricamente a perros y a conejos, respectivamente, no anestesiados y con una dieta previa con baja concentración de sodio, observando que la respuesta natriurética es de igual magnitud que si se administra intravenosamente. Ahora, si los animales son tratados previamente con una dieta rica en sodio, la infusión i.v. de CNa hipertónico produce mayor natriuresis que la intragástrica; postulando en contra de lo planteado por otros investigadores (61, 201), que en el territorio porta y en el SGI no existen unos posibles monitores de cambios en la concentración de electrolitos de la sangre portal como consecuencia de la ingesta, y que estén a la vez implicados en los mecanismos de control de la excreción renal de sodio, añadiendo que sus resultados están en consonancia con lo encontrado por Gordon y col. (141) en humanos.

De estas experiencias mencionadas hay que resaltar primeramente, que la preparación previa de los animales, en concreto, el contenido en sodio de la dieta, es un factor esencial que condi-

ciona el estado del volumen extracelular, condicionando también las respuestas renales frente a infusiones salinas, bien i.v. o bien i.g.; ya que parece probado que las respuestas a una administración salina no están sólo en el contenido de sodio de dicha solución, sino en el del organismo del animal que la recibe (173, 303, 355). Luego el estado exacto de deplección salina de los animales de Lennane, por un lado, y de Hanson y Obika, por otro, en principio parece difícilmente comparable. En segundo lugar, en un trabajo reciente de Willis y col. (360), se ha puesto de manifiesto que una expansión con salino isotónico del orden del 2% del peso en ratas, si se hace mediante una sonda intragástrica es la mitad con respecto a la misma expansión realizada intravenosamente.

En un trabajo en ratas despiertas, recientemente realizado en nuestro laboratorio, López Novoa y Zubiatur (218) han demostrado que la infusión i.v. de una solución de ClNa hipertónico, produce un mayor aumento de la natriuresis que la administración i.g., y que este aumento específico va acompañado de un descenso en el valor hematocrito y unos aumentos en el P_{Na} similares a los observados por Hanson (155) y Obika, después de la administración también i.v., de salino hipertónico, lo cual confirma lo encontrado por Willis (360), y plantea que la infusión intragástrica no puede utilizarse para hacer un estudio comparativo con infusiones intravenosas, ya que las dos vías de administración causan expansiones del volumen extracelular opuestas. Además el trabajo de López Novoa y Zubiatur (218), demuestra en ratas despiertas que la infusión en el bazo (217), de ClNa 855 mM produce mayor respuesta natriurética que la infusión de la misma solución en una vena yugular, a igual grado de expansión del VEC.

En resumen, de nuestros resultados (cf. D. I. b.), podemos concluir que el hígado es capaz de sentir cambios en la concentración de ClNa de la sangre que le llega por la vena porta, y que además modifica mediante un mecanismo que no es posible dilucidar de estos datos, la respuesta renal habitual a la infusión intravenosa sistémica de una solución de ClNa hipertónico (Tabla E. I.). Las respuestas renales concomitantes a la natriuresis específica de la infusión portal, no permiten explicar plenamente el mecanismo intrarrenal que media esta última. Sin embargo, podemos decir que el aumento de la FG contribuye, al menos en parte, a la respuesta natriurética post-infusión portal, aunque no podemos determinar la causa del aumento de la FG.

2. El siguiente problema que nos planteamos fue valorar si esa capacidad del hígado o de los receptores situados en el territorio vascular portal, de detectar cambios en la concentración de ClNa en la sangre de la v. porta, se debe a la presencia de alteraciones conjuntas de ambos iones, o existe una especificidad iónica para el sodio o para el cloro, separadamente. Hemos observado que la administración intraportal de una solución hipertónica de ClHArg (con la misma concentración de iones cloruro que en ClNa 855 mM) produce aumentos rápidos y significativos en la U_{NaV} , en la FE_{Na} , \dot{V}_u y Co_{sm} , que son superiores a los que se observaron cuando se infunde la misma solución en una v. cubital (Fig. D. I. d. 1.). Estas respuestas renales a la infusión de ClHArg en v. porta no van acompañadas de cambios en la presión arterial, FG, ni FSR. Además el índice utilizado para valorar la actividad de la aldosterona está significativamente disminuido tanto después de la infusión sistémica como portal (Fig. D. I. d. 6.).

La respuesta natriurética que se ha observado al infundir en la v. porta una solución hiperosmolar con Cl^- , pero sin Na^+ , es de orden similar a la obtenida al infundir intraportalmente ClNa 855 mM (Tabla E. I.). El hígado, o el territorio porta-hepático, parecen detectar específicamente cambios inducidos experimentalmente en la concentración de iones cloruro en la sangre portal, respondiendo de forma específica con aumentos en la excreción de sodio.

Se conoce que la infusión de ácido clorhídrico o de sus derivados, como es el caso del ClHArg, produce en el plasma una acidosis metabólica hiperclorémica (68). Nosotros hemos encontrado aumentos significativos en el PCl como consecuencia de la infusión de ClHArg, aunque iguales después de la infusión por una y otra vena. Wilcox (355) ha descrito que la acidosis metabólica originada por este tipo de infusiones produce aumentos en la excreción de sodio, independientemente del hecho de la hipercloremia. En nuestro caso observamos una hipercloremia y acidosis similares después de la infusión portal y cubital, por lo que este fenómeno no nos explica las diferencias en

TABLA E.1.: Aumentos en la excreción urinaria de sodio, como consecuencia de la infusión de soluciones hiperosmolares en la v.porta y en una v.cubital, en perros anestesiados.

SOLUCION HIPEROSMOLAR:	PERIODO 1 (0-40 min)		PERIODO 2 (40-80 min)		PERIODO 3 (80-120 min)	
	V. PORTA	V. CUBITAL	V. PORTA	V. CUBITAL	V. PORTA	V. CUBITAL
CLNa 855 mM (n=10)	8,22±2,24*#	2,85±2,22	12,75±4,7*#	3,07±2,46	10,53±2,6*#	2,45±3,5
CLHATg 855 mM (n=10)	10,8±2,95*#	5,33±1,59*	11,05±3,81*	11,54±2,98*	10,83±3,49*	13,3±4,34*
SO ₄ Na ₂ 430 mM (n=6)	48±10,54*	78,2±17,1*	40,2±13,34*	70,8±12,72*	22,4±9,95*	37±7,3*
Sol. Azucares (n=10)	7,81±3,05*	9,06±4,45*	5,4±2,3*	5,6±3,13*	2,67±0,92*	7,44±3,79*

Se exponen la Media ± eem de los aumentos respecto a los valores en el periodo BASAL, en $\mu\text{mol}/\text{min}$.

* p < 0,05, respecto a basal, dentro de cada infusión (Test t de Student para datos emparejados).

p < 0,05, respecto al valor del parametro en la v.cubital (Test t de Student para datos no emparejados).

n = , número de perros utilizados en cada experiencia.

la excreción de sodio, tanto absoluta como fraccional, entre la infusión de CIHArg por una vena u otra.

Diversos autores han observado que el aminoácido dibásico L-Lys disminuye la resorción de sodio en el túbulo proximal (58). La Arg que es otro aa dibásico podría tener un efecto similar a ese mismo nivel (c.f.A.2.). Si esto fuera así, aumentaría el flujo tubular hacia los segmentos más distales de la nefrona, lo que haría aumentar la excreción de sodio y de cloro, produciendo también aumentos en el flujo urinario y en el agua libre. Pero, en principio, esta acción sería de magnitud similar después de la infusión cubital de CIHArg, que después de la infusión portal.

Otro hecho a discutir sería que en la infusión intraportal de CIHArg, la Arg podría ser metabolizada en el hígado y, por lo tanto la concentración de la misma que llegará al túbulo proximal fuese menor que la que llegará después de la infusión cubital. Si la resorción en esa parte de la nefrona está acoplada a la de sodio y agua (c.f.A.2.), después de la infusión cubital este proceso de resorción acoplada aumentaría con la presencia de mayor cantidad de Arg y haría que el fluido que salga de ese segmento posea menos sodio que después de la infusión en la vena porta. Estas diferencias sí podrían ser responsables de las que después se observan en U_{Na} , V , FE_{Na} y \dot{V}_u .

De los resultados de estas experiencias podemos deducir la existencia de una capacidad del hígado y/o del territorio porta para detectar cambios específicos en la concentración de iones cloruro, que le hacen modular las respuestas renales, induciendo modificaciones en la excreción de sodio. Aunque no podemos aclarar con precisión el mecanismo intrarrenal específico por el que el hígado "actúa" produciendo esas modificaciones, sí se puede sugerir que, en este caso, la respuesta natriurética y diurética específica post-infusión intraportal de CIHArg va asociada a aumentos en la FE_{Na} , que podrían indicar una disminución de la resorción proximal de sodio y de agua por alguna de las razones anteriores apuntadas, aunque no podemos excluir acciones más específicas a niveles más distales de la nefrona.

Los estudios llevados a cabo para ver la acción específica de variaciones en la concentración de sodio en el área porta-hepática, utilizando comparativamente la administración intraportal e intravenosa de una solución hipertónica de $SO_4 Na_2$ 430 mM, muestran unos aumentos significativos en la excreción de sodio tanto absoluta (fig. D.1.c.1.) como fraccional (fig. D.1.c.3. y tabla E.1.) así como del flujo urinario y del aclaramiento osmolar, que son similares a los observados en los perros que la reciben en la VC. Estas respuestas no van acompañadas de variaciones en el FG, FSR ni la PA.

Los resultados observados al utilizar una solución con una concentración de sodio idéntica a la de la ClNa 855 mM, pero sin cloro, creemos que se deben fundamentalmente al manejo por el túbulo renal del ión SO_4^- , que es poco resorbible, y que a nivel del asa ascendente gruesa de Henle y del túbulo contorneado distal produce una disminución del transporte activo de cloro y una alteración del voltaje transepitelial, lo que provoca también la disminución de la resorción de sodio y de otros cationes a esos niveles (56, 68). Ambos efectos, unidos al hecho de una sobrecarga de sodio importante son los responsables directos de esa respuesta natriurética tan elevada que se observa independientemente de la vena por la que se infunde el $SO_4 Na_2$ 430 mM (Tabla E.1.).

De estas experiencias no podemos deducir una idea clara acerca de la capacidad del territorio vascular porto-hepático para sentir cambios específicos en la concentración de sodio de la sangre portal, inducidos experimentalmente. Sin embargo, el hecho de que aumentos en la concentración de ClNa de la sangre portal, mediante una infusión del mismo, produzcan una respuesta natriurética específica mayor que la infusión sistémica de ClNa hipertónico, hace necesaria una reinvestigación de esta posible especificidad para el sodio de los receptores portales.

3. Con objeto de investigar si el hígado responde específicamente a cambios en la concentración de electrolitos o bien de la presión osmótica, hemos infundido soluciones hiperosmolares de azúcares en la vena porta y en una vena cubital (cf. D.2.). En estos estudios no hemos observado una respuesta natriurética específica frente a aumentos de la osmolaridad de la sangre de la VP, inducidos

mediante la infusión aguda en la misma de soluciones hipertónicas no electrolíticas, e isoosmóticas con las de los electrolitos anteriores (cf. D. I. b., D. I. c., y D. I. d.).

Por ello la respuesta natriurética específica a la infusión intraportal hiperosmolar de ClNa y de ClHArg, respectivamente, no parece deberse al hecho de inducir cambios en la osmolaridad de la sangre portal, sino a la estimulación de las áreas sensibles del territorio vascular portal y de los receptores correspondientes, mediante cambios en la concentración de electrolitos (Cl⁻ y Na⁺) (Ver Tabla E. I.).

Experiencias anteriores realizadas con este mismo objetivo en diferentes animales de experimentación por Daly (75), Strandhoy (325), Perlmutter (268), Valdivieso (343) y Passo (263), utilizando infusiones de azúcares isoosmóticas a las de los electrolitos, no encuentran aumentos específicos en la natriuresis después de la administración intraportal de dichas soluciones, sugiriendo que la respuesta a cambios en la concentración de electrolitos en la VP, no se debe a alteraciones en la osmolaridad. Andrews y Orbach (16) encuentran una mayor tasa de descargas nerviosas de las fibras aferentes del nervio vago del hígado de conejo, al ir aumentando la concentración de ClNa en el medio de perfusión. Igualmente, y éste es un dato importante, observaron respuestas similares con sulfato sódico y cloruro de litio, y no con manitol o glucosa. Adachi y col. (2) encuentran resultados similares y además demostraron la existencia de dos tipos de fibras, unas que responden a aumentos y otras a descensos de la concentración de ClNa. Igualmente podemos decir de las investigaciones de Schmitt (295) y de Blake y Lin (31).

Sin embargo Nijima (253), encuentra en hígado de cobaya, que son los cambios de la osmolaridad (utiliza mono y disacáridos) los que inducen los aumentos en la tasa de descargas de las terminaciones aferentes del nervio vago hepático. También Velikanova (344), Aizman (4) y otros (111, 333, 335) encuentran resultados similares en gato. Por otro lado, Haberich y col. (150) han sido los que mayor número de investigaciones han realizado, poniendo de manifiesto la capacidad del hígado para sentir cambios en la osmolaridad de la sangre portal, inducidos experimentalmente mediante infusiones en la VP, de agua destilada o de soluciones de azúcares, de distintas osmolaridades.

Teniendo en cuenta los datos existentes en la literatura y los resultados obtenidos en nuestras experiencias, parece lógico pensar que el hígado, y su territorio porta-hepático, tengan capacidad para detectar independientemente cambios en la osmolaridad y en la concentración de electrolitos (Cl y Na), tanto inducidos experimentalmente como por variaciones en la ingesta diaria. De tal modo que modularía las posibles respuestas renales de forma distinta; los cambios en la concentración de electrolitos de la sangre portal como hemos visto, afectan a la excreción de sodio, mientras que los cambios en la osmolaridad pondrían en marcha los mecanismos que regulan la osmolaridad y la excreción de agua. Luego mediante las dos vías conjuntamente el hígado parece jugar un importante papel en la homeostasis del VEC (75, 150, 291, 303).

4. Una vez analizadas las respuestas renales específicas que observamos al infundir soluciones hiperosmolares de ClNa y de ClHArg en la VP, poniendo de manifiesto la mediación del hígado en ellas, nos planteamos investigar acerca de cuál es la relación funcional entre el hígado y el riñón en estas situaciones.

En investigaciones realizadas por diversos autores sobre este tema se han planteado una serie de diferentes mecanismos posibles. Así el grupo de Haberich y col. (150) encontraron que la mayor respuesta diurética post-infusión de una solución hipotónica en la porta, desaparecería si seccionaban la pequeña rama hepática del nervio vago que va del estómago al hígado (81, 150). Mecanismos de este tipo son apoyados por Nijima (253) y Adachi (2) también encuentra que desaparecen sus respuestas después de la vagotomía. Resultados parecidos han obtenido Aizman (4), Passo (263), Chwalbinska (64) y Blake y Lin (31) y Kiil en humanos (182). Los trabajos de electrofisiología también plantean la mediación de mecanismos nerviosos (291). En síntesis, este mecanismo consistiría en que el trasvase de información entre el hígado y el riñón se haría mediante el nervio vago hepático, que integraría las señales en el SNC, posiblemente a nivel de los núcleos hipotalámicos. La conexión con el órgano efector —el riñón— podría llevarse a cabo mediante innervación renal directamente, o mediante la liberación de una sustancia hormonal de acción directa sobre el riñón (291).

Otra serie de investigadores no encuentran que las respuestas específicas a infusiones intraportales de ClNa hipertónico o isotónico desaparezcan con la vagotomía. Este es el caso de Daly y col. (75), Strandhoy y col. (325), Perlmutter y col. (268), Lennane y col. (200, 201) y Valdivieso y col. (343), por lo que sugieren que la respuesta natriurética específica después de la infusión portal esté mediada por un factor humoral, de posible origen hepático y que el estímulo para su liberación es el cambio de la concentración de Na^+ en la sangre portal. Este planteamiento viene apoyado por el hecho de que Milies (231) aisló y parcialmente caracterizó una proteína globular a partir de concentrados de hígado perfundido, la cual producía natriuresis y diuresis al ser inyectada en un perro y que podría tener que ver con la GPS caracterizada por Uranga (339) y posiblemente con otras hormonas de actividad natriurética cuya presencia se ha puesto de manifiesto en situaciones en las que se necesita el mantenimiento homeostático del balance de sodio (82, 210, 303).

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la hipótesis de la mediación de un mecanismo humoral como responsable de la natriuresis específica observada después de las infusiones hipertónicas de electrolitos en la VP. Asimismo, y de acuerdo con lo sugerido por los investigadores que plantean esta unión funcional humoral, hemos estudiado la posibilidad de que estuviera implicada en dicha unión una sustancia humoral de origen hepático (75, 231, 339).

Con objeto de probar esta hipótesis, se ha investigado si hay presente actividad natriurética en la sangre que sale del hígado (SH) después de una infusión de ClNa hipertónico en la vena porta (cf. D.3.a.) y coincidiendo con el momento de la máxima respuesta natriurética a la infusión hipertónica portal. Para ello el plasma de esta sangre se infundió en la ARI de perros anestesiados (cf. D.3.a.2.). Nuestros resultados demuestran que el plasma suprahepático, recogido después de una infusión intraportal de ClNa hipertónico (SH_2), produce mayor natriuresis que el plasma (SH_1), recogido previamente a la infusión portal, si se infunden en un riñón de perro (fig. D.3.a.2.1.).

De estas experiencias podemos sugerir que la infusión en la VP de una solución de ClNa hipertónico puede causar un aumento de la concentración de una sustancia en el plasma SH_2 , que al infundirla en la ARI de un perro produce un aumento en la excreción de sodio, mayor que el que se produce al infundir el plasma SH_1 basal. Esta sustancia podría estar presente en el hígado ya sintetizada y almacenada, y por tanto también presente en el plasma basal, de tal modo que la infusión salina portal estimule mayor liberación. Otra posibilidad es que esta infusión portal y el consiguiente aumento de la concentración de Cl y Na en la sangre, estimule la síntesis o liberación al torrente circulatorio de una sustancia, distinta a la anterior, y de acción directa sobre el riñón.

El plasma SH_1 basal, parece ejercer una acción vasodilatadora sobre el riñón, y este efecto puede ser responsable, al menos en parte, del aumento de la natriuresis que está mediado por un descenso en la fracción de filtración (fig. D.3.a.2.6.) (227, 280). Sin embargo, el nuevo incremento en la $U_{\text{Na}} V$, inducido por el plasma SH_2 post-infusión intraportal de ClNa, no puede explicarse del mismo modo, ya que no va acompañado de cambios adicionales en la perfusión renal. En estos resultados, las acciones natriuréticas y/o vasodilatadoras inducidas por los plasmas SH, no están mediadas por alteraciones hemodilucionales, o por cambios en las propiedades fisicoquímicas de la sangre renal, ya que los plasmas SH; tenían una composición idéntica a los plasmas sistémicos. Tampoco se pueden explicar estas respuestas mediante hipotéticas expansiones del volumen de plasma, ya que la tasa y la cantidad total de la infusión de plasma SH fue pequeña (1 ml./min., durante 20 min.).

Los resultados de estas investigaciones están en consonancia con los planteamientos previos que sugerían la mediación de un factor humoral y de posible origen hepático, en la respuesta natriurética específica a la infusión en la VP de una solución salina hipertónica.

5. Después de las experiencias anteriores, se hacía imprescindible una caracterización precisa de la actividad natriurética presente en los plasmas SH recogidos después de la infusión hipertónica intraportal, así como estudiar si una actividad de características similares estaba presente en el plasma sistémico y/o en la orina, coincidiendo en el tiempo con la encontrada en el plasma SH.

Después de los primeros experimentos de De Wardener y col. (87), Mills y col. (233), y Lichardus y Pearce (208), se comenzó a postular la existencia de un factor humoral excretable, que contribuyera a las respuestas natriuréticas que se observan después de una expansión del VEC. Un buen número de investigadores han demostrado que es posible aislar una sustancia de bajo Pm con actividad natriurética, de la orina (37, 67), del plasma (36, 147), de tejido renal (139, 219), y de extractos de hipotálamo y de pituitaria posterior (157, 297), procedentes de hombres o de animales, en situaciones de expansión del VEC, p.e., que reciben grandes cantidades de sal en la ingesta; que está ausente en situaciones como la cirrosis, con presencia de edemas (101). Sin embargo, este material no ha sido caracterizado bioquímicamente de una forma completa. La comparación entre los distintos factores natriuréticos aislados por diversos investigadores, se basa en la metodología empleada en el aislamiento del factor, usualmente mediante una cromatografía en Sephadex G 25, o en un Biogel equivalente, en su aparición en el pico que eluye inmediatamente después del de las sales principales.

Como se ha detallado en la Introducción (cf. A.4.) las propiedades biológicas de esta hormona natriurética son: a) Capacidad de inducir natriuresis; b) Inhibir el transporte de sodio (actividad antinatriurética); c) Inhibición de la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ asa, y d) aumenta la capacidad de contracción vascular.

De acuerdo con todos estos trabajos, nos planteamos estudiar si un tipo de sustancia similar a la encontrada por estos investigadores, sería también responsable de la actividad natriurética presente en el plasma suprahepático recogido después de la infusión en la VP de ClNa hipertónico, así como investigar su presencia en plasma arterial sistémico y en orina. Para ello hemos aislado mediante cromatografía en Sephadex G 25, a partir de muestras de plasma (suprahepático y arterial) y de orina, la fracción que eluye inmediatamente después de las sales (F IV) y hemos probado su actividad natriurética en ratas (cf. D.3.b.).

Hemos observado mediante este bioensayo la presencia de actividad natriurética en la fracción IV obtenida de plasma (arterial y suprahepático) y en la orina después de la infusión aguda de ClNa hipertónico en la vena porta. Esta actividad natriurética no se encuentra en las muestras recogidas antes de realizar la infusión portal. También podemos decir que hay una relación directa entre la respuesta natriurética a la infusión de salino hipertónico en la VP y la presencia de actividad natriurética en la orina y en el plasma arterial y suprahepático recogidos después de dicha infusión portal. Asimismo, hemos observado que en la orina de perros que responden con el fenómeno de "escape" a una expansión crónica del volumen extracelular hay también presente actividad natriurética de este tipo, lo cual está plenamente de acuerdo con lo encontrado anteriormente por otros investigadores (108). Por otro lado hemos podido comprobar que esta última actividad natriurética es similar a la observada por nosotros en las muestras de orina y de plasma (arterial y suprahepático) recogidas después de la infusión portal.

De estos resultados se puede deducir que la actividad natriurética presente en las muestras post-infusión intraportal, se debe a la presencia de un factor natriurético, de bajo Pm, aislable mediante cromatografía en Sephadex G 25 y de características similares al descrito por otros autores (84, 194).

Clarkson y col. (66, 67) han caracterizado parte de las propiedades fisicoquímicas de la llamada hormona natriurética y cómo su papel puede verse afectado por el tratamiento con diversas enzimas, cambios de pH y de temperatura. Buckalew y col. (146, 147), utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión, han conseguido purificar más este factor, postulando que puede provenir, mediante degradación enzimática, de un precursor de mayor Pm. Asimismo encuentran que este factor reacciona competitivamente con anticuerpos antidigitales, postulando su posible similitud estructural con ellos (52, 147). Recientemente Licht y col. (273) han llevado a cabo un trabajo de purificación y caracterización de este factor aislándolo de la orina de perros que presentan un fenómeno de "escape" a la retención de sodio inducida por mineralocorticoides (108, 185), mediante un fraccionamiento previo en Sephadex G 25 y posterior fraccionamiento mediante cromatografía líquida de alta presión, y han llegado a aislar una fracción

de gran actividad antinatriúrica y de bajo Pm.

En una comparación entre la incidencia de ensayos de actividad natriúrica positivos, que producen los distintos extractos F IV (fig. D.4.c.1.) vemos que el mayor porcentaje lo presentan los extractos aislados a partir del plasma arterial y de la orina post-infusión portal, así como los preparados a tir de la orina de los perros con fenómeno de "escape", siendo algo menor el % de los que provienen de la sangre suprahepática post-infusión portal. Estos resultados demuestran tanto la presencia circulante de esta hormona natriúrica en consonancia con lo descrito por Knock y col. (184) como su excretabilidad renal.

Entre los distintos órganos que se han propuesto como posibles lugares de origen de la hormona natriúrica se encuentra también el hígado. En este sentido, Daly y col. (75), Strandhoy y col. (325) y otros autores, sugieren que el mecanismo humoral que media la mayor excreción de sodio después de una infusión intraportal de ClNa hipertónico, puede incluir la participación de una sustancia de origen hepático. Este planteamiento enlaza con el hecho de que en la disfunción hepática, como la cirrosis con presencia de edema, los fenómenos de retención de sodio pueden ser originados precisamente con la falta de una sustancia humoral natriúrica, que debido al mal funcionamiento del hígado, no se sintetice y/o no se libere y, por tanto, se produciría así la retención de sodio (101). Dentro de la línea de investigación de los mecanismos que provocan la retención de agua y de sal en la cirrosis, Denison y col. (80), Wilkinson y col. (357), Kramer y col. (191), Naccarato y col. (247) y Favre y col. (107), han encontrado que la denominada hormona natriúrica de bajo Pm y aislable mediante cromatografía en Sephadex G 25, no está presente ni en la orina, ni en plasma de pacientes cirróticos con presencia de edemas, aún después de una expansión de VEC.

En nuestras investigaciones, observamos que el plasma suprahepático después de la infusión de ClNa hipertónico en la VP, induce natriuresis al infundirlo directamente en el riñón de un perro. Además la caracterización de esa actividad natriúrica indica que se debe a la presencia de un factor humoral en ese plasma, de bajo Pm, preparado mediante cromatografía en Sephadex G 25. Sin embargo, no se ha podido comprobar mayor actividad natriúrica en el plasma suprahepático post-infusión portal, comparativamente con la que observamos en plasma arterial sistémico, en ese mismo momento, aunque la estimulación del área porto-hepática mediante aumentos en la concentración de Cl y Na parece ser el factor desencadenante de la liberación de esta hormona natriúrica. Luego el origen hepático de la misma no puede deducirse de estas experiencias y probablemente un estudio en muestras de sangre (arteriales y suprahepáticas) más próximas al estímulo portal, podría aportar datos esclarecedores al respecto.

F. CONCLUSIONES.

1. De nuestros resultados podemos concluir que el hígado es capaz de detectar cambios en la concentración de ClNa de la sangre que le llega por la VP, y que además modifica mediante algún tipo de mecanismo, la respuesta renal habitual a la infusión i.v. sistémica de una solución de ClNa hipertónico. Las respuestas renales concomitantes con la natriuresis específica a la infusión portal, no permiten explicar plenamente el mecanismo intrarrenal que media esta última. Sin embargo, podemos decir que el aumento observado en la FG contribuye, al menos en parte, a la respuesta natriurética post-infusión portal, aunque no podemos determinar la causa del aumento en la FG.
2. El hígado y/o los receptores situados en el territorio vascular porta-hepático parecen detectar específicamente los cambios en la concentración de iones cloruro de la sangre portal, inducidos experimentalmente mediante la administración portal de ClHArg 855 mM, respondiendo de forma específica con aumentos en la excreción renal de sodio.
3. De las experiencias de administración intraportal de una solución hipertónica de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ 430 mM, no podemos aclarar si el territorio vascular portal posee o no capacidad para detectar específicamente cambios en la concentración de sodio de la sangre que le llega. Estos hechos hacen necesaria una reinvestigación de este punto utilizando otro tipo de soluciones.
4. La respuesta natriurética específica a la infusión intraportal hiperosmolar de ClNa y de ClHArg no parece deberse a cambios en la osmolaridad de la sangre de la VP, sino a la estimulación de las áreas sensibles del territorio vascular porta-hepático, mediante cambios en la concentración de electrolitos (Cl y Na).
5. Teniendo en cuenta los datos existentes, en la literatura y los obtenidos en nuestras experiencias, el hígado parece tener capacidad para detectar de forma independiente cambios en la osmolaridad y en la concentración de electrolitos (Cl y Na), modulando respuestas renales diferentes. Los cambios en la concentración de electrolitos implicarían básicamente modificaciones en la excreción de sodio mientras que los cambios en la osmolaridad actuarían sobre la excreción renal de agua.
6. La infusión de ClNa hipertónico en la VP parece causar un aumento de la concentración de una sustancia natriurética en el plasma que sale del hígado, de tal modo que al infundir este plasma en la arteria renal de un perro produce aumentos significativos en la excreción de sodio de ese riñón. Los resultados de estas investigaciones están en consonancia con la hipótesis planteada, acerca de la mediación de un mecanismo humoral, de posible origen hepático, en la respuesta natriurética específica a la infusión intraportal de salino hipertónico.
7. En el plasma (arterial sistémico y suprahepático) y en la orina, de perros que han recibido una infusión intraportal de ClNa hiperosmolar, hay presente una actividad natriurética, que se localiza en la F IV, que corresponde a la fracción que se obtiene después del pico de las sales principales, durante el fraccionamiento de estas muestras en Sephadex G 25 fino. Esta actividad natriurética no se encuentra en las muestras recogidas antes de realizar la infusión portal.
8. Asimismo podemos decir que hay una relación directa entre la respuesta natriurética específica a la infusión de salino en la VP y la presencia de actividad natriurética en la orina y en el plasma arterial y suprahepático recogido después de esa infusión.
9. De nuestros resultados se puede deducir que la actividad natriurética presente en las

muestras recogidas post-infusión intraportal, se debe posiblemente a un factor natriurético, de bajo P_m y de características muy similares al descrito por otros autores en situaciones de aumento del VEC, y que es la denominada hormona natriurética. También estos resultados muestran evidencia de su presencia a nivel circulante así como de que es excretable en la orina.

10. No hemos podido comprobar el origen hepático de ese factor natriurético, al no haber encontrado mayor actividad natriurética en el plasma suprahepático, que en el plasma arterial sistémico, recogidos ambos después de la infusión intraportal de ClNa hipertónico.

G. BIBLIOGRAFIA.

1. Aars H. Osmoreceptors in the liver. *Nord. Med.* 83, 174, 1970.
2. Adachi A., Nijima A., Jacobs HL. An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. *Am. J. Physiol.* 231, 1043, 1976.
3. Addis T. Ratio between the urea content of the urine and of the blood after the administration of large quantities of urea. *J. Urol.* 1, 263, 1917.
4. Aizman RI., Finkinshtein YD. On the liver osmo- and ionic receptors. *Fiziol. Zh. SSSR.* 62, 218, 1976.
5. Alagband-Zadeh J., Fenton S., Mac Gregor GA., Markandu ND., Roulston JE., De Wardener HE. An increased ability of plasma from patients with essential hypertension to stimulate renal glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in vitro. *J. Physiol.* (Abstract in press), 1981.
6. Alagband-Zadeh J., Clarkson EM., Fenton S., Mac Gregor GA., De Wardener HE. The effect of sodium intake on the ability of human plasma to stimulate renal glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity in vitro. *J. Physiol.* (Abstract in press), 1981.
7. Altman PL., Dittmer DS. (eds.). *Blood and other body fluids.* Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Washington, D.C. 1961.
8. Andersson B. Thirst and Brain control of water balance. *Am. Sci.* 59, 408, 1971.
9. Anderson B. Regulation of body fluids. *Ann. Rev. Physiol.* 39, 185, 1977.
10. Andersson B., Mc Cann SM. A further study of the polydipsia evoked by hypothalamic stimulation in the goat. *Acta Physiol. Scand.* 33, 333, 1955.
11. Andersson B., Olsson K. On central control of body fluid homeostasis. *Cond. Reflex.* 8, 147, 1973.
12. Andersson RJ., Berl T., Mc Donald KM., Schrier RW. Prostaglandins: Effects on blood pressure, renal blood flow, sodium and water excretion. *Kidney Int.* 10, 205, 1976.
13. Andreoli TE., Berliner RW., Kokko J.P., Marsh DJ. Questions and replies: Renal mechanisms for urinary concentrating and diluting processes. *Am. J. Physiol.* 235, F1, 1978.
14. Andrews P. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Methods of Biochemical Analysis*, vol 18, Ed.: Glick D. Interscience Publishers, New York, London 1970. pp. 1.
15. Andrews P., Orbach J. A search for nerves which are sensitive to changes of oncotic pressure and changes in concentration of sodium and glucose. *Digestion.* 8, 453, 1973.
16. Andrews WHH., Orbach J. Sodium receptors activating some nerves of perfused rabbit livers. *Am. J. Physiol.* 227, 1273, 1974.
17. August J.T., Nelson DH., Thorn GW. Response of normal subjects to large amounts of aldosterone. *J. Clin. Invest.* 37, 1549, 1958.
18. Aukland K. Autoregulation of interstitial fluid volume. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31, 247, 1973.
19. Aziz O., Nowacki PE., Haberich FJ. Abstufbarkeit der hepatogenen Diurese durch natriumfreie losungen. *Pfluegers Arch.* 289, R 87, 1966.
20. Bahlmann J., Mc Donald SJ., Ventom MG., De Wardener HE. The effect on urinary sodium excretion of blood volume expansion without changing the composition of the blood in the dog. *Clin. Sci.* 32, 403, 1967.
21. Baker JT., Cain CP. Extraction fraction at any urine flow and extraction percentage. *Experientia.* 33, 752, 1977.
22. Baldus WP., Feichter RN., Summerskill WHJ., Hunt JC., Wakin KG. The kidney in cirrhosis II. Disorders of renal function. *Ann. Int. Med.* 60, 366, 1964.
23. Barajas L. Innervation of the renal cortex. *Fed. Proc.* 37, 1192, 1978.
24. Bates RG. *Determination of pH: Theory and Practice.* John Wiley and Sons, New York, 1964.
25. Beeuwkes III R., Ichikawa I., Brenner BM. The renal circulations. Cap. 5. In "The Kidney". Brenner BM. and Rector FC (eds). W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1981, pp: 249.
26. Bennett WM., Hennes D., Elliot D., Porter GA. In search of a hepatic osmoreceptor in man. *Am. J. Dig. Dis.* 19, 143, 1974.
27. Bern HA. Hormones and endocrine glands of fishes. *Science.* 158, 455, 1967.
28. Bernard C. *Leçons sur les propriétés physiologiques des liquides de l'organisme.* Bailliere, Paris, 1859.
29. Bianchi G., Fox U., Imbasciati E. The development of a new strain of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 14, 339, 1974.
30. Bie P. Studies of cerebral osmoreceptors in anesthetized dogs: The effect of intravenous and intracarotid infusion of hyperosmolar sodium chloride solutions during sustained water diuresis. *Acta Physiol. Scand.* 96, 306, 1976.
31. Blake WD., Lin KK. Hepatic portal vein infusion of glucose and sodium solutions on the control of saline drinking in the rat. *J. Physiol. London.* 274, 129, 1978.

32. Blake WD., Ulfendahl HR. Hepatic portal vein infusion of glucose on sodium excretion in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 105, 304, 1979.
33. Blasingham MC., Nasjetti A. Contribution of renal prostaglandins to the natriuretic action of bradykinin in the dog. *Am. J. Physiol.* 237, F182, 1979.
34. Blass EM., Epstein AN. A lateral preoptic osmosensitive zone for thirst in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 70, 200, 1970.
35. Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: A reassessment of a hypothesis. *Am. J. Physiol.* 232, C165, 1977.
36. Bourgoignie JJ., Hwang KH., Espinel C., Klahr S., Bricker NS. A natriuretic factor in the serum of patients with chronic uremia. *J. Clin. Invest.* 51, 1514, 1972.
37. Bourgoignie JJ., Hwang KH., Ipakchi E., Bricker NS. The presence of a natriuretic factor in urine of patients with chronic uremia. (The absence of the factor in nephrotic uremic patients.) *J. Clin. Invest.* 53, 1559, 1974.
38. Bourgoignie JJ., Klahr S., Bricker NS. Inhibition of transepithelial sodium transport in the Frog skin by a low molecular weight fraction of uremic serum. *J. Clin. Invest.* 50, 303, 1971.
39. Bray GA. A simple efficient liquid Scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Annal. Biochem.* 1, 279, 1960.
40. Brenner BM., Falchuk KH., Keimowitz RI., Berliner RW. The relationship between peritubular capillary protein concentration and fluid reabsorption by the renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 48, 1519, 1969.
41. Brenner BM., Galla JM. Influence of post-glomerular hematocrit and protein concentration on rat nephron fluid transfer. *Am. J. Physiol.* 220, 148, 1971.
42. Brenner BM., Ichikawa I., Deen WM. *Glomerular Filtration. The Kidney*, Brenner BM., and Rector FC. (eds.). Saunders WC, Co., Philadelphia, 1981, pp. 289.
43. Brenner BM., Troy JL. Postglomerular vascular protein concentration: Evidence for a causal role in governing fluid reabsorption and glomerulotubular balance by the renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 50, 336, 1971.
44. Brenner BM., Troy JL., Daugharty TM. On the mechanism of inhibition in fluid reabsorption by the proximal tubule of the volume-expanded rat. *J. Clin. Invest.* 50, 1596, 1971.
45. Brenner BM., Troy JL., Daugharty TM., Mac Innes RM. Quantitative importance of changes in post-glomerular colloid osmotic pressure in mediating glomerulotubular balance in the rat. *J. Clin. Invest.* 52, 190, 1973.
46. Bricker NS. Extracellular fluid volume regulation: On the evidence for a biologic control system. In "The Kidney in liver disease". M. Epstein (eds.). Elsevier. North-Holland, Inc., 1979, pp. 19.
47. Bricker NS., Klahr S., Purkerson M., Schultze RG., Avioli LV. Birge SJ. In vitro assay for a humoral substance present during volume expansion and uraemia. *Nature (London)*. 219, 1058, 1968.
48. Bricker NS., Licht A. Natriuretic hormone: Biologic effects and progress in identification and isolation. *Proc. Symp. Horm. Reg. Sodium Excretion*. ed: Lichardus B, Schrier RN, Ponec J., Amsterdam, Elsevier/North Holland. 1980, p. 399.
49. Brown DC., Dubois M., Knock CA., Clarkson EM., De Wardener HE. Absence of antinatriuretic activity in plasma ultrafiltrates (Mol wt less than 50,000) and dialysates from volume-expanded dogs. *Kidney Int.* 6, 388, 1974.
50. Brozek J. Interaction of human and animal research on body composition. In *Body composition in Animals and Man*. National Acad. of Sci. Washington, DC., 1968.
51. Bruton TL. *A textbook of Pharmacology, Therapeutics and Materia Medica*. Lea Brothers and Co. Philadelphia, 1885, pp. 503.
52. Buckalew VM., Jr., Gruber KA. Natriuretic hormone. In: *The kidney in liver disease*. Epstein M., Ed. New York. Elsevier/North Holland. 2nd ed., 1981 (in press).
53. Buckalew VM., Lancaster CD Jr. Studies of a humoral sodium transport inhibitory activity in normal dogs and dogs with ligation of the inferior vena cava. *Circ. Res.*, 28, suppl. II. 44, 1971.
54. Buckalew VM., Jr., Lancaster CD Jr. The association of a humoral sodium transport inhibitory activity with renal escape from chronic mineralocorticoid administration in the dog. *Clin. Sci.* 42, 69, 1972.
55. Buckalew VM., Martinez FJ., Green WE. The effect of dialysates and ultrafiltrates of plasma of saline-loaded dogs on Toad Bladder sodium transport. *J. Clin. Invest.* 49, 926, 1970.
56. Buckalew VM., Jr., Nelson DB. Natriuretic and sodium transport inhibitory activity in plasma of volume-expanded dogs. *Kidney Int.* 5, 12, 1974.
57. Buggy J., Fisher AE. Evidence for a dual central role for angiotensin in water and sodium intake. *Nature*, 250, 14, 1974.
58. Burg MB. Renal handling of sodium, chloride, water, aminoacids, and glucose, in "The Kidney". Brenner BM., and Rector FC., (eds.). W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1981, pp. 328.
59. Burg M., Orloff J. Perfusion of isolated renal tubules. In "Handbook of Physiology". Section 8: Renal Physiology. Orloff J., and Berliner RW (eds.). Am. Physiol. Society Washington DC. 1973, pp. 145.

60. Cambier P., Godon JP. Action du facteur natriurétique sur le rein de rat isolé et perfusé persistance de cet effect lors de l'inhibition de la synthèse des prostaglandins. *J. D'Urologie et de Néphrologie*. 85, 297, 1979.
61. Carey RM. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man: lack of dependence upon aldosterone. *Circ. Res.* 43, 19, 1978.
62. Carey RM., Smith JR., Ortt EM. Gastrointestinal control of sodium-depleted conscious rabbits. *Am. J. Physiol.* 230, 1504, 1976.
63. Chester Jones I., Henderson IW., Wales NAM., Garland HO. Effect of arginine vasotocin in fish and amphibia. In: Neurohypophysial Hormones, Ciba Foundation Study Group N^o 39, Wolstenholme GEN y Birch J. (eds.) Churchill Livingstone, Edimburg, 1971, pp. 29.
64. Chwalbinska-Moneta J. Role of hepatic portal osmoreception in the control of ADH release. *Am. J. Physiol.* 236, E 603, 1979.
65. Clarkson EM. Further observations on the natriuretic substances occurring in the urine of normal humans. In: Natriuretic Hormone. Kramer HJ., Krück F. (eds.) Springer-Verlag, 1975. Berlin/Heidelberg/New York, pp. 35.
66. Clarkson EM., Raw SM., De Wardener HE. Further observations on low-molecular-weight natriuretic substance in the urine of normal man. *Kidney Int.* 16, 710, 1979.
67. Clarkson EM., Sheelagh M., Raw SM., De Wardener HE. Two natriuretic substances in extracts of urine from normal man when salt-depleted and salt-loaded. *Kidney Int.* 10, 381, 1976.
68. Cogan MG., Rector FC., Seldin DW. Acid-Base disorders. In "The Kidney". Brenner BM., and Rector FC. (eds.) WB. Saunders Co. Philadelphia, 1981, p. 841.
69. Cort JH. The source and chemical nature of the natriuretic activity of plasma evoked by saluretic "volume reflexes". *Can J. Physiol. Pharmacol.* 46, 325, 1968.
70. Cort JH., Lichardus B. The nature of the renal response to the carotid sinus pressor reflex. In: Hormones and the Kidney. Ed. Williams PC., Academic Press, London/NY/1963. p. 25.
71. Cort JH., Lichardus B. Natriuretic hormone. *Nephron*, 5, 401, 1968.
72. Cotonat J. Confirmation par anastomose limph-veineuse de l'activité diurétique de la lymphe chez le chien. *Comptes Rendus des Sciences de la Société de la Biologie et de les Filiales*. 168, 615, 1974.
73. Dahl LK., Knudsen KD., Iwai J. Humoral transmission of hypertension: Evidence from parabiosis. *Circ. Res.* 1 (suppl. 24, 25): 21, 1969.
74. Dahms H., Rock R., Seligson D. Ionic activities of sodium potassium and chloride in human serum. *Clin. Chem.* 14, 859, 1968.
75. Daly JJ., Roe JW., Horrocks P. A comparison of sodium excretion following the infusion of saline into systemic and portal veins in the dog: Evidence for a hepatic role in the control of sodium excretion. *Clin. Sci.* 33, 481, 1967.
76. Dantzer WH. Effects of K, Na, and ouabain on urate PAH uptake by snake and chicken kidney slices. *Am. J. Physiol.* 217, 1510, 1969.
77. Davidson WD., Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J. Lab. Clin. Med.* 62, 351, 1963.
78. Davies JO., Freeman RH. Mechanisms regulating renin release. *Physiol. Rev.* 56, 1, 1976.
79. Deen WM., Maddox DA., Robertson CR., Brenner BM. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat: VII. Response for reduced renal mass. *Am. J. Physiol.* 227, 556, 1974.
80. Denison EK., Lieberman FL., Reynolds TB. 9 α -Fluorohydrocortisone induced ascites in alcoholic liver Disease. *Gastroenterology*. 61, 497, 1971.
81. Dennhardt R., Ohm WW., Haberich FJ. Die Ausschaltung der leberäste des N. vagus an der wahem ratte und ihr einfluss auf die hepatogene diurese-inirekter beweis für die afferente heitung der leber-osmoreceptoren uber de N. vagus. *Pflügers Arch.* 328, 51, 1971.
82. De Wardener HE. Natriuretic Hormone *Clin. Sci. Mol. Med.* 53, 1, 1977.
83. De Wardener HE. The control of sodium excretion. *Am. J. Physiol.* 235, F 163, 1978.
84. De Wardener HE. The natriuretic hormone. *Proc. 8th. Int. Congr. Nephrol. Athens*, 1981, pp. 47.
85. De Wardener HE., Clarkson EM., Bittensky L., Mac Gregor GA., Alaghband-Zadeh J., Chayen J. Effect of sodium intake on ability of human plasma to inhibit renal Na⁺-K⁺-adenosine triphosphatase in vitro. *The Lancet*, i, 411, 1981.
86. De Wardener HE., Mac Gregor GA. Dahl's hypothesis that a saluretic substance may be responsible for a sustained rise in arterial pressure: Its possible role in essential hypertension. *Kidney Int.* 18, 1, 1980.
87. De Wardener HE., Mills IH., Clapham WF., Hayter CJ. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dogs. *Clin. Sci.*, 21, 249, 1961.
88. Dibona GF. Neural control of renal tubular sodium reabsorption in the dog. *Fed. Proc.* 37, 1214, 1978.
89. Diem K., Lentner C. *Tablas Cientificas Documenta-Geigy*. Ed. Geigy Division Farmacéutica. Barcelona, 1975, p. 32.

90. Diezi J., Michoud P., Aceves J., Giebisch G. Micropuncture study of electrolyte transport across papillary collecting duct of the rat. *Am. J. Physiol.* 224, 623, 1973.
91. Dorn JB., Levine N., Kaley G., Rothballer AB. Natriuresis induced by injection of hypertonic saline into the third cerebral ventricle of dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 240, 1969.
92. Dunn FL., Brennan TJ., Nelson AE., Robertson GL. The role of blood osmolality and volume regulating vasopressin secretion in the rat. *J. Clin. Invest.* 52, 3212, 1973.
93. Dunn MJ., Hood VL. Prostaglandins and the kidney. *Am. J. Physiol.* 233, 233, 1977.
94. Earley LE. Sodium metabolism. In Maxwell MH., and Kleeman CR. (eds.): *Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism*. Mc Graw-Hill Book Co. New York, 1972, p. 95.
95. Edelman IS., Leibman J. Anatomy of body water and electrolytes. *Am. J. Med.* 27, 256, 1959.
96. Epstein FH. Renal excretion of sodium and the concept of a volume receptor. *Yale. J. Biol. Med.* 29, 282, 1956.
97. Epstein FH., Post RS., Mc. Dowell M. Effect of an arteriovenous fistula on renal hemodynamics and electrolyte excretion. *J. Clin. Invest.* 32, 233, 1953.
98. Epstein M. Renal effects of head-out water immersion in man: implications for an understanding of volume Homeostasis. *Physiol. rev.*, 58, 529, 1978.
99. Epstein M. Renal sodium handling in cirrhosis. In: "The Kidney in Liver disease". Ed. by M. Epstein, Elsevier/North-Holland. New York, Inc. 1979, pp. 35.
100. Epstein M. Renal sodium handling in cirrhosis: a reappraisal. *Nephron.* 23, 211, 1979.
101. Epstein M. Natriuretic hormone and the sodium retention of cirrhosis. *Gastroenterology.* 81, 395, 1981.
102. Epstein M., Bricker NS., Bourgoignie JJ. Presence of a natriuretic factor in urine of normal men undergoing water immersion. *Kidney. Int.* 13, 152, 1978.
103. Epstein M., Levinson R., Loutzenhiser R. Effects of water immersion on renal hemodynamics in normal man. *J. Appl. Physiol.* 41, 230, 1976.
104. Epstein M., Pins DS., Schneider N., Levinson R. Determinants of deranged sodium and water homeostasis in decompensated cirrhosis. *J. Lab. Clin. Med.* 87, 822, 1976.
105. Favre H. An inhibitor of sodium transport in the urine of dogs and humans with normal renal function. A study of chronically expanded subjects. In: "Natriuretic hormone". Ed.: Kramer HJ., Krück F. Springer-Verlag. Berlin, 1978, pp. 17.
106. Favre H. Sequential measurements of natriuretic activities in the urine of man on high salt diet before and on 9- α -fluorocortisone. *Proc. 7th. Int. Congr. Nephrol. Montreal. Canada, U-12, 1978.*
107. Favre H., Gourjon M. Lack of the natriuretic factor in experimental nephrotic syndrome in the rats. *Proc. Int. Congr. Nephrol. Athens, 1981. Abstr.*, p. 158.
108. Favre H., Hwang KH., Schmidt RW., Bricker NS., Bourgoignie JJ. An inhibitor of sodium transport in the urine of dogs with normal renal function. *J. Clin. Invest.* 56, 1302, 1975.
109. Fine LG., Bourgoignie JJ., Hwang KH., Bricker NS. On the influence of the natriuretic factor from patients with chronic uremia on the bioelectric properties and sodium transport of isolated mammalian collecting tubule. *J. Clin. Invest.* 58, 590, 1976.
110. Fine LG., Trizna W. Influence of prostaglandins on sodium transport of isolated medullary nephron segments. *Am. J. Physiol.* 232, F 383, 1977.
111. Finkstein YD., Kogan AS., Terner AY., Aizman RI. On the localization of osmoreceptors in the liver. *Physiol. J. (USSR)* 58, 722, 1972.
112. Fishman MC. Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 76, 4661, 1979.
113. Fitzsimons JT. Thirst. *Physiol. Rev.* 52, 468, 1972.
114. Fitzsimons JT. The physiological basis of thirst. *Kidney Int.* 10, 3, 1976.
115. Flier J.S., Maratos-Flier E., Pallota J.A., Mc Isaac D. Endogenous digitalis-like activity in the plasma of the toad *Bufo marinus*. *Nature*, 279, 341, 1979.
116. Frömter D., Gebner K. Active transport potential and streaming potentials across rat kidney proximal tubule. *Pflügers Arch.* 351, 85, 1974.
117. Fuenzalida R., del Castillo, E., Uranga J. Effect of glomerulopressin and mannitol in acute renal failure in rats. *Horm. Metab. Res.* 12, 212, 1980.
118. Ganong WF., Rudolph CD., Zimmerman H. Neuroendocrine components in the regulation of blood pressure and renin secretion. *Hypertension.* 1, 207, 1979.
119. Gauer OH. Changes of water and mineral excretion due to baroreceptor activity of the circulation. In: *Proc. Int. Congr. Nephrol. Prague. Amsterdam: Excerpta Med. Intern. Congr. Ser.* 78, 1964, pp. 139.
120. Gauer OH. Osmocontrol versus volumen control. *Fed. Proc.* 27, 1132, 1968.
121. Gauer OH. Mechanoreceptors in the intrathoracic circulation and plasma volume control. In "The Kidney

- in liver disease". Elsevier/North-Holland. New York. 1978, pp.3.
122. Gauer OH., Henry JP. Neurohormonal control of plasma volume. In "Cardiovascular Physiology. 11, Int. Rev. of Physiol. vol. 9, Univ. Park Press, Gyton AC., Cowley AW, (eds.) Baltimore 1976, pp. 145.
 123. Gauer OH., Henry JP., Behn C. The regulation of extracellular fluid volume. *Ann. Rev. Physiol.* 32, 547, 1970.
 124. Gerber JG., Branch RA., Nies AS., Gerkens JF., Shand DG., Hollifield J., Oates JA. Prostaglandins and renin release. II: Assessment of renin secretion following infusion of PGI₂, E₂, and D₂ into the renal artery of anesthetized dogs. *Prostaglandins*. 15, 81, 1978.
 125. Gerber JG., Branch RA., Nies AS., Hollifield JW., Gerkens JF. Influence of hypertonic saline on canine renal blood flow and renin release. *Am. J. Physiol.* 237, F 441, 1979.
 126. Gerber JG., Keller RT., Nies AS. Prostaglandins and renin release: The effect of PGI₂, PGE₂, and 13,14-dihydro PGE₂ on the baroreceptor mechanism of renin release in the dog. *Circ. Res.* 44, 796, 1979.
 127. Giebisch G., Klose M., Windhager EE. Micropuncture study of hypertonic sodium chloride loading in the rat. *Am. J. Physiol.* 206, 687, 1964.
 128. Giebisch G., Windhager E. Electrolyte transport across renal tubular membranes. In Orloff J., and Berliner RW. (eds.): *Handbook of Physiology, section 8: Renal Physiology*, American Physiological Society, 1973, pp. 315.
 129. Gilmore JP. Pentobarbital sodium anesthesia in the dog. *Am. J. Physiol.* 209, 404, 1965.
 130. Gilmore JP., Daggett WH. Response of the chronic cardiac denervated dog to acute volume expansion. *Am. J. Physiol.* 210, 509, 1966.
 131. Girardin E., Caverzasio J., Iwai J., Banjour JP., Muller AF., Grandchamp A. Pressure natriuresis in isolated kidneys from hypertension-prone and hypertension-resistant rats. (Dahl rats). *Kidney Int.* 18, 10, 1980.
 132. Gitelman HJ., Blythe WB. Isolation of a natriuretic factor from the posterior pituitary. *Abstr. Vth Int. Congr. Nephrol.* 1972, p. 91.
 133. Glasby MA., Ramsay DJ. Hepatic osmoreceptor? *J. Physiol.* 243, 765, 1974.
 134. Glaubach S., Molitor H. Untersuchungen über die hormonale diuresisregulierende Tätigkeit der Leber. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 131, 31, 1928.
 135. Godon JP. Sodium and water retention in experimental GN: The urinary natriuretic material. *Nephron*, 14, 382, 1975.
 136. Godon JP., Cambier P. Physical stimuli of renal natriuretic hormone production. *Proc. Int. Congr. Nephrol. Athens, 1981*, p. 157. (abst.).
 137. Goldblatt HJ., Lynch J., Hanzal RF., Summerville WW. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59, 347, 1934.
 138. Gonick HC., Kramer HJ., Paul W., Lu E. Circulating inhibitor of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase after expansion of extracellular fluid volume in rats. *Clin. Sci. Mol. Med.* 53, 329, 1977.
 139. Gonick HC., Saldanha LF. A natriuretic principle derived from kidney tissue of volume-expanded rat. *J. Clin. Invest.* 56, 247, 1975.
 140. Goodyer AUN., Relman AS., Lawrason FD., Epstein FM. Salt retention in cirrhosis at the liver. *J. Clin. Invest.* 29, 973, 1950.
 141. Gordon D., Peart WS. Sodium excretion in man and adaptation to a low-sodium diet: effect of intravenous sodium chloride. *Clin. Sci.* 57, 225, 1979.
 142. Gottschalk CW. Renal nerves and sodium excretion. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 229, 1979.
 143. Grantham J., Burg M., Orloff J. The nature of transtubular Na and K transport in isolated rabbit renal collecting tubules. *J. Clin. Invest.* 49, 1815, 1970.
 144. Green R., Giebisch G. Ionic requirements of proximal tubular sodium transport. I. Bicarbonate and chloride. *Am. J. Physiol.* 229, 1205, 1975.
 145. Gréhant N. Physiologie des reins par le dosage de l'urée dans le sang et dans l'urine. *J. Physiol. Pathol. Gen.* 6, 1, 1904.
 146. Gruber KA., Buckalew VM Jr. Further characterization and evidence for a precursor in the formation of plasma antinatriuretic factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159, 463, 1978.
 147. Gruber KA., Whitaker JM., Buckalew VM Jr. Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs. *Nature*, 287, 743, 1980.
 148. Guyton AC., Taylor AE., Brace RA. A synthesis of interstitial fluid regulation and lymph formation. *Fed. Proc.* 35, 1881, 1976.
 149. Haber E. (principal discussant). The renin-angiotensin system and hypertension. *Kidney Int.* 15, 427, 1979.
 150. Haberich FJ. Osmoreception in the portal circulation. *Fed. Proc.* 27, 1137, 1968.
 151. Haberich FJ., Aziz O., Nowacki PE. Über einen osmoreceptorisch tätigen Mechanismus in der Leber. *Arch. Ges. Physiol.* 285, 73, 1965.
 152. Haberich FJ., Aziz O., Nowacki PE., Ohm W. Zur Spezifität der Osmorezeptoren in der Leber. *Pflügers Arch.* 313, 289, 1969.

153. Haddy FJ., Overbeck HW. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. *Life Sci.* 19, 935, 1976.
154. Haljamäe H., Linde A., Amundson B. Comparative analyses of capsular fluid and interstitial fluid. *Am. J. Physiol.* 227, 1199, 1974.
155. Hanson RC., McLane-Vega LA., Childers JW., Gleason SD., Schneider EG. Lack of evidence for gastrointestinal control of sodium excretion in unanesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* 238, F 112, 1980.
156. Harris PJ., Young JA. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflügers. Arch.* 367, 295, 1977.
157. Hauptert GT., Sancho JM. Sodium transport inhibitor from bovine hypothalamus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76, 4658, 1979.
158. Hays RM., Levine SD. Pathophysiology of water metabolism. In "The Kidney". Brenner BM., Rector FC. (eds.) WB. Saunders Co., 1976. pp. 553.
159. Hendry EB. Osmolality of human serum and of chemical solutions of biologic importance. *Clin. Chem.* 7, 156, 1961.
160. Henrich W. Role of Prostaglandins in renin secretion. *Kidney Int. suppl.* 19, 822, 1981.
161. Henry JP., Gupta PD., Meehan JP., Sinclair R., Share L. The role of afferents from the low-pressure system in the release of antidiuretic hormone during nonhypotensive hemorrhage. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 46, 287, 1967.
162. Henry JP., Pearce JW. The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. *J. Physiol.* 131, 572, 1956.
163. Henry RJ., Cannon DC., Winkelman JW. *Clinical Chemistry: Principles and techniques.* 2nd ed. Harper and Row (eds). Hagerstown, Maryland, 1974.
164. Holman E. Contributions to cardiovascular physiology gleaned from clinical and experimental observations of abnormal arteriovenous communications. *J. Cardiovasc. Surg.* 3, 48, 1962.
165. Horton AR., Misono K., Hollifield J., Frölich JC., Inagami T., Oates JA. Prostaglandins and renin release I: Stimulation of renin release from rabbit renal cortical slices by PGI₂. *Prostaglandins* 14, 1095, 1977.
166. Imai M., Kokko J. Sodium, urea, and water transport in the thin ascending limb of Henle. Generation of osmotic gradients by passive diffusion of solutes. *J. Clin. Invest.* 53, 393, 1974.
167. Inchina VI., Finkinshtein T. Osmoreceptors and baroreceptors of the pancreas. *Fiziol. Zh. SSSR.* 50, 301, 1964.
168. Johnson JA., Moore WW., Segar WE. Small changes in left atrial pressure and plasma antidiuretic hormone titers in dogs. *Am. J. Physiol.* 217, 210, 1969.
169. Johnson MD., Malvin RL. Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 232, F 298, 1977.
170. Jamison R., Lacy F. Evidence for urinary dilution by the collecting tubule. *Am. J. Physiol.* 223, 898, 1972.
171. Janson JC. Adsorption phenomena on Sephadex. *J. Chromatogr.* 28, 12, 1967.
172. Jones R.A., McDonald GO., Last JM. Reversal of diurnal variation in renal function in case of cirrhosis with ascites. *J. Clin. Invest.* 31, 326, 1952.
173. Kaczmarczyk G., Eicht M., Mohnhaupt R., Sihgen B., Reinhardt HW. Postprandial volume regulation and renin-angiotensin system in conscious dogs. *Adv. Physiol. Sci.* vol. 11. *Kidney and Body Fluids.* L. Takács (ed.). Pergamon Press, Akadémiai Kiado, Budapest, Hungary, 1980, pp. 611.
174. Kady NN., Nashat FS., Tappin JW., Wilcox CS. Glomerulotubular balance in the whole kidney of the anesthetized dog during infusion of hypertonic saline. *J. Physiol.* 242, 114, 1974.
175. Kaloyanides GJ., Azer M. Evidence of humoral mechanism in volumen expansion natriuresis. *J. Clin. Invest.* 50, 1603, 1971.
176. Kaloyanides GJ., Balabanian MB., Bowman RL. Evidence that the brain participates in the humoral natriuretic mechanism of blood volume expansion in the dog. *J. Clin. Invest.* 62, 1288, 1978.
177. Kaloyanides GJ., Cohen L., Dibona GF. Failure of selected endocrine organ ablation to modify the natriuresis of blood volume expansion in the dog. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 351, 1977.
178. Kaloyanides GJ., Dibona GF., Bastron RD. Effect of blood volume expansion on tubule sodium transport in the isolated dog kidney. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 765, 1975.
179. Kapteina FW., Motz W., Schwartz-Portche D., Gauer OH. Comparison of renal responses to 5% saline infusions into vena portae and vena cava in conscious dogs. *Pflügers Arch.* 374, 23, 1978.
180. Kass DA., Sulzman FM., Fuller CA., Moore-Ede MC. Renal responses to central vascular expansion are suppressed at night in conscious primates. *Am. J. Physiol.* 239, F 343, 1980.
181. Khuri RN., Wiederholt M., Strieder N., Giebisch G. Effects of graded solute diuresis on renal tubular sodium transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 228, 1262, 1975.
182. Kill J., Andersen D. Evidence of a gastro-hepatic osmoregulation in humans and the influence of vagotomy on its activity. *Scand. J. Gastroent.* 7, 575, 1972.
183. Knock CA.. Further evidence "in vivo" for a circulating natriuretic substance after expanding the blood volume

- in rats. *Clin. Sci.* 59, 423, 1980.
184. Knock CA., De Wardener HE. Evidence "in vivo" for a circulating natriuretic substance in rats after expanding the blood volume. *Clin. Sci.* 59, 411, 1980.
 185. Knox FG., Burnett JC. Jr., Kohan DE., Spielman WS., Strand JC. Escape from the sodium-retaining effects of mineralocorticoids. *Kidney Int.* 17, 263, 1980.
 186. Kokko J. Sodium chloride and water transport in the descending limb of Henle. *J. Clin. Invest.* 49, 1838, 1970.
 187. Kolin A. Blood flow determination by electromagnetic method. In Glaser, O. (ed.): *Medical Physics*, vol. 3. Year Book Medical Publishers., Chicago, 1960, pp. 141.
 188. Koushanpour, E. *Renal Physiology. Principles and Functions.* W.B. Saunders, Co., Philadelphia. 1976, pp. 387.
 189. Kozxowski S., Drzewiecki K. The role of osmoreception in portal circulation in control of water intake in dogs. *Acta Physiol. Pol.* 24, 325, 1973.
 190. Kramer HJ. Natriuretic activity in plasma following extracellular volume expansion. "Central nervous control of Na⁺ balance-relations to the renin-angiotensin-system". Int. Workshop at Cologne. Ed. by Kaufman W., Krause DK. Georg Threms Publishers Stuttgart, 1976, p. 126.
 191. Kramer HJ. Natriuretic hormone-its possible role in fluid and electrolyte disturbances in chronic liver disease. *Postgrad. Med. J.*, 51, 532, 1975.
 192. Kramer HJ. Antinatriuretic and natriuretic activities in human plasma following acute and chronic salt-loading. In "Natriuretic Hormone". Ed: Kramer HJ., and Krück F. Springer-Verlag, Berlin, 1978, pp. 24.
 193. Kramer HJ., Backer A., Krück F. Antinatriuretic activity in human plasma following acute and chronic salt-loading. *Kidney Int.* 12, 214, 1977.
 194. Kramer, H.J., Krück, F. "Natriuretic hormone". Proc. Int. Workshop. Bonn, Germany. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, 1978.
 195. Krück F. Antinatriuretic plasma activity in edematous states with special reference to congestive cardiac failure. In: "Natriuretic Hormone". Ed.: HJ Kramer., F. Krück, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/NY, 1978, pp. 51.
 196. Lamson PD., Roca J. The liver as a blood concentrating organ. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 17, 481, 1921.
 197. Leaf A. The clinical and physiologic significance of the serum sodium concentration. *New. England. J. Med.* 267, 24, 1962.
 198. Leaf A., Bartter FC., Santos RF., Wrong O. Evidence in man that urinary electrolyte loss induced by pitressin is a function of water retention. *J. Clin. Invest.* 32, 868, 1953.
 199. Leek BF. Abdominal visceral receptors. In: *Handbook of sensory physiology Enteroreceptors*, ed. Neil. E. New York, Springer-Verlag, 3, 113, 1972.
 200. Lennane, RJ., Carey RM., Goodwin TJ., Peart WS. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted man: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin. Sci. Mol. Med.* 49, 437, 1975.
 201. Lennane RJ., Peart WS., Carey RM. Shaw J. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin. Sci. Mol. Med.* 49, 433, 1975.
 202. Levinsky NG. Nonaldosterone influences on renal sodium transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139, 295, 1966.
 203. Levinsky NG. The renal kallikrein-kinin system. *Circ. Res.* 44, 441, 1979.
 204. Levinsky NG., Lalone RC. The mechanism of sodium diuresis after saline infusion in the dog. *J. Clin. Invest.* 42, 1261, 1963.
 205. Levy M. Sodium retention in dogs with cirrhosis and ascites: efferent mechanisms. *Am. J. Physiol.* 233, 586, 1977.
 206. Levy M., Seely JF., Pathophysiology of edema formation. In: *The kidney*. Brenner BM., and Rector FC. (ed). WB Saunders, Co., Philadelphia, 1981, pp. 723.
 207. Liang CC. The influence of hepatic portal circulation on urine flow. *J. Physiol. (London)*. 214, 571, 1971.
 208. Lichardus B, Pearce JW. Evidence for a humoral natriuretic factor release by blood volume expansion. *Nature* 209, 407, 1966.
 209. Lichardus B., Ponec J. Acute hypophysectomy-a Model for the study of humoral mechanisms of natriuresis. In *Natriuretic Hormone*, Ed: Kramer HJ., Krück F. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York, 1978, pp. 6.
 210. Lichardus B., Ponec J. The past and the presence of a natriuretic hormone. *Avd. Physiol. Sci.* vol 11, *Kidney and Body Fluids.* L. Takács (ed.) Pergamon Press. *Académiai Kiadó.* Budapest. Hungary, 1980, 631.
 211. Lichstein D., Samueloy S. Endogenous "ouabain-like" activity in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commn.* 96, 1518, 1980.
 212. Licht A., Stein S., Bricker NS. Hormonal changes and transport adaptation in chronic renal failure: The possible role of a natriuretic hormone. *Biochem. Soc. Trans. (London)*. 6, 13, 1978.
 213. Licht A., Stein S., Mc Gregor CW., Bourgoignie JJ., Bricker NS. Progress in isolation and purification of an inhibitor of sodium transport obtained from dog urine. *Kidney Int.* 21, 339, 1982.

214. Licht A., Weiss ND., Bricker NS. Quantitation of natriuretic hormone (NH) activity using cell culture technique. Proc. Int. Congr. Nephrol. Athens 1981, pp. 173 (abstr.).
215. Lieberman FL., Denison EK, Reynolds TB. The relationship of plasma volume, portal hypertension, ascites and renal sodium retention in cirrhosis: The overflow theory of ascites formation. Ann. NY Acad. Sci. 170, 202 1970.
216. Linazasoro JM., Jiménez Díaz C., Castro Mendoza H. The kidney and thirst regulation. Bull. Inst. Med. Res. Madrid, 7, 53, 1954.
217. López Novoa, JM. Intrasplenic infusion. A simple method for intraportal infusion in rats. Experientia. 37, 536, 1981.
218. López Novoa, JM., Zubiaur M., Contribution of splanchnic area to the control of renal electrolyte excretion in conscious rats. Mineral. Electrol. Metab. 1982 (en prensa).
219. Luis F., Favre, H. Basal activity of the natriuretic factor extracted from the rat kidney as a function of the diet and its role in the regulation of the acute sodium balance. Clin. Sci. 58, 385, 1980.
220. Louis R., Favre H., Natriuretic factor in rats acutely expanded by Ringer's versus albumin solution. Kidney Int. 18, 20, 1980.
221. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Fandall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 73, 265, 1951.
222. Lydtin H. Untersuchungen über mechanismen der osmo-und volumenregulation. II. Untersuchungen über den einfluss intravenus intraportal und oral zugeführter hypotoner kochsalzlösungen auf die diurese des hundes. Z. Gesamte Exp. Med. 149, 193, 1969.
223. Macknight A.D., Dibona R.D., Leaf A. Sodium transport across toad bladder. (Review). Physiol. Rev. 60, 616, 1980.
224. Maddrell SHP., Gardiner BOC. Diuretic hormone in adult *Rhodnius prolixus*: Total store and speed of release. Physiol. Entomol. 1, 265, 1976.
225. Marsh D., Azen S. Mechanism of NaCl reabsorption by hamster thin ascending limbs of Henle's loop. Am. J. Physiol. 228, 71, 1975.
226. Marx JL. Natriuretic hormone linked to hypertension. Science. 212, 1255, 1981.
227. Massry SG., Ahumada JJ. Renal vasodilation: Studies on the site of action in the nephron. Clin. Sci. 42, 535, 1972.
228. McCance RA. Experimental sodium chloride deficiency in man. Proc. R. Soc. (London). (series B). 119, 245, 1936.
229. Mc Kinney TD., Burg MB. Bicarbonate absorption by rabbit cortical collecting tubules in vitro. Am. J. Physiol. 234, F 141, 1978.
230. Meyer P., Garay RP. Hypertension as a membrane disease. Eur. J. Clin. Invest. 11, 337, 1981.
231. Millies E. A new diuretic factor of hepatic origin. Acta Physiol. Latinoam. 10, 178, 1959.
232. Mills IH. Kallikrein, kininogen and kinins in control of blood pressure. Nephron. 23, 61, 1979.
233. Mills IH., De Wardener HE., Hayter CJ., Clapham WF. Studies on the afferent mechanism of the sodium chloride diuresis which follows intravenous saline in the dog. Clin. Sci. 21, 259, 1961.
234. Mills IH., Obika LFO., Newport PA. Stimulation of the renal kallikrein-kinin system by vasoactive substances and its relationships to the excretion of salt and water. In "Contr. Nepirol", eds., GM. Berlyne, Karger, Basel, 12, 132, 1978.
235. Mokrasch LC. Analysis of Hexoses Phosphates and sugar mixtures with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 208, 55, 1954.
236. Möller E., McIntosh JF., Van Slyke DD. Studies of urea excretion. II. J. Clin. Invest. 6, 427, 1929.
237. Montastruc P., Montastruc JL. La diurèse par perfusion intraportale d'eau: Comparaison chez le chien normal, hypophysectomisé et surrenalectomisé. J. Physiol. Paris. 76, 79, 1980.
238. Morgan DB., Gillies ME. Factors controlling the release of renin. Pflügers Arch. 368, 13, 1977.
239. Morgan DB., Thomas TH. Water balance and hyponatremia. Clin. Sci. 56, 517, 1979.
240. Morgan T., Sakai F., Berliner R. In vitro permeability of medullary collecting ducts to water and urea. Am. J. Physiol. 214, 574, 1968.
241. Mouw DR., Vander AJ. Evidence for brain Na receptors controlling renal Na excretion and plasma renin activity. Am. J. Physiol. 219, 822, 1970.
242. Mullane JF., Geldman ML. Renal response to saline load in experimental liver disease. J. Surg. Res. 10, 519, 1970.
243. Mullane JF., Geldman ML. Development of renal impairment in Laennec's cirrhosis. Ann. Surg. 174, 892, 1971.
244. Mullane JF., Yhap EO. Natriuresis after occlusion of the hepatic artery and portal vein. J. Surg. Res. 11, 441, 1971.

245. Müller J. Regulation of aldosterone biosynthesis. Springer Verlag, New York, 1971.
246. Müller J., Barajas L. Electron microscopic and histochemical evidence for a tubular innervation in the renal cortex of the monkey. *J. Ultrastruc. Res.* 41, 533, 1972.
247. Naccarato R., Messa P., D'Angelo A., Fabris A., Messa M., Chiamonte M., Gregolin C., Zanon G. Renal handling of sodium and water in early chronic liver disease. *Gastroenterology*, 81, 205, 1981.
248. Nashat FS., Tappin JW., Wilcox CS. Plasma sodium concentration and sodium excretion in the anesthetized dog. *J. Physiol*, 254, 183, 1976.
249. Nasjletti A., Masson GMC. Hepatic origin of renin substrate. *Can. J. Physiol, Pharmacol.* 49, 931, 1971.
250. Naumann H. N. The chemical measurement of total base in serum. In: Suderman FW. and Sunderman FW, Jr. (eds.). *Clinical Pathology of the serum electrolytes*. Charles C. Thomas. Springfield, Ill. 1966.
251. Navar LG., Bell PD., Adams PL. Macula densa feedback regulation of renal hemodynamics and renal autoregulation. *Adv. Physiol. Sci. Vol 11. Kidney and Body Fluids*. L. Takács (ed.). Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980, pp. 205.
252. Neumann KH., Rector FC., Jr. Mechanism of NaCl and water reabsorption in the proximal convoluted tubule of rat kidney. *J. Clin. Invest.* 58, 1110, 1976.
253. Nijjima A. Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. *Science*. 166, 1519, 1969.
254. Nijjima A. Afferent discharges from venous presoreceptors in liver. *Am. J. Physiol.* 232, C 76, 1977.
255. Nizet A. Le mécanisme de la natriuresis consecutive a une expansion du volume intravasculaire, etude chez le chien au moyen d'une technique de circulation croisee isovolumétrique. *J. Urol. Nephrol.* 76, 1004, 1970.
256. Oberg B. Effects of cardiovascular reflexes on net capillary fluid transfer. *Acta. Physiol. Scand.* (suppl.) 62, 229, 1964.
257. Obika LFO., Fitzgerald EM., Gleason SD., Zucker A., Schneider EG. Lack of evidence for gastrointestinal control of sodium excretion in unanesthetized rabbit. *Am. J. Physiol.* 240, F. 94, 1981.
258. Oettel H. Einwirkung von leverextrakten auf die diuresis. *Zeitschr. ges. Exper. Med.* 111, 613, 1943.
259. Ohm W., Haberich FJ. Über den einfluss des druckes im portalkreislauf auf die diuresis der wachen ratte. *Pflügers Arch.* 306, 227, 1969.
260. Oparil S., Sanders CA., Haber E. In vivo and in vitro conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog blood. *Circ. Res.* 26, 591, 1970.
261. Osgood RW., Lameire NH., Sorkin MI., Stein JH. Effect of aortic clamping on proximal reabsorption and sodium excretion in the rat. *Am. J. Physiol.* 232, F 92, 1977.
262. Paintal AS. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol. Rev.* 53, 159, 1973.
263. Passo SS., Thornborough JR., Rothballer AB. Hepatic receptors in control of sodium excretion in anesthetized cats. *Am. J. Physiol.* 224, 373, 1973.
264. Peach MJ. Renin-Angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 57, 313, 1977.
265. Pearce JW., Sonnenberg H. Effects of spinal section and renal denervation on the renal response to blood volume expansion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 43, 211, 1965.
266. Pearce JW., Sonnenberg H., Veress AT., Ackerman V. Evidence for a humoral factor modifying the renal response to blood volume expansion in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47, 377, 1969.
267. Peck JW., Novin D. Evidence that osmoreceptors mediating drinking in rabbits are in the lateral preoptic area. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 74, 134, 1971.
268. Perlmutter JH., Aziz O., Haberich FJ. A comparison of sodium excretion in response to infusion of isotonic saline into the vena porta and vena cava of conscious rats. *Pflügers Arch.* 357, 1, 1975.
269. Perlmutter JH., Kao CC., Hill PK. Concentration and dilution of the urine in partially hepatectomized conscious rats. *Pflügers Arch.* 369, 233, 1977.
270. Perlmutter JH., Yelinek L., Zander R. Influence of partial hepatectomy on the renal response to isotonic saline loads in conscious rats. *Pflügers Arch.* 344, 349, 1973.
271. Peters JP. Body water: The exchange of fluids in man. Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1935.
272. Peterson TV., Gilmore JP., Zucker IH. Renal responses of the recumbent nonhuman primate to total body water immersion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 161, 260, 1979.
273. Plath DW., Navar LG. Intrarenal effects of the renin-angiotensin system. *Fed. Proc.* 38, 2280, 1979.
274. Porath J. Flodin P., Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature*, 183, 1657, 1959.
275. Postnov YV., Orlov SN., Shevchenko A., Adler AM. Altered sodium permeability, calcium binding and Na⁺, K⁺-ATPase activity in the red blood cell membrane in essential hypertension. *Pflügers Arch.* 371, 263, 1977.
276. Poston L., Sewell R., Williams R., Richardson P., De Wardener HE. The effect of (1) a low molecular weight natriuretic substance and (2) plasma from hypertensive patients on the sodium transport of leucocytes from normal subjects. In: *Abst. Int. Symposium on Intracellular Electrolytes and Arterial Hypertension*. University of Münster, Germany, G. Thieme, 1980, in press.
277. Poston L., Sewell RB., Wilkinson SP., Richardson PJ., Williams R., Clarkson EM., Mac Gregor GA., De War-

- dener HE. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *Brit. Med. J.* 282, 847, 1981.
278. Potkay S., Gilmore JP. Renal responses to vena cava and portal venous infusions of sodium chloride in anaesthetized dogs. *Clin. Sci.* 39, 13, 1970.
279. Quamme G., Dirks H., Friesen HG. Natriuretic effects of posterior pituitary extracts in rats. *Clin. Res.* 21, 703, 1973.
280. Querido D., Isaacson LC. Blood-volume expansion in the rat: natriuresis accompanied by a fall in filtration fraction. *Clin. Sci.* 60, 283, 1981.
281. Rau W., Frömter E. Electrical properties of the medullary collecting ducts of the golden hamster kidney. II. The transepithelial resistance. *Pflügers Arch.* 351, 113, 1974.
282. Rector FC., Sellman J.C., Martínez-Maldonado M., Seldin DW. The mechanism of suppression of proximal tubular reabsorption by saline infusions. *J. Clin. Invest.* 46, 47, 1967.
283. Rector FC., Van Giesen G., Kiil F., Seldin DW. Influence of expansion of extracellular volume on tubular reabsorption of sodium independent of changes in GFR and aldosterone activity. *J. Clin. Invest.* 43, 341, 1964.
284. Reineck, HJ., Stein JH. Renal regulation of extracellular fluid volume. In "sodium and water homeostasis", eds. B.M. Brenner, JH. Stein, Churchill Livingstone, NY. 1978, pp. 24.
285. Reinhardt HW., Behrenbeck DW. Untersuchungen an wachen hunden über die einstellung der natrium balanz. *Pflügers Arch.* 295, 266, 1967.
286. Richards AN., Westfall BB., Bott PA. Renal excretion of inulin, creatinine and xylose in normal dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32, 93, 1934.
287. Robinson AG., Michelis MF., Warms PC., Davis BB. Natriuretic effect of posterior pituitary neurophysin. *Clin. Res.* 21, 501, 1973.
288. Rothe CF., Nash FD., Thompson DE. Patterns in autoregulation of renal blood flow in the rat. III. Hemodynamics and autoregulation. *Am. J. Physiol.* 223, 1191, 1972.
289. Sacktor B. Transport in membrane vesicles isolated from the mammalian kidney and intestine. In Sanadi, R. (ed.): *Current Topics in Bioenergetics*, vol. 6. Academic Press, New York, 1977, pp. 39.
290. Samuels AL., Miller ED., Jr., Fray JCS., Haber E., Barger AC. Renin-angiotensin antagonists and the regulation of blood pressure. *Fed. Proc.* 35, 2512, 1976.
291. Sawchenko PE., Friedman MI. Sensory functions of the liver a review. *Am. J. Physiol.* 236, R5, 1979.
292. Scatchard G., Scheinberg IH., Armstrong SH., Jr. Physical chemistry of protein solutions. IV. The combination of human serum albumin with choride ion. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 535, 1950.
293. Schmidt RW., Bourgoignie JJ., Bricker NS. On the adaptation in sodium excretion in chronic uremia (The effects of "proportional reduction" of sodium intake). *J. Clin. Invest.* 53, 1736, 1974.
294. Schmidt-Nielsen B., O'Dell R. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. *Am. J. Physiol.* 200, 1119, 1961.
295. Schmitt M. Influences of hepatic portal receptors on hypothalamic feeding and safety centers. *Am. J. Physiol.* 225, 1089, 1973.
296. Schmitt M. Circadian rhythmicity in response of cells in the lateral hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 225, 1096, 1973.
297. Schneider EG., Davis JO., Robb CA., Baumber JS., Johnson JA., Wright FS. Lack of evidence for hepatic osmoreceptor mechanism in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 218, 42, 1970.
298. Schnermann J., Briggs J., Wright FS. Feedback-mediated reduction of glomerular filtration rate during infusion of hypertonic saline. *Kidney Int.* 20, 462, 1981.
299. Schrier RW., Berl T., Andersson RJ., Mac Donald KM. Nonosmolar control of renal water excretion. In Andreoli TE., Grantham JJ., and Rector FC., Jr. (eds.): *Disturbances in body fluids osmolality*. Am. Physiol. Soc. Bethesda, Md, 1977.
300. Schrier RW., MacDonald KM., Marshall RA., Lauler DP. Absence of natriuretic response to acute hypotonic intravascular volume expansion in dogs. *Clin. Sci.* 34, 57, 1968.
301. Schwatz GJ., Burg MB. Mineralocorticoid effects on cation transport by cortical collecting tubules "in vitro". *Am. J. Physiol.* 235, F 576, 1978.
302. Scicli AG., Gandolfi R., Carretero O. Site of formation of kinins in the dog nephron. *Am. J. Physiol.* 234, F 36, 1978.
303. Seely JF., Levy M. Control of extracellular fluid volume. In: *The kidney*, Brenner BM., and Rector FC. (eds.). WB. Saunders Co. Philadelphia. 1981, pp. 371.
304. Segar WE., Moore WW. The regulation of antidiuretic hormone release in man. *J. Clin. Invest.* 47, 143, 1968.
305. Seldin DW. Sodium balance and fluid volume. In Bricker NS. (ed.): *The sea within us*. Searle and Co. S. Juan, Puerto Rico, 1975, pp. 4.
306. Selkurt EE., Rothe CF. Splanchnic baroreceptors in the dog. *Am. J. Physiol.* 199, 335, 1960.

307. Shannon JA., Smith HW. The excretion of inulin, xylose, and urea by normal and phlorizinized man. *J. Clin. Invest.* 14, 393, 1935.
308. Share L. Acute reduction in extracellular fluid volume and the concentration of antidiuretic hormone in blood. *Endocrinology*, 69, 925, 1961.
309. Share L. Effects of carotid occlusion and left atrial distention on plasma vasopressin titer. *Am. J. Physiol.* 208, 219, 1965.
310. Share L. Role of peripheral receptors in the increased release of vasopressin in response to hemorrhage. *Endocrinology*, 81, 1140, 1967.
311. Share L. Control of plasma ADH titer in hemorrhage: role of atrial and arterial receptors. *Am. J. Physiol.* 215, 1384, 1968.
312. Share L., Claybourn JR. Regulation of body fluids. *Ann. Rev. Physiol.* 34, 235, 1972.
313. Sherlock S. *Disease of liver and biliary system*. 4th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968.
314. Simpson SA., Tait JF., Weltstein A., Netter R., Euw J., Reichstein T. Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. *Experientia*. 9, 333, 1953.
315. Smith HW. *Principles of renal physiology*. New York: Oxford, 1956.
316. Smith HW. Salt and water volume receptors. *Am. J. Med.* 23, 623, 1957.
317. Sonnenberg H. Medullary collecting duct function in antidiuretic and in salt- or water diuretic rats. *Am. J. Physiol.* 226, 501, 1974.
318. Sonnenberg H. Secretion of salt and water into the medullary collecting duct of the Ringer-infused rats. *Am. J. Physiol.* 228, 565, 1975.
319. Sonnenberg H., Veress AT., Pearce JW. Humoral component of the natriuretic mechanism in sustained blood volume expansion. *J. Clin. Invest.* 51, 2631, 1972.
320. Stahl J., Jahn H., Jahn M., Kieny R. Preuve en faveur de l'origine hépatique de l'activité diurétique et natriurétique décelée chez l'homme et le chien au cours de l'expansion du volume extracellulaire et de la stimulation des voloccepteurs intrathoraciques. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences. Paris.* 265, 1240, 1967.
321. Starling EH. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *J. Physiol.* 19, 312, 1896.
322. Starling EH. *The fluids of the body. The Herter Lectures*. W.T. Keener & Co., Chicago, 1909.
323. Stein JM., Osgood RW., Kunau RJ. Direct measurement of papillary collecting duct sodium transport in the rat. Evidence for heterogeneity of nephron function during Ringer loading. *J. Clin. Invest.* 58, 767, 1976.
324. Stoner L., Burg M., Orloff J. Ion transport in cortical collecting tubule: Effect of amiloride. *Am. J. Physiol.* 227, 453, 1974.
325. Strandhoy JW., Williamson HE. Evidence for an hepatic role in the control of sodium excretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133, 419, 1970.
326. Strauss MB., Lamdin E., Smith P., Bleifer D. Surfeit and deficit of sodium. *Arch. Intern. Med.* 102, 527, 1958.
327. Szczepańska-Sadowska E. The activity of the hypothalamo-hypophysial antidiuretic system in conscious dogs. I. The influence of isoosmotic blood volume changes. *Pflügers Arch.* 335, 139, 1972.
328. Ten Berg RGM., Leenen FHH., De Jong W. Plasma renin activity and sodium, potassium and water excretion during reversal of hypertension in the one-clip, two kidney hypertensive rat. *Clin. Sci.* 57, 47, 1979.
329. Thrasher TN., Jones RG., Keil LC., Brown CJ., Ramsay DJ. Drinking and vasopressin release during ventricular infusion of hypertonic solutions. *Am. J. Physiol.* 238, R 340, 1980.
330. Tigerstedt R., Bergmann PG. Niere und Kreislauf. *Scand. Arch. Physiol.* 8, 233, 1898.
331. Tisher CC. *Anatomy of the kidney*. In "The Kidney". Brenner BM., Rector FC. (ed.). WB. Sanders, Co. Philadelphia. 1981. pp. 3.
332. Tobian L., Coffee K., Mc Crea P., Dahl LK. A comparison of the antihypertensive potency of kidneys from one strain of rats susceptible to salt hypertension and kidneys from another strain resistant to it. *J. Clin. Invest.* 45, 1080, 1966.
333. Tyryshkina EM. Electrophysiological characteristic, nature and localization of the hepatic osmoreceptors. *Fiziol. Zh. SSSR.* 64, 349, 1978.
334. Tyryshkina EM. The nature and the mechanism of the liver osmoreceptor excitation. *Avd. Physiol. Sci. Vol. 11. Kidney and Body Fluids*. L. Takács (ed.). Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980, pp. 659.
335. Tyryshkina EM. Participation of the liver receptors in the regulation of ion composition osmolality and extracellular fluid volume. *Pflügers Arch.* 390, 270, 1981.
336. Ullrich K. Function of the collecting ducts. *Circulation*. 21, 869, 1960.
337. Uranga J. Influence of the liver on regulation of glomerular pressure in the toad. *Am. J. Physiol.* 213, 1244, 1967.

338. Uranga J. The hepatic production of a glomerular pressure substance in the toad. (*Bufo arenarum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 13, 179, 1969.
339. Uranga J. Some characteristics of hepatic glomerular pressure substance. *Am. J. Physiol.* 220, 1617, 1971.
340. Uranga J., del Castillo E., Gimeno M. Action of glomerulopressin on smooth muscle contraction, probably mediated by the release of prostaglandins. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 238, 19, 1979.
341. Uranga J., Fuenzalida R., Rapaport AL., del Castillo E. Effect of glucagon and glomerulopressin on the renal function of the dog. *Horm. Metab. Res.* 11, 275, 1979.
342. Vaamonde CA. Renal water handling in liver disease. In "The Kidney in Liver Disease". Epstein M. (ed.). Elsevier-North-Holland., NY, 1979, pp. 67.
343. Valdivieso AJ., Pérez G.O. Renal response to isotonic saline infusions into portal and jugular vein in sodium-loaded, conscious rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167, 261, 1981.
344. Velikanova LK., Finkinshtein IAD. Osmoreceptors in the liver. *Sechenov. Physiol. J. UUSR (English translation)*, 45, 66, 1959.
345. Veress AT., Milojevic S., Sonnenberg H. Characterization of the natriuretic activity in the plasma of hypervolemic rats. *Clin. Sci.* 59, 183, 1980.
346. Verney EB. The antidiuretic hormone and factors which determine its release. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.* 135, 25, 1947.
347. Waddell WJ., Bates RG. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 49, 285, 1969.
348. Walser M. Ion association. VI. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma. *J. Clin. Invest.* 40, 723, 1961.
349. Walser M. Magnesium metabolism. *Ergeb. Physiol.* 59, 185, 1967.
350. Waugh WH., Beall PT. Simplified measurement of p-aminohippurate and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.* 5, 429, 1974.
351. Weaver LC. Cardiopulmonary sympathetic afferent influences on renal nerve activity. *Am. J. Physiol.* 23, H 592, 1977.
352. Weber H., Bourgoignie JJ., Bricker NS. Effects of natriuretic serum fraction on proximal tubular sodium reabsorption. *Am. J. Physiol.* 226, 419, 1974.
353. Welt LG. Volume receptors. *Circulation.* 21, 1002, 1960.
354. Wiederhielm CA. Dynamics of transcapillary fluid exchanges. *J. Gen. Physiol.* 52, (suppl.): 29s 1968.
355. Wilcox CS. The renal response to salt loading. *Adv. Physiol. Sci. Vol. 11. Kidney and Body Fluids.* ed Takacs L. Pergamon Press, Akademiai Kiadó, Budapest 1980, pp. 621.
356. Wilkinson SP., Alam A., Moodie H., Williams R. Renal retention of sodium in cirrhosis and fulminant hepatic failure. *Postgrad. Med. J.* 51, 527, 1975.
357. Wilkinson SP., Smith IK., Moodie H. Studies on mineralocorticoid "escape" in cirrhosis. *Clin. Sci.* 56, 40, 1979.
358. Wilkinson SP., Smith IK., Williams R. Sodium retention, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the intrarenal distribution of plasma flow in cirrhosis with unimpaired renal function. In: Epstein M., ed. "The Kidney in liver disease". New York: Elsevier/Nort-Holland, Inc., 1978, pp. 55.
359. Williams GH., Dluhy RG. Aldosterone biosynthesis: Interrelationship of regulatory factors. *Am. J. Med.* 3, 595, 1972.
360. Willis LR. Natriuretic responses of spontaneously hypertensive rats to intragastric and intravenous saline loads. *J. Lab. Clin. Med.* 94, 42, 1979.
361. Windhager E. Micropuncture techniques and nephron function. Appleton-Century-Crofts, NY, 1968.
362. Windhager EE., Constanzo LS. Transport functions of the distal convoluted tubule. In Andreoli T.E., Hoffman JF., Fanestì D D. (eds.): *Physiology of Membrane Disorders.* Plenum, New York, 1978, pp. 681
363. Wolf G., McGovern GF., Dicara LV. Sodium appetite: some conceptual and methodological aspects of a model drive system. *Behav. Biol.* 10, 27, 1974.
364. Wolfman EF., Zuidema GD., Oneal RM., Turcotte J., Kowalczyk R., Child CG. Sodium excretion after intrasplenic and systemic injections of sodium chloride in normal dogs and after portacaval shunt. *Surgery.* 50, 231, 1961.
365. Woodhall P., Tisher C. Response of the distal tubule and cortical collecting duct to vasopressin in the rat. *J. Clin. Invest.* 53, 3095, 1973.
366. Woodhall C., Tisher C., Simonton CA., Robinson RR. Relationship between para-aminohippurate secretion and cellular morphology in rabbit proximal tubules. *J. Clin. Invest.* 61, 1320, 1978.
367. Wright F. Increasing magnitude of electrical potential along the renal distal tubule. *Am. J. Physiol.* 220, 24, 1971.
368. Wright FS., Davis JO., Johnston CI., Howards SS. Renal sodium excretion after volume expansion with saline and blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 1044, 1968.

369. Young DB., Guyton AC. Steady state aldosterone dose-response relationships. *Cir. Res.* 40, 138, 1977.
370. Young MK., Roisz LG. An anthrone procedure for the determination of inulin in biological fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80, 771, 1952.



338. Uranga J. The hepatic production of a glomerular pressure substance in the toad. (*Bufo arenarum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 13, 179, 1969.
339. Uranga J. Some characteristics of hepatic glomerular pressure substance. *Am. J. Physiol.* 220, 1617, 1971
340. Uranga J., del Castillo E., Gimeno M. Action of glomerulopressin on smooth muscle contraction, probably mediated by the release of prostaglandins. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 238, 19, 1979.
341. Uranga J., Fuenzalida R., Rapaport AL., del Castillo E. Effect of glucagon and glomerulopressin on the renal function of the dog. *Horm. Metab. Res.* 11, 275, 1979.
342. Vaamonde CA. Renal water handling in liver disease. In "The Kidney in Liver Disease". Epstein M. (ed.). Elsevier-North-Holland, NY, 1979, pp. 67.
343. Valdivieso AJ., Pérez G.O. Renal response to isotonic saline infusions into portal and jugular vein in sodium-loaded, conscious rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167, 261, 1981.
344. Velikanova LK., Finkinshtein IAD. Osmoreceptors in the liver. *Sechenov. Physiol. J. UUSR (English translation)*, 45, 66, 1959.
345. Veress AT., Milojevic S., Sonnenberg H. Characterization of the natriuretic activity in the plasma of hypovolemic rats. *Clin. Sci.* 59, 183, 1980.
346. Verney EB. The antidiuretic hormone and factors which determine its release. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.* 135, 25, 1947.
347. Waddell WJ., Bates RG. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 49, 285, 1969.
348. Walser M. Ion association. VI. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma. *J. Clin. Invest.* 40, 723, 1961.
349. Walser M. Magnesium metabolism. *Ergeb. Physiol.* 59, 185, 1967.
350. Waugh WH., Beall PT. Simplified measurement of p-aminohippurate and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.* 5, 429, 1974.
351. Weaver LC. Cardiopulmonary sympathetic afferent influences on renal nerve activity. *Am. J. Physiol.* 23, H 592, 1977.
352. Weber H., Bourgoignie JJ., Bricker NS. Effects of natriuretic serum fraction on proximal tubular sodium reabsorption. *Am. J. Physiol.* 226, 419, 1974.
353. Welt LG. Volume receptors. *Circulation.* 21, 1002, 1960.
354. Wiederhielm CA. Dynamics of transcapillary fluid exchanges. *J. Gen. Physiol.* 52, (suppl.): 29s 1968.
355. Wilcox CS. The renal response to salt loading. *Adv. Physiol. Sci. Vol. 11. Kidney and Body Fluids.* ed Takacs L. Pergamon Press, Akademiai Kiadó, Budapest 1980, pp. 621.
356. Wilkinson SP., Alam A., Moodie H., Williams R. Renal retention of sodium in cirrhosis and fulminant hepatic failure. *Postgrad. Med. J.* 51, 527, 1975.
357. Wilkinson SP., Smith IK., Moodie H. Studies on mineralocorticoid "escape" in cirrhosis. *Clin. Sci.* 56, 40, 1979.
358. Wilkinson SP., Smith IK., Williams R. Sodium retention, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the intrarenal distribution of plasma flow in cirrhosis with unimpaired renal function. In: Epstein M., ed. "The Kidney in liver disease". New York: Elsevier/Nort-Holland, Inc., 1978, pp. 55.
359. Williams GH., Dluhy RG. Aldosterone biosynthesis: Interrelationship of regulatory factors. *Am. J. Med.* 3, 595, 1972.
360. Willis LR. Natriuretic responses of spontaneously hypertensive rats to intragastric and intravenous saline loads. *J. Lab. Clin. Med.* 94, 42, 1979.
361. Windhager E. Micropuncture techniques and nephron function. Appleton-Century-Crofts. NY, 1968.
362. Windhager EE., Constanzo LS. Transport functions of the distal convoluted tubule. In Andreoli T.E., Hoffman JF., Fanesti D D. (eds.): *Physiology of Membrane Disorders*. Plenum, New York, 1978, pp. 681
363. Wolf G., McGovern GF., Dicara LV. Sodium appetite: some conceptual and methodological aspects of a model drive system. *Behav. Biol.* 10, 27, 1974.
364. Wolfman EF., Zuidema GD., Oneal RM., Turcotte J., Kowalczyk R., Child CG. Sodium excretion after intrasplenic and systemic injections of sodium chloride in normal dogs and after portacaval shunt. *Surgev.* 50, 231, 1961.
365. Woodhall P., Tisher C. Response of the distal tubule and cortical collecting duct to vasopressin in the rat. *J. Clin. Invest.* 53, 3095, 1973.
366. Woodhall C., Tisher C., Simonton CA., Robinson RR. Relationship between para-aminohippurate secretin and cellular morphology in rabbit proximal tubules. *J. Clin. Invest.* 61, 1320, 1978.
367. Wright F. Increasing magnitude of electrical potential along the renal distal tubule. *Am. J. Physiol.* 220, 24, 1971.
368. Wright FS., Davis JO., Johnston CI., Howards SS. Renal sodium excretion after volume expansion with saline and blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 1044, 1968.

369. Young DB., Guyton AC. Steady state aldosterone dose-response relationships. *Cir. Res.* 40, 138, 1977.
370. Young MK., Roisz LG. An anthrone procedure for the determination of inulin in biological fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80, 771, 1952.

