



GUADALUPE GÖTZENS GARCIA

DEPARTAMENT D'ANATOMIA I EMBRIOLOGIA HUMANA

FACULTAT DE MEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

TESIS DOCTORAL

DISTRIBUCIÓN DE FIBRONECTINA Y LAMININA EN EL CORPÚSCULO
RENAL DE DIVERSAS ESPECIES DE ROEDORES



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESIS DOCTORAL
FACULTAT DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO
ORGANOGENESIS Y ANATOMÍA CLÍNICA Y APLICADA
BIENIO 87-89

DISTRIBUCIÓN DE FIBRONECTINA Y LAMININA EN EL CORPÚSCULO RENAL
DE DIVERSAS ESPECIES DE ROEDORES

Memoria presentada por Guadalupe Götzens Garcia para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, en el Departament d'Anatomia i Embriologia Humana, Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, bajo la codirección del Doctor Victor J. Götzens Garcia y la Doctora Begoña Torres Gallardo

Guadalupe Götzens Garcia
Barcelona, Noviembre de 2003

V.B.
El Codirector de la tesis doctoral
Dr. Victor J. Götzens Garcia
Departament d'Anatomia i Embriologia
Humana
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

V.B.
La Codirectora de la tesis doctoral
Dra. Begoña Torres Gallardo
Departament d'Anatomia i Embriologia
Humana
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Índice

1	Introducción	1
1.1	El riñón de los vertebrados como órgano de excreción	1
1.1.1	Adaptaciones a la regulación del agua y a la regulación osmótica	2
1.1.1.1	Vertebrados acuáticos (peces y anfibios).....	2
1.1.1.1.1	Clase Agnatos	3
1.1.1.1.2	Clase Condriictios	3
1.1.1.1.3	Clase Osteictios.....	5
1.1.1.1.4	Clase Anfibios.....	7
1.1.1.2	Vertebrados terrestres.....	8
1.1.1.2.1	Clase Reptiles	8
1.1.1.2.2	Clase Aves y Clase Mamíferos.....	9
1.1.2	Diferenciaciones anatómicas de la nefrona de los mamíferos	11
1.2	Morfología evolutiva del riñón de los vertebrados	15
1.2.1	Primeras etapas embrionarias del sistema urinario	15
1.2.2	Filogenia de la nefrona.....	17
1.2.3	Morfología de las unidades excretoras y de los riñones adultos.....	19
1.2.3.1	Anamniotas.....	19
1.2.3.1.1	Clase Agnatos	19
1.2.3.1.2	Clase Condriictios	21
1.2.3.1.3	Clase Osteictios.....	21
1.2.3.1.4	Clase Anfibios.....	22

1.2.3.2 Amniotas	23
1.2.3.2.1 Clase Reptiles.....	26
1.2.3.2.2 Clase Aves.....	27
1.2.3.2.3 Clase Mamíferos	28
1.2.4 Organización citológica del corpúsculo renal	29
1.2.4.1 Células del epitelio parietal de la cápsula de Bowman	30
1.2.4.2 Células del epitelio visceral de la cápsula de Bowman.....	30
1.2.4.3 Células endoteliales del glomérulo.....	32
1.2.4.4 Células mesangiales intraglomerulares	33
1.3 Matriz extracelular	34
1.3.1 Componentes mayoritarios de la matriz extracelular	36
1.3.1.1 Colágeno tipo IV	37
1.3.1.2 Colágeno tipo XVIII.....	38
1.3.1.3 Agrín.....	40
1.3.1.4 Entactín/Nidógeno	41
1.3.1.5 Fibronectina.....	42
1.3.1.5.1 Estructura del Módulo Fn1	48
1.3.1.5.2 Estructura del Módulo Fn2	50
1.3.1.5.3 Estructura del Módulo Fn3	51
1.3.1.6 Laminina.....	54
1.3.1.6.1 Estructura de las cadenas Gamma y Beta	56
1.3.1.6.1.1 Dominios I y II.....	57
1.3.1.6.1.2 Dominios III y V	57
1.3.1.6.1.3 Dominios IV y VI.....	59
1.3.1.6.1.4 Dominio B o segmento alfa.....	60
1.3.1.6.2 Estructura de la cadena Alfa	60
1.3.2 La matriz extracelular en el desarrollo glomerular y las patologías renales	62

2 Objetivos	75
3 Material y métodos	77
3.1 Animales utilizados y obtención de las muestras.....	77
3.2 Técnicas de microscopía óptica	78
3.2.1 Tinción PAS-Azul de Alcían	78
3.2.2 Inmunohistoquímica.....	79
3.2.2.1 Inmunoperoxidasa	80
3.2.2.2 Inmunofluorescencia	82
3.3 Técnicas de microscopía electrónica de transmisión	83
3.3.1 Técnica estándar de microscopía electrónica de transmisión	83
3.3.2 Inmunolocalización mediante oro coloidal en secciones ultrafinas de Lowicryl	87
4 Resultados	91
5 Discusión	137
5.1 Fibronectina	144
5.2 Laminina	147
5.3 Membrana basal glomerular.....	153
5.4 Apodemus sylvaticus	154
Conclusiones	157
Bibliografía	159

1 Introducción

1.1 El riñón de los vertebrados como órgano de excreción

Los órganos excretores tienen un cierto número de funciones, todas ellas relacionadas con el mantenimiento de un medio interno constante en el organismo.

El mantenimiento de una composición interna constante implica una necesidad básica, la de que todo material que entra en el organismo tiene que ser equilibrado por una cantidad igual eliminada. Esto a su vez implica que las vías excretoras han de tener una capacidad variable, que pueda ser ajustada, para eliminar cantidades perfectamente controladas de cada una de las posibles e innumerables sustancias metabólicas.

Así las funciones principales de los sistemas excretores son: el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de iones (sodio, potasio, cloro, calcio, hidrógeno, etc.), el mantenimiento de un volumen acuoso corporal adecuado y como consecuencia el mantenimiento de las concentraciones osmóticas corporales y la eliminación de los productos catabólicos finales (urea, ácido úrico, etc.) y de las sustancias extrañas.

1.1.1 Adaptaciones a la regulación del agua y a la regulación osmótica.

Los problemas para mantener el agua y las concentraciones de los solutos de forma constante varían con el ambiente, ya que un animal hace frente a dichos problemas de forma distinta en el agua de mar, el agua dulce o sobre el medio terrestre.

1.1.1.1 Vertebrados acuáticos (peces y anfibios).

Las concentraciones de los principales iones y moléculas en el plasma sanguíneo de los vertebrados acuáticos son muy variables.

Dentro de los representantes marinos podemos diferenciar dos grupos bien definidos; aquellos cuyas concentraciones osmóticas son o bien las mismas o ligeramente por encima de las del agua de mar (*Myxine*, Elasmobranquios, *Latimeria*) o aquellos en los que las concentraciones osmóticas son aproximadamente una tercera parte la de la concentración del agua de mar (otras lampreas y teleósteos). El primer grupo no debe tener ningún problema en cuanto al equilibrio hídrico, pero no así los que permanecen claramente hiposmóticos ya que viven en peligro constante de perder agua frente al medio marino osmóticamente más concentrado.

Los vertebrados de las aguas dulces, por otro lado, constituyen un grupo uniforme que presentan concentraciones osmóticas que se corresponden con entre una tercera y una cuarta parte de la del agua de mar, y por lo tanto son hiperosmóticos con respecto al medio (Robertson, 1954; Gordon et al., 1961; Thorson et al., 1967a y b; Mayer, 1969; Bentley, 1971; Lutz y Robertson, 1971).

1.1.1.1.1 Clase Agnatos.

De los órdenes de agnatos, los Petromyzontia viven tanto en el agua de mar como en agua dulce mientras que los Myxinoidea sólo tienen representantes estrictamente marinos y estenohialinos. Estos dos grupos han utilizado dos soluciones distintas para el mantenimiento de la vida en el medio marino.

Los Myxinoidea son los únicos vertebrados verdaderos que tienen sus líquidos corporales con una concentración de sales similar a la del agua de mar, de hecho, la concentración normal de sodio en la sangre de estos animales es ligeramente superior a la del medio. Esta característica desde el punto de vista osmótico implica que este grupo animal no debe enfrentarse con el problema del movimiento osmótico del agua.

El otro grupo de Agnatos, presenta una concentración osmótica de aproximadamente un cuarto o un tercio de la del agua del mar. Su principal problema osmótico es similar al de los Osteictios que se comentará más adelante.

1.1.1.1.2 Clase Condrictios.

Los tiburones y las rayas son, casi sin excepción, marinos. Estos animales han resuelto el problema osmótico de la vida en el mar de forma muy particular. Al igual que muchos otros vertebrados, mantienen concentraciones salinas de sus fluidos corporales en aproximadamente un tercio la del agua del mar pero mantienen el equilibrio osmótico añadiendo a los líquidos corporales grandes cantidades de compuestos orgánicos, principalmente urea y óxido de trimetilamina, la concentración de urea en sangre en los elasmobranquios es del orden de más de cien veces la que se encuentra en los mamíferos, de tal modo que la concentración osmótica total de su cuerpo es ligeramente superior a la del agua del mar. El hecho

de que la concentración osmótica sea ligeramente más concentrada que el agua de mar provoca también una ligera entrada de agua a través de las branquias; de este modo, los elasmobranquios obtienen agua que será utilizada para la formación de la orina y para la secreción a partir de la glándula rectal.

Aunque los elasmobranquios han resuelto el problema osmótico de la vida en el mar siendo isosmóticos, tienen todavía una amplia regulación iónica. Por ejemplo, la concentración de los iones sodio se mantiene en aproximadamente la mitad de la que se encuentra en el agua de mar. Esto significa que el ion sodio tiende a difundir desde el agua de mar hacia el interior del tiburón, primariamente a través del delgado epitelio de las branquias, además siempre se ingiere algo de sodio con la comida. Dado que la concentración de ion sodio tiende a aumentar pero debe mantenerse baja, el exceso de éste debe ser eliminado. Parte del exceso de iones sodio es excretado por el riñón, si bien es la glándula rectal la que tiene mayor importancia en la eliminación del mismo (Burger y Hess, 1960).

Si bien, la inmensa mayoría de Condrictios viven en el mar, unos pocos entran en las aguas dulces, e incluso algunos pueden habitar permanentemente en ellas. En las especies capaces de entrar en las aguas dulces las concentraciones de solutos son más bajas que en las formas estrictamente marinas; en particular, la urea está reducida a menos de un tercio, aunque permanece todavía muy por encima del nivel normal para los demás vertebrados. El género *Potamotrygon* que vive permanentemente en aguas dulces no sobrevive en agua de mar, incluso cuando la transferencia tiene lugar mediante un aumento gradual de la concentración salina (Pang et al., 1972). La composición promedio de su sangre muestra una adaptación completa al agua dulce con una baja concentración de urea sanguínea similar a la de los osteictios de agua dulce (Thorson et al., 1967a).

1.1.1.1.3 Clase Osteictios

En conjunto los teleósteos tanto marinos como de agua dulce mantienen una concentración osmótica que se sitúa entre una tercera y una cuarta parte de la del agua de mar. Algunas especies pueden tolerar una amplia gama de salinidades y pasar sin problemas entre el mar, las aguas dulces y las salobres. Tales movimientos están asociados a menudo a su ciclo vital y requieren de profundos cambios en los procesos osmorreguladores.

Los teleósteos marinos son hiposmóticos con respecto al medio marino y pierden agua constantemente a través de las branquias y la orina. Para compensar esta pérdida osmótica de agua estos vertebrados beben cantidades considerables de agua de mar lo que implica que, si por un lado se compensa la cantidad de agua eliminada, por otro se incrementa la cantidad de sales que son absorbidas por el tubo digestivo. La eliminación de los iones sodio y potasio se realiza de forma primaria, mediante transporte activo (House, 1963; Maetz y Campanini, 1966) a través de las branquias y secundariamente a través de la orina, ya que la orina de los teleósteos es normalmente más diluida que los líquidos corporales. Sin embargo, el riñón juega un papel muy importante en la excreción de los iones divalentes de magnesio y sulfato, que constituyen aproximadamente la décima parte de las sales presentes en el agua de mar.

Para los teleósteos de agua dulce las condiciones osmóticas son diferentes ya que las concentraciones osmóticas de su sangre son mucho mayores que las que se encuentran en el agua dulce que los rodea. El problema principal es la entrada osmótica de agua por las branquias, debido a la gran superficie y a la relativamente elevada permeabilidad de las mismas.

El exceso de agua es excretado en forma de orina muy diluida que puede ser producida diariamente en grandes cantidades, de hasta una tercera parte del peso corporal. Aunque la orina es muy diluida el gran volumen excretado supone una pérdida importante de solutos, que deben ser sustituidos. Algunos solutos son ingeridos con el alimento, pero la principal vía de captación se realiza mediante transporte activo a nivel branquial (de Krogh, 1939).

Algunos teleósteos se mueven entre aguas dulces y saladas como parte de su ciclo vital. Tales movimientos entre aguas dulces y saladas implican cambios importantes en los mecanismos osmorreguladores. Así, si una anguila es transferida desde el agua dulce al agua de mar, se produce en ella una pérdida osmótica de agua que alcanza valores del cuatro por ciento del peso corporal en diez horas (Keys, 1933), aunque la ingesta de agua salada permite que se recupere el peso corporal hasta alcanzar un valor estacionario en uno o dos días. Si la anguila es transferida en sentido contrario, desde el agua de mar al agua dulce, aparece una ganancia inicial de peso y un aumento en la formación de orina lo que permite alcanzar el estado estacionario de nuevo en uno o dos días.

Estudios realizados con *Fundulus heteroclitus*, que se adapta fácilmente tanto al agua dulce como al agua de mar, sobre los cambios de permeabilidad para los iones sodio y potasio ponen de manifiesto que la permeabilidad a dichos iones desciende a los pocos minutos de transferir el animal al agua dulce mientras que, aumenta al devolverlo al agua de mar si bien, necesita de varias horas para restablecerse (Potts y Evans, 1967).

Tanto si son responsables la superficie general del cuerpo como si lo son las branquias, los peces adaptados al agua de mar son relativamente permeables a los iones, mientras que los peces adaptados a las aguas dulces son relativamente impermeables (Montais y Maetz, 1965).

1.1.1.1.4 Clase Anfibios

La mayor parte de las especies de anfibios son acuáticas o semiacuáticas y sus puestas son depositadas en el agua. Las larvas de estas especies son animales acuáticos que respiran por branquias hasta el momento de la metamorfosis, en los que la mayoría, cambian a la respiración mediante pulmones. Los anfibios son animales limitados a las aguas dulces y mueren, en pocas horas, si se les coloca en agua de mar.

Con respecto a la regulación osmótica, los anfibios son muy similares a los peces teleósteos, no obstante en el adulto el principal órgano de osmorregulación es la piel. Cuando el animal se encuentra dentro del agua hay una entrada osmótica de agua que es excretada de nuevo en forma de orina muy diluida. La pérdida de iones tanto a partir de la orina diluida como a partir de la piel es equilibrada mediante la captación de sales por medio de mecanismos de transporte activo desde el medio diluido y a través de la piel.

Una excepción a la vida dulceacuícola de los anfibios es la de la *Rana cancrivora* de los manglares costeros del Sudoeste Asiático. El adulto de rana cangrejera para mantener la concentración de sales relativamente baja, característica de los vertebrados, utiliza la estrategia de los elasmobranquios, añadir grandes cantidades de urea a los líquidos corporales (Gordon et al., 1961). En los tiburones, la urea es retenida por una reabsorción activa a nivel de los túbulos renales mientras que, en la rana cangrejera la retención de la urea se consigue primariamente por una retención del volumen de orina cuando la rana está en el agua de mar. Los renacuajos de la rana cangrejera presentan una tolerancia todavía mayor que la de los adultos para las altas salinidades. El mecanismo de regulación osmótica en éstos renacuajos es similar al de los peces teleósteos (Gordon y Tucker, 1965).

Algunos anfibios pueden habitar en medios desérticos, áridos y secos; éstos viven en madrigueras a varios centímetros de profundidad donde estivan durante los largos períodos de sequía. Para mantener el equilibrio de los niveles de hidratación de la sangre y de los tejidos utilizan, como principal reserva de agua, orina almacenada en la vejiga urinaria (Ruibal, 1962).

1.1.1.2 Vertebrados terrestres.

Si bien la ventaja fisiológica más grande de la vida terrestre es la facilidad del acceso al oxígeno, la mayor desventaja fisiológica es la amenaza constante de la deshidratación. En la vida terrestre ni el agua ni los electrolitos pueden obtenerse directamente del medio sino que deben ser adquiridos a través del alimento y la bebida. En los ambientes terrestres más áridos la existencia de agua puede ser nula durante largos períodos, de manera que el animal debe producir mediante su metabolismo toda su agua corporal. Otra posibilidad es que el animal terrestre, con fluidos corporales relativamente diluidos, hace frente a unas condiciones semejantes a las desérticas cuando vuelve, en forma más o menos permanente a las aguas saladas y vive en un ambiente hiperosmótico.

1.1.1.2.1 Clase Reptiles

Una de las características de los reptiles es la de presentar una piel seca y provista de escamas; este hecho haría suponer que difícilmente su piel, en comparación con los anfibios de piel desnuda y húmeda, pueda ser permeable al agua. No obstante, estudios realizados sobre la tasa de evaporación indican que estos animales pierden mayor cantidad de agua a través de la piel seca, del orden del 66 al 88% según las especies, que a través de las vías respiratorias húmedas (Schmidt- Nielsen, 1969).

Existe una marcada correlación entre la cantidad total de agua perdida por evaporación y el hábitat de la especie; cuanto más seco es el ambiente más lenta es la velocidad de evaporación total y menor es la proporción de pérdida a través de la piel.

Además de la pérdida de agua ocurrida mediante la evaporación, se necesita también agua para la formación de orina. Los reptiles excretan principalmente ácido úrico como producto final de su metabolismo proteico, y dado que éste compuesto es altamente insoluble, requiere solamente pequeñas cantidades de agua para su excreción.

Los representantes marinos de los reptiles deben excretar el exceso de sales debido a que el medio en que viven y el alimento que consumen contienen una alta concentración de sales. Como el riñón de los reptiles no puede producir orina que sea más concentrada que los líquidos corporales, el exceso de sales es eliminado por medio de unas glándulas excretoras de la sal. Las glándulas de la sal producen un fluido altamente concentrado que contiene primariamente iones sodio y cloro en concentraciones considerablemente más altas que en el agua de mar. Dichas glándulas, a diferencia del riñón, no funcionan permanentemente sino que excretan sus productos de forma intermitente, cuando la concentración plasmática de sal aumenta.

1.1.1.2.2 Clase Aves y Clase Mamíferos

Tanto en aves como en mamíferos el equilibrio hídrico no sólo está relacionado con el mantenimiento de la regulación osmótica sino que también lo está con la regulación de la temperatura corporal, así utilizan el agua para mantenerse fríos en ambientes cálidos. Aves y mamíferos pueden producir una orina hiperosmótica, con respecto al plasma sanguíneo. En las aves esta capacidad no es muy pronunciada,

puede alcanzar un máximo de dos veces la concentración del plasma, mientras que en los mamíferos se pueden alcanzar valores de hasta veinticinco veces la concentración del plasma sanguíneo (MacMillen y Lee, 1967).

La alta capacidad de concentración osmótica de orina se da en animales de hábitats desérticos, mientras que en los animales que viven ligados a hábitats dulceacuícolas o con abundancia de agua dulce existe una moderada capacidad de concentración (Schmidt-Nielsen y O'Dell, 1961; Schmidt-Nielsen 1964; MacMillen y Lee, 1967).

La mayoría de las aves terrestres y todas las marinas poseen un par de glándulas de la sal que por medio de un conducto conectan con la cavidad nasal. Mientras que en las aves terrestres que poseen glándulas de la sal éstas son pequeñas, en las aves que se alimentan regularmente con una dieta rica en sales o que reciben soluciones salinas para beber, las glándulas de la sal están muy desarrolladas y son de gran tamaño. Dichas glándulas sólo empiezan a segregar y son activas como respuesta a un aumento de la presión osmótica al ingerir agua de mar o alimentos muy salados. El líquido segregado por las glándulas de la sal de las aves, a diferencia de lo que ocurre en los reptiles, tiene una composición relativamente constante con concentraciones altas de iones sodio y cloruro y muy bajas de ion potasio. La proporción entre los dos cationes, sodio y potasio, permanece casi siempre dentro del orden proporcional de 30:1.

Los órdenes de mamíferos marinos, focas, ballenas y manatíes, se alimentan de organismos con un contenido de sales variable, desde peces con un contenido de sales relativamente bajo hasta crustáceos y organismos plantónicos hiperosmóticos con el agua de mar. El riñón de todos estos vertebrados sigue la misma tendencia filogenética que la de los vertebrados terrestres de ambientes áridos, son capaces de producir orina altamente hiperosmótica, en este caso más concentrada que el agua de mar.

1.1.2 Diferencias anatómicas de la nefrona de los mamíferos

Los animales terrestres soportan los déficits hídricos de su ambiente mediante modificaciones especiales de muchos de los mecanismos descubiertos por sus antepasados acuáticos y por evolución de otros pocos nuevos y exclusivamente suyos. Entre los de la primera categoría tenemos la impermeabilización de las cubiertas permeables al agua, la ingestión de agua, la excreción extrarrenal de sales, la reducción de la filtración glomerular y la capacidad del protoplasma para funcionar eficazmente con cantidades relativamente variables de electrolitos y agua. Entre los de la segunda categoría, la de las innovaciones evolutivas, se encuentra la capacidad de recuperar grandes cantidades de agua de la orina (orina hipertónica), el uricotelismo, la capacidad de absorber importantes cantidades de agua a través de sus superficies, la capacidad de poder depender ampliamente del agua metabólica, y la respuesta de su conducta para evitar los microhábitats en desecación.

Algunos representantes de cada uno de los principales grupos animales, desde oligoquetos hasta los mamíferos, se encuentran en hábitats extremadamente áridos en donde la posibilidad de beber agua es rara o inexistente. Los mecanismos especiales que se explotan en los ambientes secos deben ser convenientemente divididos en anatómicos, fisiológicos y relativos al comportamiento.

Una técnica para la conservación del agua de la orina depende de la anatomía renal. La diferencia morfológica más extraordinaria entre la nefrona de mamífero y la de anfibio y reptil es la existencia de una alargada asa en forma de horquilla situada entre el túbulo contorneado proximal y el distal. Esta asa conocida como asa de Henle, consiste en dos ramas paralelas, la rama descendente y la rama ascendente, e interpuesto entre ambas ramas un segmento de menor diámetro denominado segmento delgado. La longitud total de la asa de Henle varía considerablemente según las especies y también según las nefronas dentro de los riñones de una misma

especie. La asa de Henle funciona bombeando activamente sales hacia los espacios intracelulares que se encuentran en las proximidades de los túbulos de la porción más interna del riñón, recuperando agua osmóticamente de los túbulos colectores y haciéndola pasar hacia el fluido salino así formado.

Existe una eficaz relación entre la longitud del asa de Henle y la cantidad de agua que se encuentra a disposición de una determinada especie y está correlacionada con su capacidad para concentrar la orina (Schimdt- Nielsen y O'dell, 1961). El castor de las montañas del género *Aplodontia* posee unas nefronas con asa cortas que producen una concentración urinaria máxima de 600 mOsm; el conejo con una mezcla de asas cortas y largas, puede producir una orina que alcanza dos veces y media esta concentración, mientras que el roedor del desierto del género *Psammomys*, que sólo posee asas de Henle largas produce orina de 6000 mOsm.

Otra diferencia entre el riñón de mamífero y el de anfibio o el de reptil es la disposición muy ordenada de las nefronas y los conductos colectores. Los glomérulos y los túbulos se sitúan hacia la superficie externa del riñón, mientras que las asas de Henle y los conductos colectores se proyectan hacia el interior de la pelvis renal.

En el examen histológico se puede observar como el riñón de los mamíferos consiste en un estrato externo morfológicamente distinto, la corteza, que rodea a uno interno, la médula. La corteza contiene a los corpúsculos renales, los túbulos y los vasos asociados. La médula consta de las asas de Henle y los conductos colectores así como los vasos asociados.

Las nefronas que con su corpúsculo renal se sitúan hacia la superficie externa de la corteza se conocen como nefronas corticales y presentan las asas de Henle relativamente cortas ya que sólo penetran un poco, si lo hacen, en la médula. Las

nefronas con el corpúsculo renal situado muy al interior de la corteza, denominadas como nefronas yuxtaglomerulares, tiene asas de Henle largas que penetran profundamente en la médula.

La médula del riñón suele tener forma aproximada de pirámide, que se proyecta en la pelvis renal como la papila renal. A menudo sólo existe una pirámide y una papila, aunque la médula de algunos mamíferos, entre ellos el hombre, contiene dos o más pirámides que se proyectan en un número igual o menor de papilas. Puesto que la médula está compuesta principalmente de asas de Henle, la prominencia de la papila proporciona información sobre el número relativo y la longitud de las asas largas.

Las especies que habitan medios húmedos o acuáticos carecen de papila o ésta está poco desarrollada. Las especies que viven en ambientes másicos presentan papila, y las especies que habitan en ambientes desérticos presentan papilas desarrolladas al máximo (De Sperber, 1994).

Los mamíferos marinos, también han seguido la tendencia filogenética de los mamíferos que habitan los medios desérticos, desarrollando riñones que excretan orinas fuertemente hiperosmóticas si bien, sus problemas hídricos no son tan extremos como los de los animales desérticos, dado que no experimentan las altas temperaturas, que provocan importantes pérdidas de agua por evaporación.

La capacidad del hombre para tolerar la deshidratación es relativamente limitada. En el desierto no puede tolerar una pérdida de agua corporal equivalente a más del doce por ciento de su peso, sin embargo, el camello puede perder dos veces esta cantidad, lo que equivale aproximadamente a un tercio del agua que posee en su economía, sin debilitarse (Schimdt-Nielsen, 1959).

Algunos roedores del desierto utilizan el agua metabólica. El agua es considerada como un producto secundario de la respiración celular y, en algunas especies, esta agua metabólica se hace cargo de las necesidades totales del animal. El potencial hídrico de los alimentos es variable. Así, cuando se metaboliza un gramo de grasa se producen 1.07 gr de agua en contraste con el catabolismo de un gramo de carbohidrato que produce 0.6 gr de agua y con el de un gramo de proteína que sólo produce 0.4 gr (Schimdt-Nielsen, 1952). Como consecuencia de éste hecho, un aumento del metabolismo de las grasas comporta una disminución de la escasez de agua; a diferencia de las grasas, el metabolismo de las proteínas comporta además de la menor obtención de agua metabólica la producción de residuos que deben ser eliminados en disolución. Los roedores de hábitats desérticos consumen grandes cantidades de semillas grasas lo que les confiere una mayor obtención de agua metabólica; además esta ventaja metabólica se asocia con un eficaz mecanismo de reabsorción renal del agua y un comportamiento tendente a la búsqueda de microclimas húmedos (Chew, 1961). La orina de la rata canguro es aproximadamente dos veces más concentrada que la de la rata de laboratorio y comparativamente tres veces más que la del perro (Hoar, 1976).

Además, junto con el riñón evolucionó la corteza suprarrenal, un tejido regulador, del equilibrio hídrico e iónico. En los mamíferos se reconoce que la aldosterona es el más potente de los esteroides adrenales relacionados con el equilibrio electrolítico. Su acción a nivel del organismo es incrementar la reabsorción tubular de sodio y promover la excreción renal de potasio. Aunque se ha demostrado que varios factores alteran la secreción de esta hormona, el sistema renina-angiotensina constituye el mecanismo dominante en la regulación de los mineralocorticoides en los mamíferos. El sistema renina-angiotensina de los mamíferos se activa mediante cambios en el volumen de fluido o en los electrolitos sanguíneos.

La hormona antidiurética (ADH) es otro factor importante en la regulación de la actividad tubular renal. Varios octapéptidos ligeramente diferentes entre sí, como por ejemplo las vasopresinas y las vasotocinas, procedentes del hipotálamo de los vertebrados, se almacenan en la neurohipófisis y se liberan, de acuerdo con las necesidades, para realizar diferentes funciones una de las cuales es la absorción de agua en el túbulo renal.

En los mamíferos la vasopresina es la hormona antidiurética (ADH). Osmorreceptores localizados en el hipotálamo controlan la liberación de ADH en respuesta a los cambios de presión osmótica del plasma que circula a través de él. En los mamíferos, la ADH actúa incrementando la permeabilidad al agua de los túbulos contorneados distales y de los conductos colectores y en consecuencia, se promueve la recuperación de agua de la orina tubular.

1.2 Morfología evolutiva del riñón de los vertebrados

1.2.1 Primeras etapas embrionarias del sistema urinario

Las unidades urinarias o nefronas de los vertebrados se originan a partir de la cinta mesodérmica intermedia situada entre la capa superior subdividida en somitos (epímero) y la capa inferior más ancha (hipómero) delaminada en somatopleura y esplacnopleura. De este modo, el tejido nefrógeno de la cinta intermedia (mesómero) puede metamerizarse en nefrotomos más o menos separados y constituidos por pequeñas cavidades, nefrocelomas, que se modelan de manera que mantienen la comunicación con la cavidad celómica general, o esplacnoceloma, situada por

debajo, a través de una abertura ciliada en forma de embudo, denominada nefrostoma.

Los nefrotomos constituyen por invaginación una cápsula de pared doble denominada cápsula de Bowman, la cual recibe una arteria que forma un pequeño ovillo en el interior de la cápsula antes de proseguir su camino hacia el sistema venoso cardinal; a partir de la cápsula se forma un túbulo nefrocelostómico (túbulo néfrico) que desemboca en un conducto colector longitudinal (conducto néfrico) el cual a su vez desemboca caudalmente en la cloaca. De acuerdo con esta disposición, la nefrona puede eliminar a la vez los productos residuales procedentes de la sangre, por filtración a través de la cápsula, y los del celoma general por el conducto peritoneal. La cápsula de Bowman junto con los vasos sanguíneos que engloba constituye un conjunto funcional denominado corpúsculo de Malpighi.

Los estudios embriológicos han demostrado que la formación de las unidades néfricas dispuestas segmentariamente se inicia en la región cefálica del organismo y se propaga en dirección caudal (Ooi y Youson, 1977; Youson, 1981; Tisher y Madsen, 1986; Tytler, 1988). Si la totalidad de nefrotomos se desarrollara completamente y fuesen permanentes, tendríamos un sistema excretor segmentario, bilateral, que desembocaría en los conductos colectores longitudinales, localizados dorsalmente, y que recorrería toda la longitud del celoma. De hecho, un sistema renal como éste, que se designa como arquinefros, no existe como tal en los vertebrados actuales aunque puede pensarse que haya sido funcional en formas ancestrales (Fox, 1963) y que a partir de este tipo de riñón pueden haber derivado los diversos riñones de las especies actuales de vertebrados. De esta manera, los túbulos o unidades excretoras más anteriores tienden a desaparecer y a ser reemplazados por unidades más posteriores, las cuales, a su vez, pueden desaparecer para dejar sitio a elementos situados en posición todavía más posterior. Así, el arquinefros no es en realidad más que un esquema teórico que es sustituido por una sucesión de órganos excretores

denominados, en orden cefalocaudal, pronefros y opistonefros en los vertebrados anamniotas, y pronefros, mesonefros y metanefros en los vertebrados amniotas.

El grado en que cada uno de estos diferentes riñones se hace efectivamente funcional depende del grupo de vertebrados que se estudie y no implica que los más evolucionados, que estarán dotados del tipo metanéfrico, pasen primero y sucesivamente por las etapas de pronefros y mesonefros (Tisher y Madsen, 1986).

1.2.2 Filogenia de la nefrona

En general, los productos de excreción de los vertebrados son numerosos y diversos: dióxido de carbono, agua, productos finales nitrogenados, iones inorgánicos y gran variedad de compuestos orgánicos. El individuo debe excretar cada sustancia de manera proporcionada al conjunto de la homeostasis, de forma que en particular la excreción de una sustancia concreta se debe realizar sin afectar excesivamente las reservas de otra sustancia que el individuo tenga.

Las excreciones se expulsan del animal por medio de diferentes estructuras y mecanismos. La mayoría de los animales acuáticos vierten todas sus excreciones al exterior en forma de solución acuosa. El dióxido de carbono y el amoníaco se difunden a través de las membranas de las branquias u otras partes permeables de la superficie corporal. A veces, los iones se excretan activamente de manera extrarrenal, tal como se observa en las branquias de los teleósteos marinos y en las glándulas rectales de los elasmobranquios marinos.

Los órganos renales asumen diversas funciones en los diferentes animales acuáticos. Así, por ejemplo, la función primaria de los riñones de los teleósteos marinos es la excreción de los iones divalentes; la pérdida de agua se reduce al mínimo y, en rigor,

los desechos nitrogenados no se eliminan con la orina. Por el contrario, los riñones de los teleósteos de agua dulce cumplen la tarea de excretar el exceso de agua y evacuan algunos desechos nitrogenados con la orina.

Los animales terrestres y los acuáticos de respiración aérea excretan ciertos desechos en forma gaseosa hacia el aire mientras que otros son eliminados en solución acuosa. Obviamente, la posibilidad de evacuar una sustancia en el aire depende de si ésta existe como gas a temperatura fisiológica aunque como la mayoría de las excreciones no cumplen esta característica deben ser evacuadas en disolución por los órganos renales, o por otras estructuras capaces de producir disoluciones acuosas.

De acuerdo con las características anteriores, se puede deducir que la función excretora de la nefrona está muy relacionada con el medio de vida de las distintas clases de vertebrados y este hecho ha condicionado la evolución de la nefrona en los vertebrados. Según esto, siguiendo una filogenia hipotética, basada en la observación de las estructuras urinarias de formas embrionarias y adultas de los vertebrados actuales, se puede partir del concepto de que la nefrona original era aglomerular. Desde el esplacnoceloma los líquidos sobrantes podían pasar al nefroceloma y de aquí al exterior a través del túbulo nefrocelostómico y el conducto colector. Sin embargo como la posibilidad de filtraje osmótico o de selectividad en un sistema tal debió ser casi nulo, pronto sería sustituido por la extracción de los materiales de deshecho a partir de la sangre. La estructura glomerular debió hacer de esta manera su aparición pegada a la pared del nefroceloma, surgiendo en la parte anterior de éste, que permanecería ampliamente abierto sobre el esplacnoceloma adyacente. De esta manera, se podría realizar una filtración hacia los espacios del esplacnoceloma y del nefroceloma adyacente a partir de los capilares arteriales. Es lo que, en las formas actuales, conocemos como glomérulo externo, sin que sea posible decir si esta etapa tuvo una duración significativa en la filogenia. Independientemente de cual sea la

existencia real de formas intermediarias que posean este tipo de estructura, el paso entre el esplacnoceloma y el nefroceloma se redujo al conducto peritoneal y el nefroceloma quedó limitado al espacio interno de la cápsula de Bowman que rodea a la masa de capilares sanguíneos del corpúsculo de Malpighi. De esta manera, se constituyeron un número importante de glomérulos internos netamente separados del esplacnoceloma, los cuales formaron en conjunto un riñón diferenciado. Esta etapa finalizó con la desaparición de los conductos peritoneales y la instauración de la filtración única y exclusivamente a partir de la sangre.

1.2.3 Morfología de las unidades excretoras y de los riñones adultos

1.2.3.1 Anamniotas

1.2.3.1.1 Clase Agnatos

Los dos órdenes de agnatos (Myxinoidea y Petromyzontia) son considerados como los vertebrados actuales más primitivos, no obstante, se presentan entre ambos grupos considerables diferencias tanto morfológicas como fisiológicas y bioquímicas (Stensiò, 1968; Robertson, 1974; Forster y Goldstein, 1979; Janvier, 1981).

Los mixinoideos conservan incluso en la vida adulta la parte anterior del riñón primitivo, es decir, el pronefros o riñón de cabecera o cefálico. En el género *Eptatretus*, los pronefros tienen forma ovoidal y están situados a ambos lados del esófago, invadiendo el celoma pericárdico; estos pronefros están en comunicación por una parte con la cavidad pericárdica a través de numerosos conductillos, y por otra con los conductos excretores longitudinales (conducto pronéfrico) a través de diversos túbulos pronéfricos. Sin embargo, estos últimos están obturados localmente

y han degenerado. Se supone que, en el animal adulto, la principal función de estos pronefros es más bien fagocitaria que excretora (Pirlot, 1976). En el género *Myxine* los túbulos ni siquiera alcanzan el conducto longitudinal (Holmgren, 1950). En posición más caudal al pronefros existe un segundo riñón, denominado opistonefros, constituido por un cierto número de elementos de Malpighi (30-40 corpúsculos) dispuestos de forma segmentaria, los cuales descargan en el conducto excretor longitudinal, conducto néfrico originario, por medio de una serie de túbulos (Heath-Eves y Mcmillan, 1974). Los conductos peritoneales han desaparecido totalmente en el opistonefros (Fänge, 1963). Independientemente de la segmentación, éste es ya esencialmente un órgano excretor de vertebrado típico ya que desempeña sus funciones exclusivamente a partir del glomérulo de capilares sanguíneos. El glomérulo recibe sangre arterial de la aorta dorsal y es drenado por la vena cardinal posterior (Heath-Eves y McMillan, 1974). El conducto excretor a nivel del opistonefros recibe el nombre de conducto arquinéfrico, lo que recuerda su origen teórico, y como sinónimo se le denomina, conducto de Wolff.

En diversos géneros de lampreas (*Lampetra*, *Entosphenus* y *Petromyzon*) se desarrolla un pronefros provisional formado por algunos túbulos en posición muy anterior, cerca de la región branquial. La porción pronéfrica del conducto arquinéfrico se prolonga hacia la parte posterior hasta el peritoneo celómico donde aparecerá, con la metamorfosis, el opistonefros, al mismo tiempo que degenerará el pronefros cefálico. En el adulto existe ya un opistonefros típico que se encuentra suspendido en el esplanoceloma y descarga en el conducto colector longitudinal. Los dos conductos colectores longitudinales, derecho e izquierdo, discurren por separado a lo largo del borde libre del órgano uniéndose, en la porción más posterior, para desembocar en un seno medial que, a su vez, se abre al exterior por una papila urogenital situada por detrás del ano. En las lampreas ya no existe correspondencia simétrica entre nefronas y segmentación ya que el número de elementos de Malpighi

es superior al de los segmentos corporales correspondientes a la longitud del opistonefros (Youson y McMillan, 1970; Youson y Ooi, 1979; Youson, 1981).

1.2.3.1.2 Clase Condrictios

En los elasmobranquios, el pronefros no llega a desarrollarse, en especial en aquellas especies que carecen de formas larvarias, siendo el riñón en los adultos del tipo opistonefros. Como consecuencia de la continua formación de nuevas nefronas el opistonefros es extremadamente largo. Este hecho permite observar una gran variabilidad, tanto en el tamaño de los corpúsculos renales como en el grado de diferenciación de los mismos, en relación con la edad del individuo (Hentschel, 1987; Hentschel, 1988). Así, el opistonefros definitivo se extiende desde el tabique postcardiaco hasta la región de la cloaca, con sólo conductos peritoneales funcionales en algunos individuos jóvenes. Las nefronas, muy numerosas, degeneran en la porción más anterior del opistonefros quedando únicamente la porción más posterior como funcional.

1.2.3.1.3 Clase Osteictios

De forma general, los riñones de los peces óseos varían considerablemente entre grupos, tanto en el tipo como en el tamaño de los mismos (Nash, 1931).

En los osteictios el pronefros degenera muy pronto pudiendo desaparecer totalmente. En ciertas especies el pronefros es funcional únicamente durante la fase larvaria, mientras que en otras conserva una cierta actividad durante toda la vida adulta (Tytler, 1988)

En general los peces óseos presentan un opistonefros típico que se desarrolla dando lugar a nefronas primarias segmentarias más o menos ordenadas. Posteriormente, la

segmentación primitiva desaparece debido a la formación de túbulos secundarios muy numerosos. Cuando la porción anterior del opistonefros degenera de manera más o menos completa, transformándose en un órgano linfoide de volumen variable, la función excretora recae en los túbulos de la porción posterior.

En los peces de agua dulce los glomérulos son voluminosos, seguidos de túbulos más o menos contorneados de longitud variable con una porción proximal ancha y una distal estrecha. En el caso de los teleósteos marinos, los glomérulos son muy reducidos o no existen (riñones aglomerulares).

1.2.3.1.4 Clase Anfibios

El riñón de tipo pronéfrico aparece únicamente en las formas larvarias de las cecilias, disponiéndose de forma metamérica tanto los túbulos renales como los corpúsculos renales y los nefrostomas (conductos peritoneales); en los adultos de este grupo de anfibios, el riñón es de tipo opistonéfrico, segmentado y muy alargado, extendiéndose a lo largo de la mayor parte del celoma.

En los urodelos, el opistonefros es muy parecido al que presentan los elasmobranquios. Consta de dos regiones: un segmento cefálico relativamente corto y estrecho, el riñón torácico, y un segmento caudal alargado y ancho que constituye la parte principal del opistonefros, riñón pélvico.

En los machos la porción cefálica tiene funciones más vinculadas a las genitales que a las urinarias. El conducto opistonéfrico discurre paralelamente al borde lateral del opistonefros y a poca distancia de éste. Los túbulos colectores, menos desarrollados en las hembras que en los machos, desembocan directamente en el conducto opistonéfrico mientras que en los machos sólo lo hacen directamente los de la

porción cefálica. Los de la porción caudal, primero, se reúnen en una especie de uréter y posteriormente lo hacen con el conducto opistonéfrico cerca de la cloaca.

Los riñones opistonéfricos de los anuros no presentan la diferenciación en dos regiones de los urodelos; en éstos el riñón es un órgano alargado, compacto y deprimido dorso-ventralmente.

En los machos la porción más anterior ha perdido los glomérulos mientras que los túbulos colectores que conectan con ella se han modificado en conductos de evacuación del esperma; de esta forma el riñón y el conducto opistonéfrico de los machos tiene doble función, genital y excretora a la vez. En el género *Alytes* los conductos eferentes testiculares se abren directamente en el conducto opistonéfrico sin pasar por tanto por el riñón.

El conducto opistonéfrico está localizado dentro del riñón a lo largo de su margen lateral y sale de éste cerca del extremo posterior para desembocar en la cloaca.

En los anfibios en general, la irrigación del riñón es doble y se corresponde con la de los peces óseos, es decir, la arteria renal forma los glomérulos y realiza función exclusivamente excretora, mientras que el sistema porta renal venoso forma una red capilar alrededor de los túbulos renales y se encarga de la reabsorción. Esta última red capilar desemboca en la vena renal que va hasta la vena cava posterior.

1.2.3.2 Amniotas

En los reptiles, aves y mamíferos se suelen distinguir tres tipos de riñones: pronefros, mesonefros y metanefros, en vez del pronefros-opistonefros de los anamniotas. En los primeros, los tres tipos de riñones van apareciendo sucesivamente durante el desarrollo embrionario, pero sólo perdura el metanefros, que es el que da lugar al

riñón adulto. Así, en todos los amniotas aparece, durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario un pronefros metamerizado que se desarrolla con una sucesión anteroposterior o cefalocaudal. Este pronefros pronto degenera y se desarrolla el mesonefros en una región más caudal; no obstante, el conducto pronefrico perdura y se transforma en el conducto del mesonefros (conducto mesonéfrico o de Wolff).

El pronefros sólo es funcional, en algún grupo de reptiles (tortugas y cocodrilos) y únicamente durante un corto periodo de tiempo. En el resto de grupos es puramente vestigial.

En el caso de aves y mamíferos, el pronefros es menos significativo que en los reptiles; en éstos una masa mesonéfrica única reemplaza rápidamente a los segmentos pronefricos apenas esbozados.

El mesonefros en general es una estructura bastante voluminosa que ocupa temporalmente una gran parte de la cavidad del cuerpo. Se desarrolla en posición caudal al pronefros, pudiendo existir o no un espacio entre ellos. Los túbulos mesonéfricos son segmentarios, en algunos casos con más de uno por segmento, pudiendo existir a veces glomérulos (reptiles). Durante el tiempo que el mesonefros permanece activo, el conducto mesonéfrico o de Wolff sirve como conducto urinario, pero tan pronto como el metanefros comienza a funcionar, dicho conducto degenera en la hembra, aunque persiste en el macho. Los restos de mesonefros, que quedan después que ha degenerado la parte principal, pasan a formar parte del sistema reproductor.

Entre los amniotas en los cuales el mesonefros tiene una larga duración hay que citar, junto con los reptiles, a algunos monotremas y marsupiales que lo conservan hasta después del nacimiento.

El metanefros surge en posición caudal al mesonefros de ambos lados. Es un órgano más compacto que éste, y deriva de un nivel que corresponde a la porción caudal del opistonefros de los anamniotas.

El metanefros se compone esencialmente de las mismas partes que el mesonefros y contiene corpúsculos renales, túbulos excretores y conductos colectores. No existen ya nefrostomas. Las estructuras tubulares del metanefros tienen origen doble: en el extremo posterior del conducto mesonéfrico se forma un divertículo (o yema ureteral) que se prolonga hacia el interior del llamado blastema metanéfrico (tejido metanefrogénico), de localización caudal al mesonefros. El blastema es continuo con el tejido nefrógeno, del que se derivan los túbulos mesonéfricos.

El divertículo del conducto mesonéfrico está destinado a formar el uréter y la porción colectora del riñón, para lo cual la yema uretérica se ramifica reiteradamente, dando lugar a un gran número de conductos colectores. En el punto donde la yema experimenta sus primeras divisiones se puede observar, al menos en los mamíferos, una región ensanchada que dará lugar a la pelvis renal.

En el mesénquima del blastema se forman unas condensaciones celulares, las cuales pronto darán lugar a los túbulos excretores, que adoptan una forma de S.

Cada túbulo excretor comunica por un extremo con un túbulo colector, y por el otro, la porción en forma de S del túbulo, se ensancha y es invadida en el seno de la S por una madeja glomerular derivada de una delgada rama de la arteria renal, formándose de este modo un corpúsculo renal típico.

El metanefros funciona de manera similar al mesonefros. Los productos de excreción que salen de los riñones pasan por los uréteres directamente hasta la cloaca o a la vejiga urinaria, según los casos.

Las tres clases de amniotas, reptiles, aves y mamíferos, presentan algunas variaciones en lo que podríamos denominar esquema general del metanefros.

1.2.3.2.1 Clase Reptiles

El riñón adulto de los reptiles es compacto pero lobulado y a veces tiene la superficie rugosa o plisada. El número de lóbulos es variable igual que la longitud del riñón, pudiendo ser muy largo, como en el caso de los ofidios, o más corto y ancho como en los quelonios. Puede existir una disimetría acentuada tanto en la posición como en la forma de ambos riñones, de manera que uno de ellos esté en situación mucho más anterior que el otro; la divergencia es máxima en las serpientes y lagartos ápodos que, en correlación con la forma del cuerpo, poseen riñones muy estrechos, largos y lobulados y situados uno completamente en posición caudal con respecto al otro. Los dos riñones pueden estar también fusionados posteriormente.

La disposición de las nefronas, de las que hay unas 2.000 en los riñones de los gecos y hasta unas 15.000 en algunos vipéridos, puede ser de dos tipos según los grupos reptilianos: serial o radial.

En la disposición serial, que es la que existe en los riñones de lagartos y cocodrilos, los lóbulos del riñón se agrupan en serie alrededor del uréter de cada lóbulo. Independientemente y de forma paralela entre sí, un conducto colector descarga directamente su orina en el uréter. Paralela al uréter transcurre la arteria renal, que emite ramificaciones en cada lóbulo.

En la disposición radial los lóbulos se agrupan alrededor de una pelvis renal central. La arteria renal forma una red esférica de vasos que divide el tejido renal en una parte cortical y una medular. En la parte cortical se encuentran los glomérulos,

mientras que en la parte medular se sitúan principalmente los conductos colectores que irradian del centro de la pelvis renal.

En las tortugas y en muchos lagartos, frente a la desembocadura del uréter hay una vejiga urinaria, bien desarrollada y generalmente bilobulada, que se abre en la cloaca. Los uréteres desembocan independientemente en la cloaca, excepto en los quelonios, en los que están en comunicación con la vejiga. En los cocodrilos, anfisbénidos, serpientes y varanos no existe vejiga urinaria.

1.2.3.2 Clase Aves

Las aves presentan metanefros relativamente voluminosos, situados en la porción caudal de la cavidad del cuerpo y a menudo fusionados por la parte posterior. Cada riñón, con 20.000 a 30.000 glomérulos, es una estructura bi o trilobulada con un uréter corto que desemboca en la porción media de la cloaca.

Excepto en los avestruces, las aves carecen de vejiga urinaria, y los productos de excreción son eliminados junto con las heces por la cloaca.

La irrigación sanguínea del riñón tanto en las aves como en los reptiles bajo un esquema general es doble, es decir, los glomérulos están constituidos por apilamientos de capilares arteriales mientras que los túbulos contorneados son irrigados por las venas del sistema portarrenal, tal como ocurre en los vertebrados de clases anteriores.

1.2.3.3 Clase Mamíferos

Exteriormente, el riñón metanéfrico típico de los mamíferos es un órgano compacto, liso y con forma de semilla de judía aunque en la vida fetal, presenta una cierta

lobulación de la que algunas especies conservan restos en el estado adulto (proboscídeos, pinnípedos, cetáceos, etc.).

La posición de los riñones es retroperitoneal, encontrándose los riñones unidos a la pared dorsal del cuerpo. El riñón derecho se encuentra, muy a menudo, situado un poco más cranealmente que el izquierdo (Latimer y Sawin, 1961).

El número de glomérulos en cada riñón puede variar desde algunos millares en los pequeños mamíferos (30.000 en la rata, 180.000 en el gato, 200.000 en el conejo) hasta más de un millón en mamíferos de mayor tamaño (1-2.000.000 en el hombre, 8.000.000 en el buey y 150.000.000 en el elefante) (Vintrup, 1928; Kunkel, 1930; Smith, 1951).

El riñón está rodeado por una cápsula de tejido conjuntivo, debajo de la que se encuentra la masa renal diferenciada en una zona cortical y una medular.

Las nefronas con los glomérulos y las porciones contorneadas de los túbulos colectores (túbulo contorneado proximal) se encuentran en la zona cortical. Cada túbulo contorneado proximal se continúa, en la zona medular, por medio de un túbulo no contorneado, formado por una rama descendente y una ascendente, que le dan aspecto de U y a la cual se denomina asa de Henle. La rama ascendente acaba en las proximidades del glomérulo y a partir de aquí se continúa por un túbulo contorneado distal situado en la zona cortical. Estos túbulos desembocan en los túbulos colectores, que se hallan en la zona medular y que convergen en una o varias masas piramidales, pirámides renales, a través de las cuales la orina pasa a los cálices renales, los cuales se reúnen y se abren en la pelvis renal. Ésta se continúa por medio del uréter, que desemboca en la vejiga (o en la cloaca en el caso de los monotremas) donde la orina se almacena temporalmente y sale al exterior a través de la uretra.

A pesar de la configuración uniforme de las nefronas, los riñones de los mamíferos presentan una gran diversidad en cuanto a la división externa e interna. Así, existen riñones monopiramidales (marsupiales, insectívoros, roedores), pluripiramidales o compuestos (quirópteros, primates, desdentados), riñones cuyos túbulos colectores desembocan en un borde continuo, riñones con renículos, en los que la pelvis renal muy ramificada toma contacto con un gran número de pequeños riñones (proboscídeos y muchos perisodáctilos) y riñones en fosa, en los que el sistema colector desemboca directamente en un conducto de lumen amplio de la pelvis renal, sin la formación de papilas.

1.2.4 Organización citológica del corpúsculo renal

En contraste con la diversidad de tipos de nefronas que se encuentran en los distintos tipos de vertebrados, la organización histológica y celular del corpúsculo renal, como unidad de filtración, es en todos ellos muy similar.

Cada corpúsculo renal está formado por una serie de capilares anastomosados y por sus células de sostén, que se han desarrollado dentro de una cápsula de paredes dobles (cápsula de Bowman) con aspecto semilunar. La pared externa de la cápsula se denomina capa parietal, la interna recibe el nombre de capa visceral o glomerular y el espacio situado entre ambas paredes es el denominado espacio de Bowman.

El epitelio de la pared visceral reviste a los capilares anastomosados encontrándose entre ambos una capa extracelular, la denominada membrana basal glomerular.

En el polo opuesto a la localización de los vasos aferente y eferente, que forman la red capilar intraglomerular (polo vascular), el espacio de Bowman se continúa, a través de la capa parietal, con la luz del resto de la nefrona (polo urinario) por medio

del segmento inicial del túbulo contorneado proximal. La arteriola aferente, después de penetrar por el polo vascular, se divide en tres a seis ramas primarias, cada una de las cuales se transforma en una red de capilares anastomosados cuyas asas aparecen unidas entre sí por unas denominadas células mesangiales. De esta forma cuatro tipos celulares aparecen regularmente en los corpúsculos renales de todos los vertebrados estudiados hasta el momento: las células del epitelio parietal de la cápsula, las células del epitelio visceral de la cápsula, las células endoteliales del glomérulo y las células mesangiales.

1.2.4.1 Células del epitelio parietal de la cápsula de Bowman

La capa parietal del glomérulo está formada por un epitelio monoestratificado de células escamosas poligonales cuya porción nuclear hace protrusión hacia el espacio de Bowman. Estas células descansan sobre una gruesa lámina basal que en algunos casos parece multilaminada, la cual aparece anclada por medio de densos haces de microfilamentos intracelulares que se comunican con haces de filamentos de la membrana basal (Mbassa et al., 1988).

1.2.4.2 Células del epitelio visceral de la cápsula de Bowman

Este epitelio envuelve estrechamente a toda la red de capilares glomerulares y está formado por células de gran tamaño denominadas a menudo como podocitos. Así, el concepto de podocitos corresponde a las células epiteliales de la capa visceral de la cápsula de Bowman. Estas células tienen una forma complicada al presentar largas prolongaciones basales primarias, de hasta 30 micras de longitud, llamadas ramas o trabéculas. Estas ramas o trabéculas a su vez se ramifican en prolongaciones secundarias y terciarias. Estos tres tipos de prolongaciones se ramifican formando finas prolongaciones terminales en forma de clava, los pedicelos, que se interdigitan de forma complicada con otros similares de las células adyacentes (Arakawa, 1970).

Los pedicelos forman una capa junto a su lámina basal, la denominada membrana basal glomerular. Esta complicada interdigitación origina la formación de estrechas ranuras entre los pedicelos. Mediante microscopía electrónica se ha puesto de manifiesto que estas ranuras parecen estar cubiertas por una fina capa de material denso a los electrones a la que se conoce como membrana de las ranuras de filtración o diafragma de hendidura, más delgada que una típica membrana celular. En glomérulos humanos, de rata y de ratón estas membranas presentan una estructura compleja semejante a la de los diafragmas de la membrana nuclear y a la de los poros de los capilares fenestrados (Rodewald y Karnovsky, 1974).

Los podocitos contienen núcleos grandes y de formas irregulares así como también abundantes orgánulos de secreción de proteínas, numerosos filamentos finos y microtúbulos.

Sobre la membrana celular del podocito aparece una cubierta celular de espesor aproximado a 120 Å formada por mucopolisacáridos que contienen ácido siálico (Rambourg y Leblond, 1967). Se ha observado disminución de esta cubierta celular en pacientes con proteinuria o glomerulonefritis (Blau y Haas, 1973). La perfusión vascular de policones en ratas para neutralizar la carga iónica de la cubierta sialoproteica causa la pérdida de las prolongaciones pediculadas similar a la observada en los seres humanos con proteinuria (Seiler et al., 1975).

La estructura basal, denominada membrana basal glomerular, sobre la que se apoyan los pedicelos es gruesa, con un espesor medio de aproximadamente 320-340 nm en humanos adultos (Jorgensen, 1966), más delgada en niños muy pequeños y en la mayoría de los animales de experimentación. La membrana basal glomerular se tiñe con el ácido peryódico de Schiff (PAS). Contiene colágeno de tipo IV y proteoglicanos ricos en heparán sulfato. En la zona de unión con las células epiteliales y endoteliales hay, además, componentes que contienen ácido siálico y

son sensibles a las neuraminidasas. Estas moléculas establecen relaciones con los filamentos finos que emergen de la membrana basal glomerular (Kanwar y Farquhar, 1980).

La membrana basal glomerular se describe como formada por tres capas: una central electrónicamente densa y dos menos densas, o claras, una a cada lado de la central, y adyacentes a los podocitos y al endotelio capilar respectivamente.

1.2.4.3 Células endoteliales del glomérulo

Los capilares intraglomerulares se encuentran revestidos por una serie de células endoteliales fenestradas extremadamente delgadas, excepto en la región del tallo del capilar, con núcleos prominentes cuyo abultamiento se introduce en el lumen del capilar.

Las fenestraciones que se distribuyen de forma regular, difieren de las que se encuentran en el endotelio fenestrado de los capilares peritubulares de la nefrona y de las que se encuentran en otras regiones del cuerpo, ya que los poros son de forma más irregular y presentan un tamaño mayor (40-130 nm de diámetro) tanto en mamíferos (Tisher y Madsen, 1986; Bachmann et al., 1988) como en reptiles (Peek y McMillan, 1979), anfibios (Welsch y Storch, 1973; Sakai et al., 1988a y b), teleosteos (Elger y Hentschel, 1981) y elasmobranquios (Bargmann y von Hehn 1971; Lacy et al., 1987). Las fenestraciones son raras en los peces de los géneros *Myxine* (Heath-Eves y McMillan, 1974; Kühn et al., 1975), *Gasterosteus* y *Spinachia* (Wendelaar, 1973; Hentschel, 1977; de Ruiter, 1981).

Aunque en los endotelios fenestrados los poros están habitualmente cubiertos por un diafragma, tanto en los riñones adultos de mamífero (Kriz y Kaisslin, 1985; Bachmann et al., 1988) como en diversos géneros de otros grupos de vertebrados

(Bulger y Trump, 1968; Welsch y Storch, 1973; Elger y Hentschel, 1981; Gray y Brown, 1987), los poros permanecen totalmente abiertos. No obstante, también en algunos géneros de peces como es el caso de *Raja* (Lacy et al., 1987), *Gasterosteus* (Wendelaar, 1973; de Ruiters, 1981), *Sparus* (Zuasti et al., 1983) y *Typhlonectes* (Sakai et al., 1988a y b) se ha podido observar que en algunos o en todos los poros aparece un fino diafragma.

Sobre el endotelio, en mamíferos, se ha demostrado la existencia de una fina capa de glucocalix (Karnovsky, 1979), que también se ha puesto de manifiesto mediante la tinción de Azul Alcian en los peces del género *Carassius* (Elger et al., 1984).

1.2.4.4 Células mesangiales intraglomerulares

La región mesangial o del tallo del ovillo capilar está formada por las células mesangiales intraglomerulares y la matriz extracelular en la que están incluidas.

Zimmermann en 1933 fue el primero en introducir el concepto de mesangio para denominar la estructura que une las asas capilares de forma similar a como lo hace el mesenterio al intestino o los pericitos adyacentes a los vasos de otras partes del organismo.

La membrana basal glomerular en contacto con el capilar sólo forma una parte de la circunferencia vascular de manera que en la cara de los vasos orientada hacia el interior del ovillo capilar glomerular, la membrana basal se refleja sobre el capilar vecino, y la parte del primer capilar no cubierta por ella está ocupada por las células del mesangio, las cuales tienen un cierto parecido con las células epiteliales. Las células mesangiales son células de origen mesodérmico que contienen un pequeño núcleo, que se tiñe intensamente, y numerosas y largas prolongaciones citoplasmáticas distribuidas periféricamente. Algunas de estas prolongaciones

parecen atravesar la matriz que rodea la célula, y que ellas mismas producen, alcanzando y atravesando a su vez al endotelio y penetrando en el lumen capilar. La función de estas prolongaciones celulares mesangiales se desconoce (Bulger, 1986).

Algunos autores han puesto de manifiesto que las células mesangiales pueden contraerse cuando son estimuladas con angiotensina, produciendo de este modo una disminución del flujo capilar (Ausiello et al., 1979) mientras que otros les han conferido propiedades de sostén de los capilares y funciones contráctiles y fagocitarias en mamíferos (Kriz y Kaissling, 1985; Tisher y Madsen, 1986) y lampreas (Youson, 1981); de tal forma que, las células mesangiales tienen en apariencia la función de depurar la membrana basal de las grandes proteínas que han quedado alojadas durante la filtración.

La matriz mesangial aparece como una sustancia amorfa con menor densidad a los electrones que la lámina densa correspondiente a la membrana basal glomerular de forma que parece ser continua con la lámina clara interna de la misma. La región mesangial intraglomerular se continúa con la región mesangial extraglomerular.

1.3 Matriz extracelular

De manera general, todas las células de los organismos pluricelulares se encuentran revestidas extracelularmente por un entramado de macromoléculas. No obstante, los diferentes tejidos presentan grandes diferencias en relación a la cantidad de sustancia extracelular, así los tejidos conjuntivos o conectivos son definidos como aquellos formados por diversos tipos celulares siendo su característica más importante el que éstos están separados por abundante material extracelular constituido éste por sustancia fundamental amorfa y fibras con funciones de sostén,

relleno, defensa y nutrición (Junqueira y Carneiro, 1973). A diferencia de los tejidos conjuntivos, los tejidos epiteliales se han considerado clásicamente formados por células rodeadas por escasa sustancia intersticial. A esta escasa sustancia de revestimiento celular se la denominó como glucocalix (Junqueira y Carneiro, 1973). Actualmente los términos de sustancia intersticial, sustancia fundamental amorfa y glucocalix se han agrupado bajo el nombre de matriz extracelular (Engel y Furthmayr, 1987).

La matriz extracelular, además de actuar como substancia de unión intercelular, también forma estructuras altamente especializadas como el cartílago, los tendones, los huesos, los dientes y las láminas basales .

Son las propias células las que de forma local y directamente segregan las macromoléculas que estructuran la matriz extracelular, de manera que la matriz extracelular y las células que la segregan quedan en contacto directo. También, podemos definir a las láminas basales como la primera matriz extracelular que aparece durante la embriogénesis y que en los tejidos adultos desempeña funciones de matriz extracelular especializada, de 20-300 nm de espesor.

Las láminas basales, en contacto directo con las células pueden rodearlas completamente de forma individual (células musculares, adiposas y de Schwann) o separarlas como un conjunto en forma de capa polarizada del estroma adyacente (epitelio, endotelio) (revisado por Paulsson, 1992; Rohrbach y Timpl, 1993).

En la actualidad, se sabe que la matriz extracelular no sólo actúa como una simple sustancia de unión intercelular sino que también desempeña funciones mucho más activas como son las relacionadas con el desarrollo, la migración, la proliferación y la diferenciación y polaridad de las células con las cuales contacta así como también actúa como barrera que regula la filtración de macromoléculas y la penetración de

células con la actividad metabólica de las mismas (Gospodarowicz et al., 1980; Hay, 1981; Alberts et al., 1983; Krug et al., 1987; Bernfield, 1989; Timpl, 1989; Couchman y Woods, 1993; Aumailley y Krieg, 1996 Timpl, 1996; Aumailley y Gayraud, 1998). Estos hechos han motivado que se hayan realizado numerosos estudios, en distintos tejidos y órganos, sobre la localización y distribución de las macromoléculas que componen las matrices extracelulares en general y de las láminas basales en particular como formas especializadas de las primeras.

1.3.1 Componentes mayoritarios de la matriz extracelular

Las matrices extracelulares en general y las láminas basales en particular presentan composición química y estructura que varía de forma específica según el tejido, del mismo modo dentro de un mismo tejido pueden variar dependiendo de los diferentes periodos del desarrollo y la reparación celular. No obstante, entre las principales macromoléculas que constituyen las matrices extracelulares en general se encuentran las proteínas (colágeno tipo IV como mayoritaria), los proteoglicanos (agrin, perlecán, colágeno tipo XVIII) y las glicoproteínas (entactín/nidógeno, fibronectina y laminina) así como otros componentes minoritarios, que interactúan con los mayoritarios, como el BM40/Sparc/osteonectin, el fibulín-1 y el fibulín-2 (Hay, 1981; Hynda et al., 1981; Hynes y Yamada, 1982; Alberts et al., 1983; Timpl et al., 1983; Vartio, 1983; Kleinman et al., 1984; Hynes, 1985; Ruoslahti et al., 1985; von der Mark y Köhl, 1985; Ekblom et al., 1986; Osawa, 1986; Parry et al., 1987; Martin et al., 1988; McDonald, 1988; Timpl, 1989; Timpl y Aumailley, 1989; Mercier y Ekindjian, 1990; Weber, 1992; Aumailley, 1995; Erickson y Couchman, 2000; Miosge, 2001).

1.3.1.1 Colágeno tipo IV

Por definición, todos los polipéptidos colagénicos se caracterizan por presentar secuencias repetitivas de glicina unida a dos aminoácidos más (Gly-X-Y); esta secuencia repetitiva confiere a la cadena polipeptídica alfa de colágeno una estructura helicoidal rígida e inestable que adquiere un mayor grado de estabilidad por la formación de asociaciones de tres cadenas alfa que conforman a la molécula de colágeno. Los colágenos clasificados como fibrilares contienen secuencias ininterrumpidas de Gly-X-Y a lo largo de toda su molécula; este grupo incluye a los colágenos tipo I, II, III, V y XI. Los colágenos no fibrilares presentan interrupciones entre las secuencias de Gly-X-Y, creándose regiones moleculares flexibles; a este grupo pertenecen los colágenos de tipo IV, VI, VII-X y XII-XIX.

El componente básico de las matrices extracelulares estructuradas en forma de red la establecen las moléculas de colágeno tipo IV (Timpl, 1989; Hudson et al., 1993).

Este colágeno se caracteriza por presentar una secuencia colagénica larga, de aproximadamente 1400 residuos, interrumpida por secuencias cortas no colagénicas y por contener dos secuencias no colagénicas terminales de aproximadamente 15 residuos en el extremo amino terminal y de 230 residuos en el extremo carboxílico terminal con 12 cisteínas (dominio NC1). Cada cadena es extensivamente glicosilada con aproximadamente 50 unidades disacáridas unidas a hidroxilisina en el dominio colagénico y una unidad oligosacárida unida a asparagina cerca del extremo amino terminal (Spiro, 1967; Dion y Myers, 1987; Langeveld et al., 1991; Nayak y Spiro, 1991; Mariyama et al., 1992).

Se han descrito seis isoformas, altamente homólogas, de la cadena alfa para los colágenos de tipo IV, estableciéndose con ellas dos grupos: uno en el que se incluyen las cadenas parecidas a alfa 1 (IV) (alfa 1 (IV), alfa 3 (IV) y alfa 5 (IV)) y otro donde

se incluyen las cadenas parecidas a alfa 2 (IV) (alfa 2 (IV), alfa 4 (IV) y alfa 6 (IV)); de las cuales han sido descritas las secuencias completas de las cadenas alfa 1 (IV) y alfa 2 (IV) humanas y de ratón, la alfa 5 (IV) y la alfa 6 (IV) humanas y aproximadamente un tercio de la secuencia alfa 3 (IV) y alfa 4 (IV) humanas y bovinas (Blumberg et al., 1987; Brazel et al., 1987; Soininen et al., 1987; Hostikka y Tryggvason, 1988; Guo y Kramer 1989; Saus et al., 1989; Gunwar et al., 1990; Hostikka et al., 1990; Philajaniemi et al., 1990; Morrison et al., 1991; Mariyama et al., 1992; Quinones et al., 1992; Turner et al., 1992; Zhou et al., 1992; Sugimoto et al., 1993; Zhou et al., 1993). La existencia de seis cadenas alfa IV y la combinación de éstas para la formación trimérica de la molécula de colágeno tipo IV hace más complejo el estudio de las funciones estructurales y de asociación a otras moléculas del colágeno tipo IV; no obstante, se ha puesto de manifiesto que se establecen asociaciones supramoleculares ditriméricas y tetratriméricas por formación de puentes disulfuro entre dominios no colagénicos carboxílico terminales (NC1-NC1), amino terminal con amino terminal, hélice con hélice y hélice con NC1 (Timpl et al., 1981; Dion y Myers, 1987; Gunwar et al., 1991; Mariyama et al., 1992).

1.3.1.2 Colágeno tipo XVIII

Dentro de los colágenos no fibrilares se ha establecido una nueva subfamilia, la de los multiplexins, para aquellos colágenos con múltiples dominios en triple hélice e interrupciones (Oh et al., 1994a) donde se incluyen los colágenos tipo XV y XVIII.

Los colágenos tipo XVIII, se caracterizan por ser además de multiplexins por el hecho de que la glicosilación postranscripcional se establece con heparán sulfato, siendo además este colágeno el segundo más abundante y el único considerado como un proteoglicano de heparán sulfato, de las láminas basales (Halfter et al., 1998).

El colágeno tipo XVIII desnaturalizado, presenta un peso molecular de unos 700-1000 kDa, constituido por monómeros de aproximadamente unos 300 kDa, donde la cadena alfa 1 XVIII incluye diez dominios alfa helicoidales separada por 11 regiones no colagénicas (NC). Las dos regiones NC terminales, NC11 en el extremo amino terminal y la NC1 en el extremo carboxílico terminal, contienen aproximadamente 299 residuos aminoacídicos, mientras que el resto de regiones NC contiene sólo entre 10 y 24 residuos de longitud. La secuencia humana de esta cadena fue publicada en 1994 y mostró ser en un 81.6 % idéntica a la de ratón (Oh et al., 1994b; Rehn et al., 1994).

Todas las cadenas alfa XVIII descritas contienen una región común que incluye a los diez dominios colagénicos y a las secuencias de interrupción de los mismos, a las que se unen las secuencias de heparán sulfato, diferenciándose unas de otras por la región amino terminal (Rehn y Pihlajaniemi, 1994; Muragaki et al., 1995; Rehn y Pihlajaniemi, 1995; Rehn et al., 1996; Saarela et al., 1998).

Una característica funcional de las cadenas de colágeno XVIII es la de presentar la secuencia del tripéptido de unión RGD (Arg-Gly-Asp) para las integrinas de membrana (Halfter et al., 1998) además de conservar una región homóloga a la descrita en la glicoproteína trombospondín-1 para la unión con heparina (Rehn y Pihlajaniemi, 1994)

Las distintas moléculas de colágeno tipo XVIII presentan distribución variable según los tejidos así como distintos niveles de expresión y en general con distribución semejante a otros proteoglicanos como el agrín y el perlecán (Halfter et al., 1998).

1.3.1.3 Agrín

El perlecán fue el único gran proteoglicano de heparán sulfato descrito durante muchos años en las láminas basales; a éste se le confirió la función de actuar como molécula de ensamblaje, si bien, estudios posteriores sugieren que esta función no es primordial y/o que otros proteoglicanos de heparán sulfato pueden sustituirlo (Olsen, 1999).

McMahan en 1990, identificó primero el agrín como un polipéptido de 150 kDa que aparecía en los extractos del órgano eléctrico del *Torpedo* (Nitkin et al., 1987). Posteriormente, Tsen y colaboradores en 1995, pusieron de manifiesto la molécula de agrín en cerebro y cuerpo vítreo, como una molécula heterogénea de más de 400 kDa con estructura modular similar a la encontrada en otras proteínas de las matrices extracelulares a las cuales se les unen secuencias de glicosaminoglicanos.

La distribución del agrín muestra niveles bajos en los diferentes tejidos fetales probados, siendo mayoritarios en riñón y pulmón (Groffen et al., 1998a; Raats et al., 1998), pero abundante en los tejidos adultos, en especial en riñón, pulmón y en los capilares cerebrales. Una característica común a las láminas basales renales, pulmonares y neuromusculares junto con el predominio del agrín es que todas estas estructuras histológicas están ensambladas a las láminas basales por dos tipos de células diferentes y además expresan las cadenas de colágeno tipo IV alfa 3, alfa 4, y alfa 5 y la cadena beta 2 de laminina, mientras que la mayor parte de otras láminas basales expresan cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno tipo IV.

El agrín es el principal proteoglicano de heparán sulfato de la membrana basal glomerular (Groffen et al., 1998a, Groffen et al., 1998b), de la cápsula de Bowman y de los túbulos, además las láminas basales vasculares también contienen algo de agrín. Se ha postulado que la función del agrín, además de la de interactuar con las

proteínas de la matriz extracelular, la laminina 1 (Denzer et al., 1997), la laminina 2 (Cotman et al., 1999) y el alfa distroglicán (Gee et al., 1994; Gesemann et al., 1998) es la de estar implicado en la ultrafiltración de carga selectiva (Rosenzweig y Kanwar, 1982).

1.3.1.4 Entactín/Nidógeno

A principios de los años ochenta, dos grupos de investigación pusieron de manifiesto la existencia de una nueva glicoproteína de las láminas basales, la actualmente denominada como entactín o nidógeno. La entactín-1/nidógeno-1, aislada inicialmente de extractos del tumor de ratón EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) y de cultivos celulares (Carlin et al., 1981; Timpl et al., 1983; Paulsson et al., 1986), actúa como promotora de uniones celulares (Chakravarti et al., 1990) y en la angiogénesis (Nicosia et al., 1994) y tiene capacidad para formar complejos con la laminina, el colágeno tipo IV y el perlecán (Ekblom et al., 1994). Posteriormente, Kimura y colaboradores en 1998 describen una nueva molécula, homóloga a la entactín-1/nidógeno-1 denominándola como entactín-2 mientras que el grupo de Timpl y colaboradores también describen una nueva secuencia molecular denominándola como nidógeno-2 (Kohfeldt et al., 1998).

Tanto la entactín/nidógeno-1 como la entactín/nidógeno-2 se caracterizan estructuralmente por presentar tres dominios globulares separados por dos regiones, una como eslabón de unión entre el dominio globular amino terminal (G1) y el dominio globular central (G2) y otra entre el dominio globular central y el dominio globular carboxilo terminal (G3).

La entactín/nidógeno-1 se une con la misma afinidad que la entactín/nidógeno-2 a los colágenos de tipo I y IV y al perlecán pero la entactín/nidógeno-1 presenta una afinidad mucho más alta por la laminina-1 que la entactín/nidógeno-2. Ambas

isoformas, en ratón, presentan la secuencia del tripéptido de unión RGD (Arg-Gly-Asp) para interactuar con las integrinas, en su dominio en barra (Kohfeldt et al., 1998).

La microscopía con doble inmunofluorescencia ha revelado la co-localización de ambas isoformas en el riñón, la piel y los testículos, y más específicamente en riñón las dos isoformas han sido localizadas principalmente en la membrana basal glomerular, en las membranas basales de los túbulos proximales y distales y en la cápsula de Bowmann (Kohfeldt et al., 1998).

1.3.1.5 Fibronectina

La fibronectina primero, fue descrita como una glucoproteína soluble presente en el plasma y otros fluidos corporales, posteriormente fue reconocida en el tejido conjuntivo formando microfibrillas delgadas y en los tejidos epiteliales y endoteliales asociada a las láminas basales de los mismos. Actualmente se define a la fibronectina como una glucoproteína, con un 5% de estructura glucídica, implicada en una gran variedad de propiedades celulares que se presenta básicamente en dos formas, la celular y la plasmática.

Entre las propiedades celulares cabe destacar: la de la adhesión celular, la de conferir morfología y forma espacial a la célula, la de intervenir en la organización del citoesqueleto, la de permitir la migración celular, la de intervenir en la diferenciación celular, en la transformación oncogénica y en la regeneración de los tejidos cancerosos, así como en la fagocitosis y la hemostasis (Ouaisi y Capron, 1985).

La fibronectina como tal, debido a sus diversas localizaciones y funciones, recibió distintos nombres. En 1948, Morrison y colaboradores detectaron una molécula fibrosa en el precipitado que se formaba cuando la sangre precipitaba en frío a la cual

denominaron como *cold-insoluble globulin (CIg)*. En 1973, Hynes describió una proteína asociada a la superficie celular sensible a la digestión proteolítica presente en linajes celulares de fibroblastos normales a la que denominó *large external transformation-sensitive protein (LETS)*. También en la superficie celular y en cultivos de fibroblastos, Ruoslahti y colaboradores en 1973 y Ruoslahti y Vaheeri en 1974 describieron un *surface fibroblast antigen (SFA)* que reaccionaba de forma cruzada con el suero. Con propiedades similares Yamada y Weston en 1974 aislaron la *cell surface protein (CSP)* y Gahmberg y Hakomori en 1973 la *galactoprotein a*; Hogg en 1974 la *L1 band*; Robbins y colaboradores en 1974 las *zeta proteins*; y Pearlstein y Waterfield en 1974 la *band 1*. En 1974, Klebe describió la importancia de una proteína sérica que medía la adhesión de células tripsinizadas a matrices de colágeno; este autor la aisló del suero y la denominó *collagen-dependent cell attachment protein (c-CAP)*. También proteínas séricas opsónicas que facilitaban la fagocitosis por parte de los macrófagos fueron aisladas y denominadas como *anti-gelatin factor (AGF)* (Wolff et al., 1967; Hopper et al., 1976) y como *a₂-SB-opsonic glycoprotein* (Blumenstock et al., 1976). Asimismo, Grinnell y colaboradores en 1977, aislaron del plasma una molécula implicada en la proliferación celular a la que llamaron *cell spreading factor (SF)*. Con anterioridad Kuusela y colaboradores en 1976, acuñaron el nombre de *fibronectin* enfatizando la asociación de la molécula proteica con los fibroblastos y su unión a la fibrina durante la coagulación de la sangre. En 1978, el término *fibronectin* fue adoptado de forma mayoritaria por diversos autores ya que esta proteína se halló en forma fibrosa en la matriz extracelular (del latín *fibra*) unida a numerosas sustancias (del latín *nectere*) (Yamada y Olden, 1978).

Las primeras células en las que se identificó la fibronectina fueron los fibroblastos (Hynes, 1973; Ruoslahti et al., 1973; Ruoslahti y Vaheeri, 1974). También diversos tipos de células epiteliales dieron resultados positivos *in vitro* a la fibronectina. Así, como, también dan resultados positivos las células del hígado y del riñón (Chen et

al., 1977), del intestino (Quaroni et al., 1978) y las membranas amnióticas (Crouch et al., 1978; Alitalo et al., 1980b).

La expresión de la fibronectina por parte de las células epiteliales es particularmente relevante ya que se observa, con frecuencia, la ausencia de esta glucoproteína en células malignas y en muchas de las neoplasias malignas humanas (Yamada et al., 1976; Ali et al., 1977; Ruoslahti et al., 1981a; Hayman et al., 1982).

Otros tipos celulares que también producen fibronectina son los mioblastos (Hynes, 1976; Chen, 1977; Furcht et al., 1978), los condrocitos indiferenciados (Dessau et al., 1978; Hassell et al., 1979), las células de Schwann (Kurkinen y Alitalo, 1979), los macrófagos (Johansson et al., 1979; Alitalo et al., 1980a; van de Water III et al., 1981; Villiger et al., 1981), las células de melanoma (Lloyd et al., 1979) y las células endoteliales (Birdwell et al., 1978; Jaffe y Mosher, 1978; Macarak et al., 1978). Las células de la astrogliá cultivadas *in vitro* también producen fibronectina (Vaheiri et al., 1976), pero *in vivo* no se ha encontrado asociada a ellas (Schachner et al., 1978). Las plaquetas contienen fibronectina (Plow et al., 1979; Zucker et al., 1979) y se anclan y proliferan en superficies cubiertas con esta molécula (Hynes et al., 1978).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha descrito fibronectina en numerosos tejidos humanos adultos (linfáticos, vasos sanguíneos, tracto respiratorio, glándulas, hígado, tracto intestinal, tracto urogenital y riñón, piel y tejido conectivo) (Stenman y Vaheiri, 1978). De tal forma que, en los distintos órganos, la fibronectina sigue la distribución del tejido conectivo laxo, aunque puede formar parte de las láminas basales (Stenman y Vaheiri, 1978; Laurie et al., 1982; Yamada et al., 1984a). Asimismo, ha sido descrita en gran variedad de tejidos embrionarios (Hay, 1981).

La fibronectina, mediante estudios de radioinmunoensayo e inmunofluorescencia, ha sido identificada en una gran variedad de tejidos animales tanto de vertebrados como

de invertebrados; estando claramente presente en: mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, tunicados, equinodermos, crustáceos, anélidos, moluscos y poríferos. Esta distribución filogenética es similar a la del colágeno. En relación con la localización en las distintas clases zoológicas, las moléculas de fibronectina de distintas especies pueden ser reconocidas por un anticuerpo humano anti-fibronectina plasmática, indicando que ciertas características estructurales de esta glucoproteína han sido conservadas a lo largo de la evolución (revisado en: Yamada et al., 1984a; 1984b).

La fibronectina en su forma soluble se encuentra presente en el plasma y fluidos corporales si bien, en el plasma humano se encuentra en menor cantidad (0.3 mg/ml) que en otros fluidos (Mosesson y Umfleet, 1970; Hynes y Yamada, 1982; Yamada et al., 1984a).

La fibronectina plasmática es producida mayoritariamente por los hepatocitos (Voss et al., 1979), aunque también las células endoteliales (Birdwell et al., 1978; Jaffe y Mosher, 1978; Macarak et al., 1978) y los macrófagos (Johansson et al., 1979; Alitalo et al., 1980a; van de Water III et al., 1981; Villiger et al., 1981) pueden contribuir a su producción, dando lugar a su asociación con la circulación sanguínea.

Las funciones de la forma plasmática son poco conocidas. Las múltiples interacciones y actividades biológicas de la fibronectina plasmática sugieren un importante papel en la cicatrización. Puede unirse a otras moléculas de fibronectina, a la fibrina y al colágeno. Estas interacciones pueden ser esenciales para la formación del coágulo de fibrina (Kleinman et al., 1981). En el área de cicatrización la fibronectina ayudaría al mantenimiento de los fibroblastos promoviendo las interacciones célula-matriz y estimulando la producción de matriz extracelular (Foidart et al., 1980). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la fibronectina plasmática puede ser incorporada en las matrices extracelulares de diferentes tejidos y células en cultivo (Hayman y Ruoslahti, 1979). Se ha sugerido que la fibronectina

plasmática sería un reservorio de fibronectina tisular (Oh et al., 1981), lo que parece indicar la existencia de un mecanismo de regulación para el mantenimiento de un equilibrio entre las formas plasmática y tisular de la fibronectina (Ouaissi y Capron, 1985). La formación de la matriz de fibronectina ocurriría mediante un proceso de autoensamblaje de fibrillas de fibronectina preexistentes (Chernousov et al., 1985). También se ha podido observar que moléculas de fibronectina soluble purificada forman agregados insolubles por su unión mediante puentes disulfuro (Mosher y McKeown-Longo, 1985; Mosher et al., 1992).

La fibronectina plasmática y la celular son muy similares, e incluso indistinguibles, por métodos inmunológicos (Ruoslahti y Vaheri, 1975), por su composición de aminoácidos y carbohidratos (Vuento et al., 1977; Yamada et al., 1977), mapas peptídicos (Vuento et al., 1977), movilidad electroforética (Macarak et al., 1978), y propiedades espectrofotométricas (Alexander et al., 1978; 1979). Existen, sin embargo, diferencias evidentes entre ambas como son el que:

- La fibronectina celular es mucho menos soluble y tiene monómeros de peso molecular ligeramente mayor (Yamada et al., 1977; Yamada y Kennedy, 1979).
- La fibronectina celular, al igual que la plasmática, contiene fucosa en su porción glucídica, si bien la forma plasmática contiene menor cantidad (Fukuda y Hakomori, 1979; Ruoslahti et al., 1981b).
- La fibronectina plasmática es 50 veces menos activa que la celular en revertir a las células transformadas a la morfología normal; y 150 veces menos activa en hemoaglutinar eritrocitos fijados (Yamada y Kennedy, 1979).
- Las movilidades electroforéticas de un producto limitado de la proteólisis son distintas entre ambas formas moleculares (Yamada y Kennedy, 1979).
- El anticuerpo monoclonal se une preferencialmente a la fibronectina celular frente a la plasmática (Atherton y Hynes, 1981).
- Presentan al menos tres regiones de diferente tamaño aparente en dominios detectados por electroforesis en geles de SDS (Hayashi y Yamada, 1981).

Todas estas diferencias pueden ser localizadas en regiones estructurales de la molécula, indicando que ninguna fibronectina puede ser generada por la otra por un simple proceso de proteólisis. Diversos estudios muestran que la fibronectina celular y la plasmática son codificadas por un mismo gen existiendo un procesamiento diferencial del ARNm (Schoen et al., 1982; Kornblihtt et al., 1983; Yamada et al., 1984a, 1984b; Gutman y Kornblihtt, 1987).

La fibronectina es sintetizada como un dímero, con monómeros de peso molecular de aproximadamente 220-225 kDa; los dos monómeros se encuentran unidos por dos puentes disulfuro cercanos ambos a los extremos terminales carboxílico de ambas cadenas polipeptídicas (Hynes y Yamada, 1982; Vaheri et al., 1983; Vartio, 1983; Vartio y Vaheri, 1983; Yamada et al., 1984a y 1984b; Hynes, 1985; Ouaisi y Capron, 1985; Petersen et al., 1989; Yamada, 1989; Ann et al 1992; Kar et al., 1993).

Cómo muchas otras proteínas, de la matriz extracelular, incluyendo la tenascina, la laminina y la trombospondina, la fibronectina presenta una estructura en mosaico, compuesta por una serie de unidades modulares que a menudo se corresponden con la estructura exónica del gen (Doolittle, 1985; Hynes, 1985; McDonald, 1988; Petersen et al., 1989; Engel, 1991; Patthy, 1991).

La fibronectina está compuesta casi completamente por tres únicos tipos de módulos repetitivos (tipo 1, tipo 2 y tipo 3 denominados como Fn1, Fn2 y Fn3, respectivamente). A su vez un conjunto determinado de módulos se organiza en un dominio globular funcional de forma que la molécula es estructuralmente fibrosa formada por dominios globulares conectados por cortos segmentos flexibles (Alexander et al., 1978; Engel et al., 1981; Erickson y Carrell, 1983; Tooney et al., 1983; Engel y Furthmayr, 1987; Yamada y Kleinman, 1992). Los dominios globulares funcionales son resistentes a la proteólisis y contienen sitios de unión para las proteínas de la matriz extracelular tales como el colágeno y la trombospondina,

para los receptores de la superficie celular tales como las integrinas y para los glicosaminoglicanos tales como el heparán y el condroitín sulfato.

En base a esta estructura molecular compleja, diversos estudios han puesto de manifiesto que las funciones de la fibronectina han de considerarse en relación a esta estructura (Hynes y Yamada, 1982; Vartio, 1983; Yamada et al. 1984a y b; Ouaisi y Capron, 1985).

Las diferentes isoformas de fibronectina resultan de presentar de manera alternativa los módulos EDA (extradominio A, también denominado como EIIIA o EDI) y EDB (extradominio B, también denominado como EIIIB o EDII), ambos pertenecientes al grupo de módulos Fn 3; así como de un tercer módulo no perteneciente a ninguna de las categorías anteriores, el IIICS (segmento de conexión tipo III, también denominado como segmento de conexión V o variable) (Hynes, 1990).

1.3.1.5.1 Estructura del Módulo Fn1

Cada uno, de las doce posibles isoformas, de los módulos Fn1 está constituido por una secuencia de aproximadamente unos 45 aminoácidos. Estudios con técnicas de resonancia nuclear magnética (NMR) han puesto de manifiesto que los módulos Fn1 presentan dos pliegues en el espacio. Uno se caracteriza por estar constituido por una corta doble secuencia en conformación beta antiparalela (secuencias A y B) cerca del extremo amino terminal mientras que el otro presenta tres secuencias antiparalelas igualmente en conformación beta (secuencias C, D y E) (Baron et al., 1990; Williams et al., 1993; Williams et al., 1994). La mayoría de los residuos aminoacídicos contribuyen a la formación del núcleo hidrofóbico de la proteína, localizándose entre las conformaciones beta.

La estructura molecular de éste módulo se estabiliza por la presencia de cuatro residuos de cisteína, los cuales forman dos puentes disulfuro uno entre conformaciones opuestas, secuencia A y D, y otra dentro de una misma conformación beta, entre las secuencias D y E. Como excepción la isoforma 12 (12 Fn1) presenta un puente disulfuro extra; a su vez la estructura terciaria de este módulo se estabiliza por medio de interacciones hidrofóbicas, entre las que destaca la interacción entre dos residuos aromáticos, uno perteneciente a la primera conformación beta (secuencia B) y otro perteneciente a la segunda conformación beta (secuencia C). También se considera que existen interacciones hidrofóbicas entre módulos Fn1 adyacentes (Hendsch y Tidor, 1994).

Actualmente se sabe que los módulos Fn1 desempeñan diversas funciones concretas. Así, en cada uno de los monómeros de la fibronectina, los cinco primeros módulos (1-5 Fn1) del extremo amino terminal constituyen un dominio de ensamblaje de la matriz extracelular de tal forma que la delección de alguno de estos módulos impide que la fibronectina contribuya a la formación de la matriz extracelular (Quade y McDonald, 1988; Schwarzbauer, 1991; Mosher, 1993). Por otro lado los dominios de unión de la fibronectina con la fibrina se establecen por medio de los módulos 4-5 Fn1 y 10-12 Fn1 (Hendsch y Tidor, 1994; Potts y Campbell, 1994; Williams et al., 1994; Potts y Campbell, 1996). Además los dominios Fn1, 6Fn1 y 7-8Fn1, inmediatamente contiguos a los dos módulos Fn2 contribuyen en la unión de éstos últimos con la molécula de colágeno (Owens y Baralle, 1986; Litvinovich et al., 1991; Constantine et al., 1992a).

Copias simples del módulo Fn1 también han sido identificados en tejido activador de plasminógeno (*Tissue-type plasminogen activator*) (t-PA) y en el factor de coagulación sanguíneo.

1.3.1.5.2 Estructura del Módulo Fn2

En cada monómero de fibronectina aparecen dos módulos Fn2. Además módulos Fn2 semejantes a los de la fibronectina también han sido identificados en una serie de proteínas diversas incluyendo a la 92 kDa y a la 72 kDa colagenasa de tipo IV y a la proteína del fluido seminal bovino PDC 109. Cada uno de los módulos Fn2 está formado por, aproximadamente, unos 60 aminoácidos con una secuencia de 15 aminoácidos desde el extremo amino terminal hasta la primera cisteína (Kornblihtt et al., 1985).

Los estudios mediante técnicas de espectroscopía NMR del módulo Fn2 de la PDC 109, constituido por 46 residuos aminoacídicos, han puesto de manifiesto que el núcleo central del módulo está compuesto por dos dobles secuencias antiparalelas (A-B y C-D) en conformación beta orientadas aproximadamente de forma perpendicular una con respecto a la otra y dos bucles irregulares, uno separando las dos conformaciones beta y otro entre las dos secuencias de la segunda conformación. La conformación molecular está estabilizada mediante la formación de dos puentes disulfuro si bien estos no se encuentran localizados en las propias secuencias de conformación beta sino fuera de ellas (Constantine et al., 1991; Constantine et al., 1992b).

En conjunto el módulo Fn2 presenta una estructura hidrofóbica constituida por una serie de residuos aromáticos localizados en una cavidad formada por el pliegue de la estructura primaria. Estudios realizados mediante uniones de ligando indican que esta superficie hidrofóbica junto con un residuo de ácido aspártico pueden estar en relación con las interacciones específicas del PDC 109 con la leucina y/o la isoleucina de las secuencias del colágeno (Constantine et al., 1992b).

Los dos módulos 1Fn2 y 2Fn2 inmediatamente consecutivos, se encuentran situados entre módulos Fn1 con los que forman en conjunto el dominio de unión de la fibronectina con el colágeno (6Fn1 y 7-8Fn1) (Potts y Campbell, 1994).

1.3.1.5.3 Estructura del Módulo Fn3

Cada monómero de fibronectina contiene entre 15 y 17 módulos Fn3, dependiendo del tipo de isoforma de fibronectina. Cada uno de los módulos Fn3 está formado por, aproximadamente, unos 90 residuos aminoacídicos; ésta secuencia ha sido identificada unas 300 veces en 67 proteínas distintas (Doolittle y Bork, 1993) y se la encuentra tanto en organismos procariontas como eucariotas y en ambos grupos tanto formando parte de las proteínas extracelulares como de las intracelulares (Bork, 1992; Bork y Doolittle, 1992).

La conformación de los módulos de Fn3 se caracteriza por estar constituida por dos conformaciones beta; una constituida por tres secuencias antiparalelas (A, B y E) y otra constituida por cuatro secuencias también antiparalelas (C, C', F y G). Las dos conformaciones beta contienen entre sí un núcleo hidrofóbico (De Vos et al., 1992; Leahy et al., 1992; Main et al., 1992; Dickinson et al., 1994; Huber et al., 1994). A diferencia con los módulos Fn1 y Fn2 los módulos Fn3 no contienen puentes disulfuro y la mayoría están codificados por dos exones en vez de por uno (Potts y Campbell, 1994).

El módulo 10Fn3 contiene el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD); estos residuos aminoacídicos se localizan en un bucle flexible y expuesto a la superficie entre las secuencias F y G del módulo (Baron et al., 1992; Main et al., 1992). La secuencia RGD, constituye la secuencia de la fibronectina directamente relacionada con la adhesión celular y más específicamente con los receptores de membrana del tipo integrina $\alpha 5\beta 1$ (Yamada, 1989). No obstante, el módulo 10Fn3 de forma aislada no

se une a la integrina con la misma intensidad con la cual lo hace la fibronectina intacta. Este hecho se debe a que el módulo 10 Fn3 debe actuar de forma sinérgica con otros módulos Fn3 (8-9 Fn3) (Obara et al., 1988; Mardon y Grant, 1994; Potts y Campbell, 1996; Altroff et al., 2001).

También se ha puesto de manifiesto que la fibronectina puede unirse a otras integrinas. Por medio de secuencias localizadas en el módulo 9Fn3 lo hace con la α IIb-B3 (Bowditch et al., 1994; Mardon y Grant, 1994; Mohri et al., 1996) mientras que regiones de los módulos 4Fn3 y 5Fn3 están implicadas en la unión con las integrinas α 4b1 y α 4b7 (Moyano et al., 1997). De forma general existe gran variedad de integrinas con afinidad para esta molécula: α 3b1, α 4b1, α 5b1, α vb1, α vb3, α IIbb3, α vb6 (Damsky y Werb, 1992).

También el módulo 1Fn3, junto con el contiguo 9Fn1, actúa como estructura de unión entre la fibronectina y la matriz extracelular (Chernousov et al., 1991; Mosher, 1993).

Otra de las características más importantes de los módulos Fn3 y, como consecuencia, de sus funciones es el hecho de que su estructura está modulada por las diferentes posibles expresiones de sus ARNm. Por medio de expresiones alternativas de ciertos exones de tipo III, múltiples ARNm de fibronectina pueden surgir de un mismo gen. Los resultados de las diferentes expresiones aparecen en tres regiones denominadas como EDA, EDB y IIICS. Los módulos EDA y EDB pueden estar expresados cada uno por medio de un salto de exón mientras que el módulo IIICS es expresado por medio de un mecanismo más complejo, específico del tejido y de la especie (Hynes, 1990). Así, las 20 diferentes isoformas de fibronectina surgen de la expresión alternativa de estos módulos y más en concreto del módulo IIICS.

Los módulos EDA y EDB se localizan entre los módulos 11 y 12 Fn3 y entre el 7 y el 8 Fn3 respectivamente.

Si bien la interacción de las funciones de la fibronectina y los módulos EDA y EDB no son del todo conocidos; la expresión o no de las diferentes isoformas repercute en que las funciones específicas de la fibronectina cambian. Un ejemplo puesto de manifiesto de como es regulada la expresión de la fibronectina se puede observar en la síntesis alterna de ésta durante la condrogénesis embrionaria o en la formación del cartílago durante el crecimiento del individuo. En las células mesenquimales precartilaginosas, la fibronectina contiene el exón para el EDA expresado. No obstante, cuando éstas células se diferencian en el cartílago, la no expresión del ARNm del EDA implica que sólo una mínima cantidad de fibronectina expresada con EDA aparece en los condrocitos maduros (Downie y Newman, 1995; Ffrench-Constant, 1995; Gehris et al., 1996). Este hecho, también es observable en procesos patológicos, enfermedades autoinmunes y procesos neoplásicos (Scarpino et al., 1999; Sato et al., 2000; Ting et al., 2000).

La expresión alternativa del dominio IIICS provee a la fibronectina de una segunda y mayor región de unión celular. El dominio IIICS presenta dos sitios de unión para integrinas capaces de reconocer a la $\alpha 4\beta 1$ y a la $\alpha 4\beta 7$ (Humphries, 1990; Komoriya et al., 1991). Además este dominio también está relacionado con la unión con el heparán.

Otra función descrita para los módulos Fn3 es la unión con el heparán. Esta función fue localizada en el fragmento abarcado entre los módulos 12-14 de Fn3 (Benecky et al., 1988; Novokhatny et al., 1992; Ingham et al., 1993). La unión con el heparán está basada en interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de los residuos de Arg y Lys (R y K), cargados positivamente, de la fibronectina y los grupos sulfato y carboxílicos, cargados negativamente, del heparán (Walkery Gallagher, 1996).

1.3.1.6 Laminina

La laminina, uno de los principales componentes de las láminas basales celulares, fue aislada inicialmente a partir de extractos neutros del tumor de ratón EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (Timpl et al., 1979), y de las células tumorales *parietal-yolk sac* (teratocarcinoma en cultivo celular) (Chung et al., 1979), sistemas ambos que se caracterizan por sintetizar grandes cantidades de membrana basal.

La laminina se une al colágeno de tipo IV, al heparán sulfato, a la entactín/nidógeno, y a sí misma, creando una estructura integrada en las láminas basales. Por otro lado, debido a su tamaño y forma, es capaz de cruzar la lámina basal y unirse a varias sustancias en la superficie celular (Terranova et al., 1980; Charonis et al., 1985; Martin y Timpl, 1987; Timpl, 1989).

Así, entre las principales funciones biológicas de la laminina algunas coinciden en parte con las de la fibronectina, si bien con distribución más restringida, interviniendo en: la diferenciación, el crecimiento y la morfología celular; la adhesión, la migración y la polaridad celular; el ensamblaje de la matriz extracelular, el crecimiento de las neuritas y la metástasis tumoral (Kleinman et al., 1984; Kleinman et al., 1985; Kleinman y Weeks, 1989; Weber, 1992).

Actualmente se han identificado hasta doce moléculas isofórmicas diferentes de laminina en mamíferos, mientras que han sido descritas dos lamininas diferentes en invertebrados (McCarthy et al., 1987; Fessler et al., 1987; Chiquet et al., 1988; Burgeson et al., 1994; Richards et al., 1994; Iivanainen et al., 1995; Miner et al., 1995; Champlaud et al., 1996; Koch et al., 1999; Martin et al., 1999; Hutter et al., 2000).

En todos los casos la laminina de los vertebrados, comparte características comunes en su estructura, función y localización con la de los invertebrados, de tal forma que estudios comparados de la laminina en *Drosophila*, en ratón y en humanos, muestran una analogía de un 90% entre la molécula de ratón y la humana y de un 45% con la de la mosca (Chi y Hui, 1989).

La estructura de la laminina es la de una molécula trimérica (Cooper et al., 1981; Engel et al., 1981) constituida por una cadena alfa, una cadena beta y una cadena gamma (Beck et al., 1993). Hasta ahora, han sido descritas cinco cadenas alfa, tres beta y tres gamma posibles en mamíferos.

Mediante microscopía electrónica y estudios, físicos e inmunoquímicos, de caracterización por fragmentación proteolítica, se ha establecido que el ensamblaje de las tres cadenas constituye una estructura general en forma de cruz asimétrica (Engel et al., 1981; Timpl et al., 1983), unidas por puentes disulfuro y enlaces no covalentes, de forma que cada una de las tres cadenas polipeptídicas forma uno de los tres brazos cortos de la estructura cruciforme mientras que el conjunto de las tres establece el brazo largo de la misma (Ott et al., 1982; Paulsson et al., 1985) (revisado en: von der Mark y Kühn, 1985; Kleinman et al., 1985; Claudy, 1987; Martin y Timpl, 1987; Martin et al., 1988; Kleinman y Weeks, 1989; Timpl, 1989; Schittny y Yurchenco, 1989; Weber, 1992, Colognato y Yurchenco, 2000; Tunggal et al., 2000).

Las distintas lamininas pueden ser clasificadas en subfamilias diferentes, basándose en las diferencias de los distintos brazos cortos de la molécula general en cruz, así como también por las distintas secuencias de las distintas cadenas polipeptídicas. De este modo, las lamininas 1, 2, 3 y 4 presentan los tres típicos brazos cortos (Paulsson y Saladin, 1989; Beck et al., 1993; Lindblom et al., 1994), las lamininas 6-9 presentan el brazo corto de la cadena alfa truncado (Marinkovich et al., 1992a;

Sorokin et al., 1994), la laminina 5 presenta truncados los tres brazos cortos, correspondientes por tanto a la cadena alfa, beta y gamma (Rousselle et al., 1991), las lamininas 10 y 11 presentan una cadena alfa alargada en el brazo corto de manera que son lamininas más largas que las demás (Cognato y Yurchenco, 2000).

Algunas lamininas sufren pérdidas proteolíticas dentro de los dominios terminales en el extremo carboxílico o en los brazos cortos debido a modificaciones postransducción y posiblemente también postsecreción (Leivo et al., 1989; Marinkovich et al., 1992b; Miner et al., 1997).

Las tres subunidades de la laminina presentan un rasgo común estructural que es el de estar formadas por secuencias globulares, por estructuras en barra y por un dominio en superhélice.

La laminina tipo 1 (alfa 1, beta 1, gamma 1) fue la primera laminina identificada, estructuralmente analizada y secuenciada mostrando un brazo largo de aproximadamente 77 nm de longitud y tres brazos cortos de aproximadamente 36 nm de longitud (Timpl et al., 1979; Engel et al., 1981; Engel y Furthmayr, 1987; Sasaki et al., 1987, 1988; Sasaki y Yamada, 1987).

1.3.1.6.1 Estructura de la cadena Gamma (B2) y Beta (B1)

El análisis sugiere que las cadenas gamma, en general, presentan seis dominios distintos mientras que las cadenas beta presentan los mismos dominios que las gamma más un segmento adicional de 30 aminoácidos, designado como dominio alfa, situado entre los dominios I y II. Ambas cadenas están estructuradas cada una en dos dominios globulares (dominios IV y VI) y dos dominios en barra (dominios III y V) que constituyen el brazo corto de cada una de las dos cadenas, gamma y beta, más el conjunto de dos dominios que establecen un dominio mayor y principal

alfa helicoidal (dominios I y II) (Sasaki y Yamada 1987, Sasaki et al., 1987) que coincide con la estructura del brazo largo y con el extremo carboxílico terminal de la cadena polipeptídica (Paulsson et al., 1985).

1.3.1.6.1.1 Dominios I y II

El dominio I ocupa la porción carboxílico terminal de la molécula. Desde ahí se establece una serie de siete repeticiones que se caracterizan por presentar residuos aminoacídicos hidrofóbicos, hidrofílicos y cargados (Sasaki y Yamada, 1987; Tunggal et al., 2000), lo cual es característico de todas las proteínas que presentan estructura en suprahélice tales como el fibrinógeno (Doolittle et al., 1978), la desmina (Geisler y Weber, 1982), la miosina (McLachlan y Karn, 1983) y la hemaglutinina (Bassel-Duby et al., 1985).

El dominio II también presenta estructura alfa helicoidal aunque con menos periodicidad que el dominio I al tiempo que también carece de las secuencias de aminoácidos polares observados en el mismo (Sasaki y Yamada, 1987).

Entre cadenas gamma y beta, el tamaño de los dominios I y II es muy similar en ambas, probablemente debido a que ambas se entrelazan para formar una suprahélice junto con los dominios I y II de la cadena alfa para constituir el brazo largo de la molécula de laminina (Engel et al., 1981; Sasaki y Yamada, 1987).

En el extremo amino terminal del brazo largo, cerca del punto de transición entre el mismo y el brazo corto, las tres cadenas polipeptídicas están unidas entre sí por puentes disulfuro; de forma semejante, también en el extremo carboxílico terminal aparece un puente disulfuro entre la cadena beta y gamma (Paulsson et al., 1985)

1.3.1.6.1.2 Dominios III y V (dominios EGF o dominios LE)

Estos dos dominios se caracterizan por presentar un alto contenido en cisteínas y glicinas y por estar constituidos por una serie de tres a ocho repeticiones homólogas entre sí en cada uno de los dominios III y V y entre ambos. Cada una de las repeticiones se puede alinear con las otras por medio de las ocho cisteínas de cada homólogo; de forma que la distancia entre la primera y la segunda, la quinta y la sexta y la sexta y la séptima cisteína es constante. Además 24 de aproximadamente 50 de los aminoácidos que establecen cada una de las secuencias homólogas coinciden entre sí. Cada una de las repeticiones es semejante a la estructura del EGF (*Epidermal Growth Factor*) denominándose también a cada uno de éstos como módulo EGF o módulo LE (Sasaki y Yamada, 1987).

Los dominios III y V de las cadenas gamma y beta de la laminina presentan una gran homología entre sí (42 y 44% respectivamente), aunque los dominios de las cadenas gamma contienen menos repeticiones ricas en cisteína en comparación con las cadenas beta y un menor número de repeticiones (8 y 6.5 en el dominio III y 5 y 4.3 en el dominio V respectivamente) (Sasaki y Yamada, 1987).

Las secuencias repetitivas ricas en cisteínas aparecen en otras proteínas incluyendo el factor de coagulación IX (Kurachi y Davie, 1982), el EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Gray et al., 1983), el TGF (*Transforming Growth Factor*) (Derynck et al., 1984), el TPA (*Tissue Plaminogen Activator*) (Pennica et al., 1983), la urokinasa (Gunzler et al., 1982) , el VVGF (*Vaccivia Virus Growth Factor*) (Stroobant et al., 1985), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (Sudhof et al., 1985) y la trombospondina (Lawler y Hynes, 1986).

El dominio III de la cadena gamma presenta una alta afinidad de interacción no covalente con el receptor de laminina nidógeno/entactín a nivel de la cuarta repetición (LE4) (Paulsson et al., 1987; Fox et al., 1991; Poschl et al., 1994).

Como la nidógeno/entactín tiene alta afinidad con el colágeno de tipo IV (Fox et al., 1991) éste podría servir como eslabón de unión molecular entre la laminina y el colágeno (Limblond et al., 1994).

1.3.1.6.1.3 Dominio IV (L4) y VI (LN)

La estructura de estos dos dominios contiene fracciones helicoidales, estructura beta y hélices al azar pero en conjunto establecen conjuntos de estructura globular. El dominio VI se corresponde con el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica.

Los dominios IV y VI actualmente se denominan como módulos L4 y LN respectivamente, según la nomenclatura SWISS-PROT.

Al igual que en los dominios III y V los dominios VI de las cadenas gamma y beta presentan una alta homología entre sí (30%) (Sasaki y Yamada, 1987).

El valor significativo de la alta homología de la secuencia de aminoácidos del dominio VI, así como las localizadas en los dominios III y V, sugiere que estos segmentos presentarán funciones biológicas comunes como resultado de la transcripción de un gen ancestral común.

También el dominio amino terminal presenta sitios de unión para con las proteínas de membrana integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ (Languino et al., 1989; Hall et al., 1990; Tomaselli et al., 1990; Colognato-Pyke et al., 1995; Colognato et al., 1997) sugiriéndose al mismo tiempo funciones tales como la unión con el colágeno de tipo IV (Sasaki y Yamada, 1987).

Los dominios amino terminal VI de las tres cadenas polipeptídicas participan en la formación de un polímero reversible calcio-dependiente (Paulsson, 1988; Yurchenco et al., 1985; Yurchenco and Cheng, 1993).

1.3.1.6.1.4 Dominio B o Segmento Alfa

El dominio B o segmento alfa, constituido por aproximadamente 30 residuos aminoácidos, se caracteriza por contener seis cisteínas y ocho glicinas que interrumpen la estructura alfa helicoidal del dominio I y II del monómero beta (cadena B1) (Engvall y Wewer, 1996).

1.3.1.6.2 Estructura de la cadena Alfa

En general, las cadenas alfa son semejantes a las cadenas gamma y beta en cuanto a sus secuencias y dominios.

No obstante, una diferencia estructural significativa es que a nivel del extremo carboxílico terminal la cadena alfa se caracteriza por presentar una serie de estructuras globulares denominadas como dominios G (LG1- LG5).

Otra diferencia estructural es el hecho de que los dominios III y IV se encuentran subdivididos cada uno en dos segmentos dispuestos de forma alterna entre sí (IIIa, IVa, IIIb, IVb). Los dominios IV alfa son dominios homólogos a los dominios IV de las cadenas gamma. El dominio IVa de la cadena alfa 1 en ratón contiene la secuencia del tripéptido de unión RGD (Arg-Gly-Asp) reconocible por la alfa v beta 3 integrina (Aumailley et al., 1990; Schulze et al., 1996).

El conjunto de los cinco dominios G se corresponde con una secuencia de aproximadamente 900 residuos aminoácidos. Cada dominio LG esta constituido por una serie de secuencias en conformación beta antiparalela en dos planos a la cual

se les une un ion calcio. Se ha sugerido que el ion calcio sirve como puente de unión entre la laminina y los grupos sulfato de moléculas oligosacáridas como por ejemplo el alfa distroglicano (Bowe et al., 1994; Andac et al., 1999; Hohenester et al., 1999; Talts et al., 1999; Talts y Timpl 1999).

Moléculas efectoras pueden modular la polimerización de la laminina; esto es, realzandola o inhibiendola, según la presencia y la concentración de heparina. El realce en gran parte se debe a la capacidad de la heparina de unir o acortar dominios G (Yurchenco et al., 1990).

El dominio LG3 presenta alta afinidad de interacción no covalente, al igual que los dominios de la cadena gamma III, por los receptores nidógeno/entactín (Paulsson et al., 1987; Fox et al., 1991).

Los dominios LG también intervienen en la unión con el proteoglicano de las membranas basales agrín (Ruegg et al., 1992; Denzer et al., 1997, 1998; Gesemann et al., 1995, 1996) y con los receptores de membrana del tipo integrina ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$) probablemente con LG1 y/o LG2 así como con el alfa distroglicano en el dominio LG1-3 y LG4-5 (Sonnenberg et al., 1988; Aumailley et al., 1990; Kramer et al., 1991; Lee et al., 1992; Ervasti y Campbell, 1993; Gee et al., 1993). Tanto las alfa 6 integrinas como la $\alpha 7\beta 1$ son integrinas muy específicas para la laminina.

La heparina y otros tipos de polímeros que contienen heparán sulfato pueden unirse a los dominios VI de la cadena alfa (Roberts, 1986; Mann et al., 1988; Roberts et al., 1988; Yurchenco et al., 1990; Sung et al., 1993; Colognato-Pyke et al., 1995; Sung et al., 1997). También y de forma similar a lo que ocurre en el dominio VI de la cadena alfa, la heparina y otros tipos de polímeros que contienen heparán sulfato pueden unirse también a los dominios LG4 de dicha cadena (Roberts, 1986; Mann et

al., 1988; Roberts et al., 1988; Yurchenco et al., 1990; Sung et al, 1993; Colognato-Pyke et al., 1995; Sung et al., 1997; Hohenester et al., 1999).

1.3.2 La Matriz extracelular en el desarrollo glomerular y las patologías renales

Si bien, todas las matrices extracelulares contienen colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, no todas las matrices extracelulares presentan idéntica composición molecular. Actualmente, el concepto de matriz extracelular específico de tejido se considera más bien como norma que como excepción. Además, a este concepto de especificidad se ha añadido "la hipercomplejidad" de que, hasta el momento, de la molécula de colágeno tipo IV se conocen seis variantes genéticas de sus cadenas alfa (IV) (alfa 1(IV)- alfa 6(IV) (Hudson et al., 1993) y doce isoformas posibles de laminina en tejidos. (McCarthy et al., 1987; Fessler et al., 1987; Chiquet et al., 1988; Burgeson et al., 1994; Richards et al., 1994; Iivanainen et al., 1995; Miner et al., 1995; Champlaud et al., 1996; Koch et al., 1999; Martin et al., 1999; Hutter et al., 2000).

Además, las moléculas alfa triméricas de colágeno tipo IV, que en la mayoría de moléculas de colágeno tipo IV se forman por la asociación de dos cadenas alfa 1(IV) y una cadena alfa 2(IV), en los colágenos de las membranas basales glomerulares las isoformas que se detectan se corresponden con: una cadena alfa 3(IV), una cadena alfa 4(IV) y una cadena alfa 5(IV) como mayoritarias y algunas cadenas alfa 1(IV) y alfa 2(IV) como minoritarias (Hudson et al., 1993; Büyükbabani y Droz, 1994; Gubler et al., 1995; Virtanen et al., 1995; Fischer et al., 2000).

Algo semejante se observa en relación con las moléculas triméricas de laminina. Así, mientras la mayoría de las membranas basales celulares contienen la isoforma beta 1 en su molécula, las membranas basales glomerulares maduras carecen de isoforma beta 1, estando ésta sustituida por isoformas del tipo beta 2; además, la laminina 11 (alfa 5, beta 2, gamma 1) parece ser la principal laminina en la membrana basal glomerular madura mientras que el mesangio glomerular maduro contiene laminina 1 (alfa 1, beta 1, gamma 1) y laminina 2 (alfa 2, beta 1, gamma 1) (Gubler et al., 1995; Virtanen et al., 1995; Miner et al., 1997; Fischer et al., 2000).

La naturaleza exacta de los proteoglicanos de heparán sulfato, que contribuyen a la carga negativa de la membrana basal por medio de sus cadenas laterales de glicosaminoglicanos se desconoce todavía pero, mientras el agrín parece ser el principal proteoglicano de la membrana basal glomerular se considera al perlecán como el proteoglicano mayoritario en el resto de membranas basales celulares (Groffen et al., 1998a y b).

Otro nivel adicional a la hipercomplejidad en la organización de las matrices extracelulares es la expresión temporal de las diferentes isoformas de algunas de las moléculas que la estructuran; es sabido que distintas moléculas de la matriz se expresan de manera temporal y espacialmente específica durante el desarrollo del tejido.

El glomérulo renal refleja esta complejidad cuando se examina usando anticuerpos específicos para las familias de moléculas de la membrana basal glomerular y el mesangio y sus isoformas para el colágeno tipo IV, la laminina y los proteoglicanos (Ekblom, 1981; Abrahamson, 1985; Mounier et al., 1986; Lelongt et al., 1987; Klein et al., 1988; Butkowski et al., 1989; Desjardins et al., 1990; Ekblom et al., 1990; McCarthy y Couchman, 1990; Sanes et al., 1990; McCarthy et al., 1993; Miner y Sanes, 1994; Sorokin et al., 1997).

Al final de la etapa de vesícula de la nefrogénesis, la futura nefrona consiste en una población de células epiteliales circunscritas por una primitiva lámina basal. En este estadio del desarrollo la lámina basal de la vesícula se ha demostrado que está compuesta por colágeno tipo IV (alfa 1(IV), alfa 2(IV)) (Miner y Sanes, 1994), fibronectina (Ekblom, 1981; McCarthy et al., 1993; Mounier et al., 1986), laminina (Ekblom, 1981; Abrahamson, 1985; McCarthy et al., 1993; Mounier et al., 1986), nidógeno/entactín (Ekblom et al., 1994), proteoglicanos de heparán sulfato (Lelongt et al., 1987), perlecán (McCarthy et al., 1993; Mounier et al., 1986) y carencia de proteoglicanos de condroitín sulfato (McCarthy et al., 1993).

En esta etapa de vesícula, las cadenas beta 1 y gamma 1 de la molécula de laminina están presentes en la lámina basal (Ekblom et al., 1990) junto con una cadena alfa (Miner et al., 1997; Sorokin et al., 1997). Esta composición molecular particular de la membrana basal persiste en las fases en coma y en S temprana de la nefrogénesis.

También, durante la fase de vesícula varios acontecimientos correspondientes al inicio de la formación de la futura membrana basal glomerular están ya en proceso de desarrollo, así, los elementos del presunto árbol vascular empiezan a invadir la hendidura inferior (Osathanondh y Potter 1966; Sariola et al., 1984) para dar lugar posteriormente a las poblaciones celulares del endotelio capilar y de las células mesangiales del glomérulo adulto (Reeves et al., 1978; 1980).

Las células endoteliales que limitan los futuros capilares glomerulares dentro de la hendidura glomerular presentan fenestraciones con diafragma y una escasa lámina basal. A medida que la glomerulogénesis prosigue, las fenestraciones de la célula endotelial pierden sus diafragmas para permitir el acceso de solutos y solventes a la membrana basal glomerular naciente (Reeves et al., 1980).

De manera concomitante con la ramificación vascular dentro de la hendidura glomerular aparecen los acontecimientos asociados con la segregación de las células en los futuros epitelios parietal y visceral del glomérulo adulto. Las células que forman el límite inferior de la hendidura, aquellas destinadas para dar lugar al epitelio visceral, comienzan a polarizarse, segregan su lámina basal (McCarthy, 1997) y aparece la asociación inicial de dos poblaciones de células, la epitelial y la endotelial separadas por sus respectivas láminas basales y por una capa de matriz fibrilar la cual no contiene laminina (Abrahamson y Perry, 1986), lo cual contrasta de forma ostensible con las dos láminas basales adyacentes.

Con disposición central al desarrollo del lecho capilar aparece el futuro mesangio, que, en este estadio del desarrollo, está compuesto predominantemente por células rodeadas por una leve matriz de tejido conectivo, con proteoglicanos de condroitín sulfato, limitada por la membrana basal glomerular.

En los glomérulos en la etapa de asa capilar, se puede observar algunas áreas de la pared capilar donde se dan los primeros indicios de que "la fusión" de las capas densas de ambas láminas basales, endotelial y epitelial visceral, está ocurriendo. El mecanismo exacto de la "fusión" y con ello de la formación de la membrana basal glomerular como tal se considera que es un proceso gradual y que implica la renovación del condroitín por el hialuronán, que previamente había sido sustituido por el mismo, de la matriz y la fusión de las dos láminas densas (Abrahamson, 1987; Lelongt et al., 1987; Abrahamson, 1991; McCarthy et al., 1993; McCarthy, 1997) así como por la evidencia resultante para diversos autores de que a partir de ese momento es el epitelio visceral la única fuente biosintética de la matriz que constituye la membrana basal glomerular madura (Kurtz y Feldman, 1962; Abrahamson, 1985; Stow et al., 1985).

En las etapas siguientes a la fusión de las láminas basales y hasta la maduración del glomérulo, la nefrogénesis conduce a una transición gradual de las isoformas de la molécula de colágeno en el desarrollo de la membrana basal glomerular desde las cadenas alfa 1(IV) y alfa 2(IV), presentes todavía entre el estadio tardío en S y el temprano de asa capilar, hasta las cadenas alfa 3(IV), alfa 4(IV) y alfa 5(IV) encontrados en los glomérulos maduros de las ratas postnatales (Desjardin y Bendayan, 1991; Lee et al., 1993, Miner y Sanes, 1994; Cosgrove et al., 1996; Miner y Sanes, 1996; Harvey et al., 1998).

Este cambio en el tipo de isoformas de las cadenas de colágeno tipo IV de la membrana basal glomerular también se refleja de forma simultánea por la transformación de las cadenas beta 1 de laminina por las cadenas beta 2 (Miner y Sanes, 1994) y la acumulación de cadenas alfa 5 en sustitución de las cadenas alfa 1 o alfa 4 que desaparecen progresivamente (Miner et al., 1997). Hasta ahora, se ha demostrado que la cadena gamma 1 de laminina es la única, del heterotrímero, que persiste en todas las secuencias del desarrollo de la nefrona.

Según Fischer et al., 2000 paralelamente a estos cambios, la fibronectina desaparece progresivamente de la membrana basal glomerular además de que para Miner 1999, aunque de forma inversa, dice que en las matrices ricas en fibronectina no aparecen cadenas alfa 1 de laminina .

McCarthy et al., en 1993 destacaron el hecho de que también durante el proceso de la maduración glomerular, la matriz mesangial sufre un proceso de reorganización en sincronía con la maduración postnatal de la membrana basal glomerular. No obstante, parece que la composición de la matriz mesangial durante la glomerulogénesis no sigue un patrón de cambio similar a lo descrito para la membrana basal glomerular, sino que más bien permanece constante a lo largo de

todo el proceso, y sólo la isoforma de la cadena alfa de laminina podría cambiar (Sorokin et al., 1994; Sorokin et al., 1997; Kashtan et al., 2001).

La membrana basal glomerular, además de presentar propiedades selectivas características para distintas moléculas de tamaño y/o carga distintas, también se caracteriza por tener una composición química característica en las isoformas de sus componentes principales es decir, del colágeno tipo IV, de la laminina y de los proteoglicanos de heparán sulfato; ya que las isoformas presentes en las membranas basales maduras, en las distintas especies animales, son distintas de las que están presentes en la mayoría de otras membranas basales (revisado en Sanes et al. 1990; Philajaniemi, 1996).

Algunas patologías renales, así como algunas patologías sistémicas, son responsables de producir, como efecto primario o secundario de la propia enfermedad, no sólo modificaciones histológicas en las matrices extracelulares sino también modificaciones en la composición química de las matrices modificadas, produciendo a su vez variaciones en las propiedades funcionales de la membrana basal glomerular y del mesangio y/o modificación de las funciones de los podocitos.

La proteinuria asociada con enfermedades glomerulares es considerada como un efecto secundario a las alteraciones de las propiedades selectivas de carga y/o tamaño de la membrana basal glomerular, aunque las modificaciones moleculares responsables de estos cambios funcionales son todavía poco conocidas (Kanwar et al., 1991).

El síndrome de Alport, una glomerulonefritis hereditaria acompañada de sordera neurosensorial, es causada por mutaciones en alguno de los genes que codifican las cadenas alfa 3, alfa 4, y alfa 5 del colágeno tipo IV (COL4A3, COL4A4, y COL4A5, respectivamente) (Hudson et al., 1993; Antignac, 1995). Como el gen COL4A5 está

ligado al cromosoma X, (Hostikka et al., 1990) la mayoría de pacientes con síndrome de Alport son de sexo masculino.

La nefropatía de Alport avanzada, se caracteriza clínicamente por el desarrollo de insuficiencia renal y proteinuria y estructuralmente por el engrosamiento, la disminución en la densidad y la laminación progresiva de la membrana basal glomerular (Atkin et al., 1988, Gubler et al., 1993; Kashtan y Michael, 1993). En esta patología renal, la membrana basal glomerular muestra como característica el hecho de que, cuando una de las cadenas alfa 3, alfa 4 o alfa 5 de colágeno tipo IV muta, las otras modifican su función normal en la membrana basal glomerular; ésto implica que mientras en condiciones normales las cadenas de colágeno tipo IV se ensamblan en una red especializada que confiere estabilidad estructural a la membrana basal glomerular, en los glomérulos Alport adultos aparecen anormalidades estructurales y funcionales de la membrana basal glomerular (Hudson et al. 1993; Gunwar et al., 1998; Boutaud et al., 2000).

En las membranas basales glomerulares Alport, las cadenas de colágeno IV que mutan (alfa 3, alfa 4 o alfa 5) son sustituidas por cadenas alfa 1(IV), y alfa 2(IV), que normalmente son las que se encuentran en las membranas basales glomerulares inmaduras (Kashtan y Kim, 1992; Miner y Sanes, 1994; Kalluri et al., 1997; Harvey et al., 1998).

Mientras que en las membranas basales glomerulares maduras normales las cadenas alfa 1(IV) y alfa 2(IV) están limitadas a la región subendotelial de la membrana basal, en los riñones con el síndrome de Alport estas cadenas se expresan en todo el espesor de la membrana basal glomerular (Kashtan y Kim, 1992; Muda et al., 1997).

En el síndrome de Alport humano, los colágenos tipo V y VI también se acumulan de modo anormal en la membrana basal glomerular. Estos colágenos normalmente se

expresan en el mesangio y en la región subendotelial de la membrana basal glomerular (Kashtan y Kim, 1992; Kashtan et al., 2001).

En la glomerulonefritis membranosa, las cadenas de colágeno tipo IV no difieren de las cadenas de los glomérulos normales (Kim et al., 1991; Büyükbabani y Droz, 1994; Haramoto et al., 1994; Cai et al., 1996a; Zhang y Lee, 1997; Fischer et al., 2000) mientras que, en la glomeruloesclerosis focal la matriz que se acumula entre los podocitos y la membrana basal glomerular está formada sólo por cadenas alfa 1 (IV) o alfa 2 (IV) (Büyükbabani y Droz, 1994; Cai et al., 1996b; Fischer et al., 2000).

Algunos estudios, han sugerido que las propiedades de filtración de la membrana basal glomerular dependen de la composición exacta de las isoformas que estructuran la laminina; de tal forma que cuando una mutación nula es introducida en el gen que codifica la síntesis de la cadena beta 2 de la molécula de laminina, los ratones transgénicos desarrollan proteinuria severa inmediatamente después del nacimiento (Noakes et al., 1995; Fischer et al., 2000). Una semana después del nacimiento, la membrana basal glomerular de estos animales parece ser estructuralmente normal, en las observaciones realizadas con microscopía óptica y electrónica, y las únicas modificaciones que han sido detectadas en dicho periodo son la presencia de moléculas de laminina que contienen cadenas beta 1. Este hecho, hace pensar que son las modificaciones de las isoformas de laminina presentes en la membrana basal glomerular las responsable de la proteinuria severa en distintas patologías renales (Noakes et al., 1995; Fischer et al., 2000).

Habib y colaboradores en 1982 y Thorner y colaboradores en 1987 examinaron la expresión de la laminina en la membrana basal glomerular de perros con la glomerulopatía hereditaria del Samoyedo, una forma de síndrome de Alport ligada al cromosoma X, en éstos no se observó ninguna diferencia entre la expresión de la laminina de las membranas basales y del mesangio entre perros normales y

afectados. Tampoco Miner y Sanes en 1996 y Lu y colaboradores en 1999 relacionaron el síndrome de Alport en humanos y perros con la expresión anormal de la laminina en la membrana basal glomerular. Sin embargo, en la época en que estos estudios fueron realizados se conocía poco sobre la expresión específica de las isoformas de laminina en los tejidos, utilizando además pruebas ampliamente reactivas.

Actualmente se ha demostrado que la expresión aberrante de la laminina alfa 2, normalmente restringida a la matriz mesangial (Miner et al., 1997; Miner, 1999), aparece en las membranas basales glomerulares como una anomalía coherentemente observada en el síndrome de Alport (Cosgrove et al., 2000; Kasthan et al., 2001; Andrews et al., 2002). La presencia de laminina alfa 2 en la membrana basal glomerular de individuos con el síndrome de Alport junto con una serie de cadenas anormales en el colágeno tipo IV, puede cambiar las propiedades de filtración de la membrana basal glomerular o perturbar la homeostasis de los podocitos (Andrews et al., 2002). También, es posible que el cambio en las cadenas de colágeno tipo IV en las membranas basales glomerulares modifique la expresión de la laminina en las membranas basales glomerulares tipo Alport, quizás por estimulación de la expresión de las cadenas de laminina que típicamente se encuentran en asociación con las cadenas alfa 1 y alfa 2 del colágeno tipo IV (Kashtan et al., 2001).

Estudios realizados, en riñones de ratones, perros y humanos que diferenciaban entre el síndrome de Alport ligado al cromosoma X y las formas autosómicas recesivas para detectar la expresión de cadenas alfa, beta y gamma de laminina, usando anticuerpos monoespecíficos, han puesto de manifiesto que las cadenas que conforman la laminina 11 (alfa 5, beta 2, gamma 1) no desaparecen de las membranas basales glomerulares con el síndrome de Alport, aunque mientras las cadenas alfa 2 de laminina estaban ausentes de las membranas basales glomerulares

normales de humanos, ratones y perros, en las membranas basales glomerulares con el síndrome de Alport estaban anormalmente expresadas independientemente del modelo de herencia o de la especie. Sin embargo, mientras en los riñones tipo Alport de ratones y perros, la cadena alfa 2 aparecía depositada como parte de la laminina 2 (alfa 2, beta 1, gamma 1) y como parte de la laminina 4 (alfa 2, beta 2, gamma 1), en riñones tipo Alport de humanos sólo aparecía como parte de la laminina 4 (Kashtan et al., 2001). La expresión de las cadenas alfa 2 de la laminina de la membrana basal glomerular no ha sido observada en una gran variedad de glomerulopatías humanas distintas al síndrome de Alport. También, en riñones de ratón tipo Alport, pero no en riñones tipo Alport humanos, se ha puesto de manifiesto, mediante tinción focal de la membrana basal glomerular, la cadena alfa 1 de laminina, probablemente como parte del trímero de laminina 1. La razón de esta diferencia se desconoce, pero puede ser el reflejo de diferencias específicas de especie en la expresión génica de la laminina, dado que la laminina alfa 1 es expresada en el mesangio de los riñones normales de ratón, pero no en riñones normales humanos (Kashtan et al., 2001).

Otros autores han puesto de manifiesto la expresión de la cadena beta 1 de laminina en las membranas basales de los glomérulos de ratones y perros con síndrome de Alport autosómico (Cosgrove et al., 1996; Miner y Sanes, 1996; Lees et al., 1998). La discrepancia entre el síndrome de Alport humano, a diferencia con el síndrome de Alport de ratones y perros, en la deposición de laminina beta 1 en la membrana basal glomerular puede reflejar diferencias específicas de especie en la regulación de la expresión de esta proteína.

En pacientes con glomerulonefritis membranosa, donde las modificaciones mediante microscopía revelan cambios característicos alrededor de las membranas basales de los capilares glomerulares y fusión de los pedicelos (Büyükbabani y Droz, 1994; Haramoto et al., 1994; Zhang y Lee, 1997), sólo aparecen cambios discretos en la estructura de las moléculas de laminina presentes en la membrana basal glomerular;

no obstante estas moléculas contienen cadenas beta 1 en vez de beta 2. Esta modificación no ha sido observada en las lamininas de las membranas basales glomerulares de pacientes que presentan glomerulonefritis focal, glomerulonefritis de lesiones mínimas, glomerulonefritis mesangiocapilar o nefropatía IgA, aunque si se ha determinado la presencia de cadenas beta 1 de laminina a nivel de las membranas basales glomerulares tubulares y en el mesangio glomerular (Fischer et al., 2000).

No obstante, en un modelo experimental de nefritis lúpica y en un modelo de glomerulonefritis asociada a enfermedad de rechazo del injerto (*Graft-versus-host disease*), también se ha descrito que la isoforma de cadena beta de laminina que aparece es la beta 1; en ambos casos la enfermedad renal es responsable de proteinuria severa (Bergijk et al., 1992; Kootstra et al. 1995).

Mediante la utilización de técnicas de radioinmunoensayo, Shimomura y Spiro en 1987, observaron que la membrana basal glomerular de los diabéticos contenía un elevado nivel de heparán sulfato y de laminina, con valores medios que se encontraban entre el 30 y el 60%, respectivamente, por encima de los valores normales control de los no diabéticos.

En pacientes con diabetes de tipo I, se han realizado amplios estudios sobre el metabolismo renal (Fukui et al., 1992; Büyükbabani y Droz, 1994; Ehara et al., 1994; Yang et al., 1995). Fukui y colaboradores, en 1992, relacionaron el engrosamiento de la membrana basal glomerular con el incremento progresivo de los niveles del ARNm de las cadenas beta 1 y gamma 1 de la laminina en los glomérulos de ratas de 1, 3 y 6 meses con diabetes producida por estreptozotocina. También, Yang y colaboradores, en 1995, relacionaron el engrosamiento de las membranas basales glomerulares con el incremento en la transcripción de las cadenas beta 1 de la laminina en ratones de 1 mes con diabetes del tipo espontáneo no obeso. En ratones con diabetes de tipo II (db/db) se ha relacionado el incremento de las cadenas alfa 1,

beta 1 y gamma 1 en la membrana basal glomerular y en el mesangio y el de la cadena alfa 5 en la membrana basal glomerular, en la membrana basal de los túbulos y en el mesangio, no con el aumento de los niveles de transcripción sino con mecanismos no transcripcionales (Lubec y Pollak, 1980; Knecht et al., 1987; Abrass et al., 1994; Schnaper, 1995; Cohen et al., 1997; Proud y Denton, 1997; Suzuki et al., 1997; Wolf et al., 1998; Ha et al., 1999).

3 Objetivos

Los estudios actuales sobre la composición a nivel genético de las diferentes especies, así como la forma en que determinados genes influyen sobre los procesos embrionarios que conducen a la formación de un nuevo individuo muestran, que a lo largo de la evolución, las diferencias son relativamente pequeñas cuando analizamos estos factores.

No obstante, en la naturaleza existe una gran diversidad morfológica y estructural de estos mismos individuos que haría suponer diferencias mucho más notables. Evolutivamente, las especies han sufrido adaptaciones que han conducido a estas notables diferencias morfológicas, independientemente de que, por parte de las estructuras implicadas, se hayan mantenido los mecanismos funcionales necesarios para la vida del individuo y de mantenimiento de la especie.

Como hemos visto en los capítulos anteriores, la existencia de un elemento tan importante como las membranas basales sigue siendo objeto de estudio, dada la extraordinaria variabilidad y complejidad de moléculas que las constituyen, y aún más cuando el problema lo centramos en la membrana basal glomerular con una función importantísima para la vida del individuo y que frecuentemente se ve implicada en las patologías de carácter renal.

El hecho de que desde el punto de vista experimental, cada vez se incorporen nuevas especies como animales de laboratorio, cuya morfología estructural todavía no es totalmente conocida en detalle, nos ha hecho plantear como objeto de este estudio el analizar en un primer lugar si existen diferencias morfológicas estructurales entre especies aparentemente próximas de una familia zoológica, como la de los roedores, a nivel del corpúsculo renal comparando la morfología de un animal estándar de laboratorio, como es el ratón de laboratorio *Mus musculus*, con especies silvestres como son *Mus spretus*, *Apodemus sylvaticus* y *Clethrionomys glareolus*.

En segundo lugar y una vez conocida esta morfología, entraremos a analizar con detalle como se distribuyen dos de las moléculas principales, como son la fibronectina y la laminina, en la composición de las membranas basales de dicho corpúsculo renal,

Finalmente, el estudio pormenorizado de los componentes de una determinada estructura, cuando se comparan especies de un determinado grupo, nos permitirá analizar los resultados no sólo desde un punto de vista puramente morfológico sino también desde una vertiente evolutiva, que nos ayude también a comprender las convergencias o divergencias posibles entre especies aparentemente próximas.

3 Material y Métodos

3.1 Animales utilizados y obtención de muestras

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se han utilizado individuos adultos de varias especies de roedores, que han incluido a *Mus musculus* (de la cepa isogénica de ratón BALB/c), *Mus spretus*, *Clethrionomys glareolus* y *Apodemus sylvaticus*.

Los individuos pertenecientes a la especie *Mus musculus* fueron proporcionados por el estabulario de la Facultad de Medicina de la U.B., estos ejemplares han sido utilizados no tan sólo como material de estudio sino como ejemplares control de todo el trabajo con el fin de comparar los resultados obtenidos en las especies salvajes.

Los individuos de las otras especies de roedores procedían de capturas "*in vivo*" realizadas en el medio natural, en el curso de diferentes campañas de captura, llevadas a cabo durante los años 1999-2000 y proporcionados por el Prof. Dr. J. Gosálbez de la sección de micromamíferos del Departamento de Biología Animal (Zoología-Vertebrados) de la Facultad de Biología de la U.B.

Para la obtención del material histológico utilizado, los especímenes fueron previamente preanestesiados con éter y posteriormente sacrificados mediante dislocación cervical.

Los riñones fueron extraídos y procesados mediante diversas técnicas para microscopía óptica y electrónica de transmisión.

3.2 Técnicas de microscopía óptica

Para el estudio en microscopía óptica se utilizaron métodos de coloración como el PAS-Azul de Alcian, y técnicas de inmunohistoquímica. De este modo, con una parte de las muestras se seguirá el protocolo destinado a la tinción PAS-Azul de Alcian mientras que con la otra se seguirá un protocolo inicial común para las técnicas inmunohistoquímicas.

3.2.1 Tinción PAS-Azul de Alcian

La tinción doble PAS-Azul de Alcian es específica para las láminas basales. La reacción presenta un color intermedio entre el rojo y el azul, debido a la coexistencia de sustancias glucídicas ácidas y neutras.

Las muestras se fijan en solución alcohólica de Bouin y se incluyen en parafina, de acuerdo con los protocolos tradicionales. Posteriormente, se obtienen secciones de 6-8 μ con un microtomo Leitz 1512.

Las secciones obtenidas en parafina se procesaron con el siguiente protocolo:

- Desparafinado de las muestras, según método estándar.
- Incubación en una solución de Azul de Alcían al 0.5% y ácido acético al 3% en agua destilada durante 15 min.
- Lavado con agua corriente hasta que la muestra deje de desprender coloración azul.
- Lavado con agua destilada 5 min.
- Incubación durante 5 min. en solución de ácido peryódico al 0.5% en agua destilada.
- Lavado con agua corriente durante 2 min.
- Incubación con el reactivo de Schiff (Carlo Erba) durante 15 min.
- Lavado enérgico en agua destilada.
- Lavado bajo agua corriente durante 5-10 min.
- Deshidratación de las muestras según método standard y montaje con DPX.

Las muestras se observan y fotografían en un microscopio Olympus Vanox-S

3.2.2 Inmunohistoquímica

En el caso de las muestras que se utilizaron para llevar a cabo las técnicas de inmunohistoquímica, se fijaron en una solución mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en PBS (NaCl 7.650 gr, Na₂HPO₄ 0.7gr, KH₂PO₄ 0.210 gr

disueltos en 1 litro de agua destilada) donde se mantienen a 4°C durante 12 horas. Seguidamente se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS y se bloquean con una solución de NH₄Cl 50 mM en PBS durante 90 minutos a 4°C.

Se efectúan dos nuevos lavados con PBS durante 10 minutos y se crioprotegen con sucrosa al 30% en PBS adicionada de azida sódica al 0,01%.

Posteriormente, se congelan con nitrógeno líquido y se cortan, mediante un criostato (Reichert-Jung modelo 2800), para la obtención de secciones de 10µ de grosor que se procesarán posteriormente según la técnica a utilizar

3.2.2.1 Inmunoperoxidasa

Las criosecciones para el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa se procesaron según el siguiente protocolo:

- Bloqueo de las reacciones inespecíficas por parte de los anticuerpos con glicina 0.1 M en PBS, dos lavados de 5 min. cada uno.

- Inhibición de la peroxidasa endógena, mediante una solución formada por 1.7 ml de H₂O₂ al 0.5% y metanol al 10% en PBS preparada y utilizada al momento. En esta solución se dejan los cortes durante un espacio de 30 minutos.

- Lavados con PBS, dos lavados de 5 min. de duración cada uno de ellos.

- Bloqueo de reacciones inespecíficas en la muestra mediante inmersión en una solución de ovoalbúmina al 5% en PBS durante una hora; se realizan tres lavados de 20 min. en agitación continua.

- Incubación con un primer anticuerpo.

Se utiliza un primer anticuerpo comercial en cada uno de los grupos de muestras utilizados, que son: anti-laminina (Gibco) o anti-fibronectina (ICN).

Los anticuerpos se diluyen en la solución de ovoalbúmina al 5% en PBS, en las siguientes proporciones:

- anti-laminina 1:200
- anti-fibronectina 1:100

Estas proporciones se obtuvieron a partir de ensayos previos que permitieron determinar la dilución óptima en cada caso para la anti-laminina y la anti-fibronectina.

- Incubación de la muestra durante toda la noche a 4°C.

- Dos lavados de 5 min. en PBS.

- Nuevo bloqueo de la muestra. El bloqueo se efectúa con una solución de leche Mólico (Nestlé) al 5% en PBS durante una hora. Se realizan tres lavados de 20 min. en agitación continua.

- Incubación con un segundo anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente. Se utiliza un anticuerpo comercial (Dako) conjugado con peroxidasa y diluido en solución de leche Mólico al 5% en proporción 1:50.

- Dos lavados de 5 min. con PBS.

- Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo.

La reacción antígeno-anticuerpo se revela con una solución de diaminobencidina formada por: 5 mg. de diaminobencidina, 10 μ l de H₂O₂ al 30% y PBS hasta 10 ml. Las muestras se dejan en esta solución hasta que se pueda observar la aparición de una coloración amarronada.

- Lavado de las muestras con agua destilada para detener la reacción de coloración. En todos los casos, las muestras no deben dejarse más de cinco minutos en la solución de diaminobencidina para evitar el ruido de fondo.

- Contrastado de la reacción.

Las muestras se tiñen durante 2-3 seg. con una solución de hematoxilina de Harris, y a continuación se lavan con agua corriente hasta que vire el colorante.

- Montaje de las muestras.

Las muestras ya contrastadas se deshidratan, de modo convencional, en una serie de alcoholes de concentración creciente, desde alcohol de 70° hasta alcohol absoluto, seguidos de una inmersión en xilol y montaje con DPX.

Las muestras se observan y fotografían en un microscopio Olympus Vanox-S

3.2.2.2 Inmunofluorescencia

Las criosecciones para el estudio por inmunofluorescencia se procesan de forma análoga al protocolo empleado para las muestras utilizadas para la técnica de inmunoperoxidasa, introduciendo las modificaciones necesarias.

- Bloqueo con glicina 0.1 M en PBS, dos lavados de 5 minutos cada uno.

- Lavado en PBS, dos lavados de 5 minutos cada uno.

- Bloqueo con la solución de ovoalbúmina 5% en PBS durante una hora. Tres lavados de 20 minutos cada uno en agitación continua.
- Incubación con los anticuerpos específicos, anti-laminina o anti-fibronectina y según las diluciones anteriormente mencionadas, a 4°C durante toda la noche.
- Lavado con PBS, dos lavados de 5 minutos cada uno.
- Bloqueo con la solución de Molico (Nestlé) 5% en PBS. Se realizan tres lavados de 20 minutos cada uno.
- Incubación con el segundo anticuerpo comercial (Dako), en este caso unido a fluoresceína (FITC) durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Lavado con PBS. Se realizan dos lavados de 5 minutos cada uno.
- Montaje de las muestras. Las muestras se montan directamente con la solución comercial Fluoroprep (BioMerieux) y se fotografían inmediatamente en un microscopio Olympus Vanox-S. Una vez fotografiadas se guardan en oscuridad a 4°C manteniéndose así la fluorescencia, aproximadamente, durante una semana.

3.3 Técnicas de microscopía electrónica de transmisión

3.3.1 Técnica estándar de microscopía electrónica de transmisión

Las muestras renales para realizar el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión se seccionan en porciones que permitan el correcto procesado (éstas

deben presentar un tamaño aproximado del orden de 1 mm³) y deben incluir tanto corteza como médula renal.

Las secciones obtenidas se procesaron según el siguiente protocolo:

- Fijación de las muestras en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en PBS (0.1M, pH 7,2-7,4) durante 12 horas a 4°C.
- Lavado con PBS. Se realizan tres lavados de 10 minutos de duración cada uno de ellos a 4°C.
- Post-fijación con tetróxido de osmio al 4% tamponado con PBS a partes iguales.
- Deshidratación del tejido mediante baños sucesivos en gradientes crecientes de etanol, en etanol-acetona y en acetona según se describe a continuación:
 - 15 minutos en etanol de 30°
 - 15 minutos en etanol de 50°
 - 15 minutos en etanol de 70°
 - 3 baños de 10 minutos en etanol de 90°
 - 3 baños de 20 minutos en etanol de 100°
 - 15 minutos en etanol de 100° y acetona a partes iguales
 - 15 minutos en acetona
 - 30 minutos en acetona
- Inclusión en medio plástico de Araldite obtenido a partir de la mezcla de sus componentes en las siguientes proporciones:
 - 10 cc de componente A (resina epoxy)
 - 10 cc de componente B (endurecedor)
 - 0.3 cc de componente C (acelerador)

- 0.2 cc de componente D (polimerizante)

Para la inclusión las muestras se introducen primero en una mezcla de acetona y Araldite a partes iguales durante un mínimo de 60 minutos con el fin de sustituir progresivamente la acetona por el material plástico.

- Elaboración de los moldes:

Las muestras se colocan en las casillas para realizar los moldes; éstas se rellenan con Araldite y se nomenclaturan. Al cabo de 1 hora a temperatura ambiente los moldes se introducen en la estufa de polimerización a 50°C; transcurrida 1 hora, se eleva la temperatura de la estufa a 60°C y se dejan las muestras en ella durante 12 horas. A continuación se controla la textura y el nivel de los moldes, adicionando más plástico si es necesario, dejando las muestras durante 36 horas más. Al cabo de este tiempo, se extraen los moldes de la estufa.

- Realización de cortes semifinos control (1.5-2 μ) mediante un microtomo 1100 AUTOCUT (Reichert-Jung). Las cuchillas de vidrio para realizar los cortes fueron confeccionadas con un aparato LKB.

- Tinción de los cortes semifinos con azul de metileno al 0.5%, preparado de la siguiente forma: Disolver en baño de agua a 50° C, 0.5 gr. de azul de metileno con 100 ml de agua destilada. A continuación añadir 0.5 gr. de tetraborato sódico cristalizado (bórax). Filtrar antes de utilizar.

- Visualización al microscopio óptico de los cortes teñidos y elección de la zona más apropiada para la posterior confección de nuevos cortes que se utilizaran para la observación con microscopio electrónico de transmisión.

- Repiramidación del bloque y realización de cortes ultrafinos con la ayuda de un ultramicrotomo ULTRACUT (Reichert-Jung). Montaje de los cortes sobre rejillas de 300 mallas, seguido de doble contraste de los cortes con acetato de uranilo y citrato de plomo.

- Primer contraste de los cortes con acetato de uranilo en solución acuosa al 10%. Esta solución se mezcla a partes iguales con alcohol de 95°.

Las rejillas se depositan sobre una gota de la solución de acetato de uranilo-agua-alcohol durante un tiempo de 20-30 minutos en semioscuridad.

- Tres lavados por inmersión en 10 cc. de H₂O mQ.

- "Jet wash", lavado rápido de la muestra con unos 10 ml. de H₂O mQ/rejilla.

- Secado sobre papel de filtro Whatman de 1 mm.

Una vez secas las muestras, se procede al segundo contraste con solución de citrato de plomo obtenido según la siguiente metodología:

- 1,33 gr. de nitrato de plomo cristalizado

- 1,76 gr. de citrato de sodio tribásico

- 30 cc. de agua destilada

Se agita durante una media hora, dejándolo reposar de vez en cuando para permitir la formación de citrato de plomo, pasado este tiempo, se añaden:

- 8 cc. de hidróxido sódico 1N

- 9 cc. de agua destilada

De esta forma se consigue una solución de citrato de plomo que debe quedar totalmente transparente. Si la solución presenta cierto grado de turbidez, ésta debe centrifugarse.

Las rejillas se depositan sobre una gota de la solución final de citrato de plomo durante un tiempo de 10 minutos en oscuridad.

- Tres lavados por inmersión en 10 cc. de H₂O mQ. En el primer pocillo de lavado se adicionan 5 cc. de hidróxido sódico, 1N.

- "Jet wash", lavado rápido de la muestra con unos 10 ml. de H₂O mQ/rejilla.

- Secado sobre papel de filtro Whatman de 1 mm.

Las rejillas fueron observadas y fotografiadas a 80 Kv mediante un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301 del Serveis Científicotècnics de la U.B.

3.3.2 Inmunolocalización mediante oro coloidal en secciones ultrafinas de Lowicryl

Una vez obtenidos los riñones, las muestras para microscopía electrónica de transmisión se seccionan, para poder llevar a cabo un correcto procesado, en porciones lo más pequeñas posibles, 1 mm³ aproximadamente, cuidando de que incluyan corteza y médula renal.

- Fijación de las muestras en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en PBS.

- Realización de bloques con Lowicryl (resina hidrosoluble que permite la inmunolocalización sin que sea necesario eliminarla previamente mediante la utilización de acetonas) según metodología estándar para mantener al máximo la antigenicidad junto a la ultraestructura.

-
- Realización de cortes semifinos (1.5-2 μ) mediante el microtomo 1100 AUTOCUT (Reichert-Jung). Las cuchillas de vidrio fueron confeccionadas con un aparato LKB.

 - Tinción de las secciones semifinas con azul de metileno al 0.5%, preparado de la siguiente forma: Disolver en baño de agua a 50° C, 0.5 gr de azul de metileno con 100 ml de agua destilada. A continuación añadir 0.5 gr de tetraborato sódico cristalizado (bórax). Filtrar antes de ser utilizado.

 - Visualización al microscopio óptico de los cortes teñidos y elección de la zona más apropiada para la posterior confección de nuevos cortes que se utilizaran para la observación con microscopio electrónico de transmisión.

 - Repiramidación del bloque y realización de cortes ultrafinos con la ayuda de un ultramicrotomo ULTRACUT (Reichert-Jung). Montaje de los cortes sobre rejillas recubiertas con membrana de formvar y depósito de carbono.

La inmunolocalización a nivel de los cortes se realiza según el siguiente protocolo:

- Hidratación-bloqueo (hidratación de los cortes y bloqueo de las reacciones inespecíficas) en una solución de glicina 0.1 M en PBS, dos lavados de 5 min. cada uno (el PBS debe filtrarse previamente en todos los casos).

- Nuevo bloqueo con ovoalbúmina al 2% en PBS durante 30 min. (la solución ovoalbúmina-PBS se centrifuga previamente a 13.000 r.p.m. durante 5 min.).

- Incubación de la muestra con uno de los anticuerpos primarios, anti-laminina o anti-fibronectina, durante 2 h. en cámara húmeda.

Ambos anticuerpos, anti-laminina o anti-fibronectina, se disuelven en una solución de ovoalbúmina al 1% en PBS, centrifugada previamente a 13000 r.p.m. 5 min. La concentración utilizada para estos anticuerpos ha sido respectivamente de:

- anti-laminina 1:200

- anti-fibronectina 1:100

- Lavado con glicina 0.1 M en PBS, tres lavados de 5 min. de duración cada uno de ellos.

- Incubación con proteína A conjugada a oro coloidal de 15 nm durante 1 h. en cámara húmeda. La proteína A se disuelve a concentración 1:35 en una solución de ovoalbúmina al 1% en PBS centrifugada a 13.000 r.p.m. durante 5 min. La solución final se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 5 min..

- Dos lavados de 5 min. cada uno de ellos con PBS.

- "Jet wash", lavado rápido de la muestra con unos 10 ml. de H₂O mQ/rejilla.

- Secado sobre papel de filtro Whatman de 1 mm.

- Primer contraste de los cortes con acetato de uranilo en solución acuosa al 2% durante 30 min.

- "Jet wash", lavado rápido de la muestra con unos 10 ml. H₂O mQ/rejilla.

- Segundo contraste de los cortes con solución de citrato de plomo (Reynolds, 1963) durante 10 min.

- "Jet wash", lavado rápido con unos 10 ml. H₂O mQ/rejilla.

- Secado sobre papel de filtro Whatman de 1 mm durante 10-15 min.

Las rejillas fueron observadas y fotografiadas a 80 Kv mediante un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301 del Serveis Científicotècnics de la U.B.

4 Resultados

El estudio morfológico de la membrana basal glomerular de las diferentes especies de roedores utilizados ha tenido como elemento base, el riñón de ratón adulto *Mus musculus*, esta especie ha servido de elemento control, ya que es una de las especies más utilizadas en el laboratorio y de las que se tienen mayor número de datos desde el punto de vista experimental.

De este modo, hemos analizado los diferentes tipos celulares que conforman el corpúsculo renal, primero en el ratón y luego en las otras especies de roedores silvestres, para ver si existían diferencias morfológicas apreciables entre estos especímenes, que a su vez pudieran explicar posibles diferencias en cuanto a la presencia de la fibronectina y la laminina a nivel de la membrana basal glomerular y de la matriz mesangial, ya que existen amplias divergencias entre los autores en cuanto a la distribución de estas moléculas tanto a nivel intraglomerular como en las láminas basales peritubulares.

Al microscopio óptico, la utilización de una tinción específica para láminas basales como es el PAS-Azul de Alcían, muestra una imagen característica de la estructura del tejido renal, en la que puede observarse una zona cortical, teñida más intensamente, en la que se localizan la mayoría de los corpúsculos renales y una zona medular, más pálida y formada en su mayor parte por prolongaciones tubulares, sin

que sea aparentemente visible una clara discontinuidad entre ambas zonas (Figs. 1-2).

Cuando se observan estas muestras a mayores aumentos, la tinción delimita de forma clara la lámina basal de la pared de la cápsula glomerular (de Bowman) y las láminas basales tubulares, en este caso se pueden diferenciar túbulos contorneados proximales y distales, presentando los túbulos proximales una mayor reacción acidófila, un epitelio ligeramente más alto que el de los túbulos distales y encontrándose su luz parcialmente ocupada por un ribete en cepillo que protruye hacia el interior de la luz del túbulo, por el contrario los túbulos contorneados distales presentan una menor reacción acidófila, su luz es aparentemente más amplia y su borde interno se encuentra bien delimitado. En el interior del corpúsculo renal, a nivel del glomérulo se observa la presencia de dos coloraciones bien definidas, una de tonalidad rojiza, que corresponde a la matriz mesangial y otra de aspecto azulado que se relaciona con las paredes del ovillo vascular, y que a su vez es claro reflejo de la presencia de diferentes componentes en ambas estructuras (Fig. 3).

Siguiendo con el estudio de las muestras a microscopía óptica, hemos utilizado dos anticuerpos, uno anti-fibronectina y otro anti-laminina, con el fin de poder detectar la presencia y localización de estas moléculas de una forma más precisa. Para visualizarlas, en ambos casos se han utilizado dos anticuerpos secundarios, uno conjugado con peroxidasa y el otro con fluoresceína, siendo todos los anticuerpos utilizados de carácter comercial.

Mediante la técnica de la inmunoperoxidasa, en el riñón adulto de ratón, no aparece una reacción positiva a nivel de las láminas basales tubulares que determine la presencia de fibronectina, aunque si puede observarse un marcaje positivo en el tejido conectivo presente en el espacio peritubular (Fig. 4).

A nivel del corpúsculo renal, la cápsula glomerular no presenta marcaje positivo para la fibronectina. No obstante, a nivel de la membrana basal glomerular sí que se evidencia el marcaje positivo para dicha molécula. En el caso del tejido mesangial, el marcaje también parece ser positivo a la presencia de la fibronectina (Fig.5).

Para determinar la presencia de fibronectina también se ha utilizado la técnica de la inmunofluorescencia, mostrando esta técnica resultados semejantes a los de la inmunoperoxidasa en lo referente a la presencia de dicha molécula. Así, el marcador no se localiza en las láminas basales de los túbulos renales sino en el tejido conectivo que rodea a estos túbulos (Figs. 6-7).

En el caso del corpúsculo renal, la técnica de la fibronectina-inmunofluorescencia, no muestra marcaje positivo a nivel de la cápsula glomerular, apareciendo tan sólo una reacción positiva en el interior del glomérulo asociada probablemente a la membrana basal glomerular, en este caso tampoco podemos concluir con toda certeza que exista marcaje positivo a la fibronectina en la matriz mesangial (Fig. 8).

Cuando utilizamos la técnica de la inmunoperoxidasa en el riñón adulto de ratón para determinar la presencia de laminina, aparece un marcaje positivo a dicha molécula localizado a nivel de las láminas basales de los túbulos renales, sin que existan diferencias visibles entre las distintas porciones tubulares (Figs. 9-10).

A nivel del corpúsculo renal el marcaje positivo pone de manifiesto la presencia de laminina en la cápsula glomerular, a diferencia de lo que ocurre con la fibronectina. Aquí, el marcaje positivo aparece bien circunscrito a la pared de la cápsula glomerular igual que, también es claramente visible a nivel de la membrana basal glomerular, de forma semejante a lo que ocurre con la fibronectina. Además, y también a nivel glomerular, se puede apreciar un marcaje difuso que puede indicar la existencia de una reacción positiva del componente mesangial, aunque en este caso

no podemos concluir si la coloración observada se debe a la existencia de laminina en la matriz mesangial o a un problema derivado de la propia técnica (ruido de fondo) (Figs. 9-10).

Del mismo modo que con la fibronectina, en el caso de la laminina también se ha utilizado la técnica de la inmunofluorescencia. Por medio de ésta técnica el marcaje para la laminina aparece de manera visible a nivel de las láminas basales de los túbulos renales (Figs. 11-13).

Cuando se estudia el corpúsculo renal, se confirma aquí también la presencia de un marcaje positivo por parte de la pared de la cápsula glomerular, mientras que en el glomérulo la positividad se relaciona con la membrana basal glomerular (Fig. 14).

En algunos casos parece que existe un claro marcaje positivo a la laminina en la zona del mesangio, no obstante y a pesar de la mayor resolución de esta técnica en comparación con la de la inmunoperoxidasa, este marcaje no siempre es visible en las muestras observadas, por lo que no podemos concluir tampoco mediante esta técnica de una clara presencia de la laminina a nivel de la matriz mesangial (Fig. 14).

En todos los casos, independientemente de la especie utilizada, las muestras han mostrado resultados parecidos, por ello y dado que algunos de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de microscopía óptica utilizadas, hasta ese momento no eran concluyentes, hemos empleado técnicas de microscopía electrónica de transmisión, para poner de manifiesto resultados con una mayor fiabilidad sobre la presencia de la fibronectina y la laminina a estos niveles celulares en las distintas especies utilizadas en nuestro estudio.

Igual que en el caso de la microscopía óptica, el estudio control se ha realizado en muestras de riñón de ratón adulto, para posteriormente comparar los resultados obtenidos con los procedentes de las especies de roedores silvestres.

De este modo, se puede observar como las células que constituyen la denominada capa parietal, la pared de la cápsula glomerular, forman un epitelio de delgada pared, en la que las células presentan interdigitaciones que ayudan a superponerse unas a otras, entre estas interdigitaciones se encuentran elementos de unión como uniones estrechas y algún desmosoma. Los núcleos celulares, alargados, muestran heterocromatina asociada a la membrana nuclear, se encuentran rodeados por una delgada capa de citoplasma en el que se puede observar un retículo endoplásmico rugoso, formado por pequeños elementos tubulares, y algunas mitocondrias densas en las que apenas son visibles las crestas mitocondriales (Fig. 16).

A nivel de las células que constituyen el epitelio de la denominada capa visceral, el epitelio glomerular, se puede observar que éstas muestran un aspecto característico, se trata de células independizadas, los podocitos, que presentan un gran desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas denominadas procesos mayores, de éstos se originan unas prolongaciones de segundo orden, los pedicelos, que se extienden sobre la pared del capilar. Existe una gran cantidad de interdigitaciones entre las diferentes prolongaciones citoplasmáticas, si bien no se observan estructuras de unión entre las mismas. El núcleo de éstas células es de aspecto redondeado, presentando ocasionales indentaciones y mostrando la presencia de una importante cantidad de heterocromatina en relación con la membrana nuclear (Figs. 17-19).

En el citoplasma que se sitúa próximo al núcleo, se pueden observar la mayor parte de los orgánulos citoplasmáticos que posee la célula, retículo endoplásmico rugoso, generalmente formado por pocas cisternas, relativamente largas; abundante número de ribosomas libres o en forma de rosetas, y un número variable de vesículas; las

mitocondrias son escasas y presentan crestas bien diferenciadas. En el interior de los procesos mayores y de los pedicelos el número de orgánulos citoplasmáticos es mucho menor, así las mitocondrias son escasas y presentan un pequeño tamaño siendo relativamente densas a los electrones, y el retículo endoplásmico rugoso y los ribosomas también disminuyen en número, por el contrario a nivel de los pedicelos se puede observar, en ocasiones, de forma dispersa numerosos microtúbulos y microfilamentos (Fig. 20).

Morfológicamente, los pedicelos presentan un aspecto a modo de pequeños dedos alargados que se expanden ligeramente al aproximarse a la superficie de la membrana basal glomerular, manteniendo siempre un espacio libre entre los mismos, la denominada hendidura de filtración. A nivel de las superficies próximas de estas dilataciones de los pedicelos se observa la presencia entre éstos de un material amorfo a modo de membrana intersticial. En algunos puntos, el material amorfo se ve sustituido por la presencia de una estructura laminar delgada, generalmente simple, conocida como diafragma de hendidura que también, al igual que la membrana basal glomerular, es un elemento activo en el proceso de la filtración glomerular (Figs. 20-21).

Las células que conforman la pared del endotelio capilar, muestran un núcleo, situado generalmente en la porción del capilar que mira hacia el espacio capsular, esta zona de la célula endotelial es la más gruesa, ya que a partir de este punto, la célula rápidamente se adelgaza para conformar una delgada pared citoplasmática que conforma la luz del capilar. Cuando se le observa en toda su extensión, este núcleo se muestra relativamente denso a los electrones, y con una mayor cantidad de heterocromatina en la porción más próxima a la membrana nuclear. Como ya hemos indicado, se observa que el citoplasma se extiende a lo largo de la circunferencia de la luz capilar, en este citoplasma se observan unas pocas y pequeñas mitocondrias, generalmente próximas al núcleo. También, pueden observarse dispersas por la

delgada capa citoplasmática numerosas cisternas del retículo endoplasmático liso y rugoso, así como numerosas vesículas citoplasmáticas relacionadas tanto con la membrana celular que da a la luz del capilar, como con la que entra en contacto con la membrana basal glomerular.

En ocasiones pueden observarse complejos de unión entre las células endoteliales del tipo *macula occludens*. También, en los extremos en los confluyen las prolongaciones citoplasmáticas de dos células endoteliales, después de rodear la luz del capilar, aparecen interdigitaciones celulares que contribuyen a cerrar la luz a modo de *zonula occludens*. La mayor parte de la porción de pared de la célula endotelial que no está ocupada por el núcleo de la célula, muestra numerosos poros o fenestraciones abiertas (Figs. 22-23).

Las células mesangiales son fácilmente reconocibles, interpuestas en los espacios entre los capilares glomerulares, presentan, en general, un carácter electrodense en toda la superficie celular. El aspecto del citoplasma mesangial es marcadamente electrodense, en el mismo se encuentran numerosas mitocondrias, diferentes formaciones vesiculares, así como un retículo endoplásmico rugoso formado por pequeñas y abundantes cisternas. Los núcleos muestran un aspecto irregular, con numerosas indentaciones en su superficie, con marcado nucléolo y cromatina muy densa (Fig. 16).

Hemos dejado la descripción de la membrana basal glomerular en un último término, ya que hasta aquí, las diferencias morfológicas que hemos podido observar en el estudio de los riñones de las diferentes especies utilizadas, si existen, no podemos afirmar ni cuantificar como propias de una u otra especie, esto no es así en el caso de la membrana basal glomerular.

La membrana basal glomerular, constituye el principal elemento de filtración, presenta un grosor relativamente uniforme que únicamente se ve alterado en algunos puntos en relación con algún espacio interpedicelario o en algún cambio en la superficie del capilar. Esta membrana se extiende entre la superficie de las expansiones de los pedicelos y la pared endotelial, encontrándose en el riñón de ratón doméstico formada por las tres laminas clásicamente descritas; una lámina densa, observable como más oscura, situada en posición central y dos láminas raras, electrónicamente más claras, una interna que se encuentra en contacto con la pared capilar y otra externa en contacto con los pedicelos (Figs. 17-23).

Por el contrario, en todas las especies silvestres del presente estudio, la descripción clásica de las tres láminas que conforman la membrana basal glomerular, no aparece claramente visible. En todos los casos, la porción que debería corresponder a la lámina densa, no muestra una elevada densidad que la haga fácilmente reconocible de las dos láminas raras; electrónicamente el material que conforma toda la membrana basal glomerular en estos casos parece ser mucho más homogéneo que lo hasta el momento descrito en otras especies estudiadas.

Otra característica notable, es la similitud, desde el punto de vista de la imagen electrónica que muestra el material extracelular que rodea a las células mesangiales. En las zonas en donde la membrana basal glomerular y la matriz extracelular mesangial entran en contacto, esta matriz tiene el mismo aspecto de densidad electrónica que la membrana basal glomerular, no existiendo discontinuidad entre uno y otro elemento. Desde un punto de vista descriptivo, diferenciamos de este modo a la membrana basal glomerular, en base a la superficie celular de contacto, como membrana basal glomerular pericapilar y como membrana basal glomerular perimesangial a aquella que se refleja y corresponde con la matriz mesangial (Fig. 25-29).

Para el estudio con el microscopio electrónico de transmisión, también hemos empleado el marcaje con anticuerpos, anti-fibronectina o anti-laminina, mediante la técnica de inmunolocalización mediante oro coloidal en secciones ultrafinas de Lowycril.

La presencia de la fibronectina, mediante ésta última técnica, muestra un marcaje positivo restringido a la matriz extracelular mesangial, no encontrándose reactividad positiva en ninguna de las membranas basales glomerulares pericapilar o perimesangial ni a nivel de las membranas basales peritubulares (Figs. 24-31 y 34-42).

Además de esta localización, también se puede observar marcaje positivo frente a la fibronectina a nivel de la matriz extracelular del tejido conectivo que rodea a las estructuras glomerulares (Figs. 32-33).

En todas las muestras observadas el grado de marcaje frente a la fibronectina es mucho menor en aquellas muestras procedentes de *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus* que el que se puede observar en *Mus musculus*.

El estudio con microscopía electrónica para la determinación de la presencia de la laminina, mediante la utilización de la técnica de inmunolocalización con oro coloidal en secciones ultrafinas de Lowycril, permite observar marcaje positivo tanto a nivel de la membrana basal glomerular pericapilar y perimesangial, como a nivel de la matriz mesangial.

En el caso de la membrana basal glomerular pericapilar, el marcaje, aparentemente, no se encuentra ligado en concreto a ninguna de las láminas que conforman esta membrana basal, si bien parece que podría existir una ligera apatencia a situarse a nivel de las láminas raras.

En el caso de *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus* el marcaje resulta igualmente positivo, si bien éste es de menor intensidad que en el caso de *Mus musculus* (Figs. 53-61).

La laminina, a diferencia de la fibronectina, también presenta marcaje positivo cuando observamos la lámina basal peritubular, y al igual que ocurre en el caso de las membranas basales, las muestras procedentes de *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus*, muestran una reacción menos intensa que la que se puede observar en *Mus musculus* (Fig. 51-52 y 62).

Las muestras procedentes de los ejemplares de *Apodemus sylvaticus*, en todos los casos y aún empleando diluciones que llegaron a ser de 1:10 no mostraron reactividad positiva frente a ninguno de los dos anticuerpos, anti-fibronectina o anti-laminina, utilizados. Además se utilizaron en este caso anticuerpos comerciales suministrados por otras marcas diferentes de las utilizadas originalmente con el resto de las muestras, no obteniéndose en ningún caso resultados satisfactorios sobre la localización de estas dos glicoproteínas en esta especie.

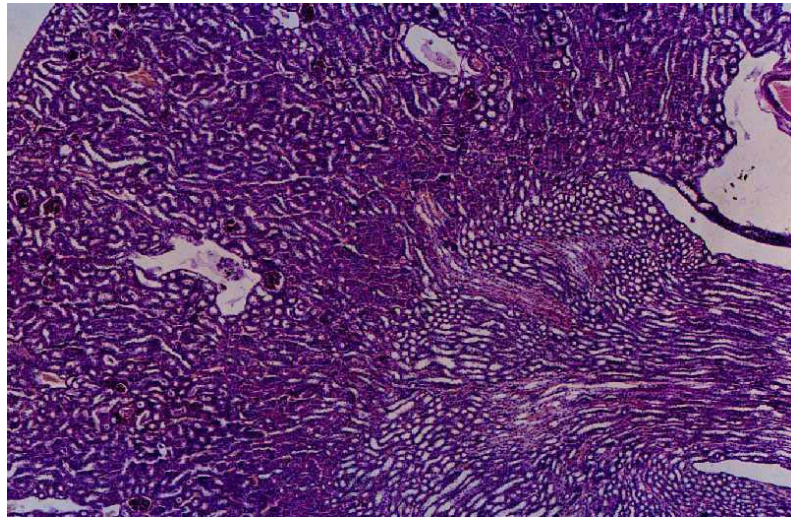


Figura 1. Riñón de *Mus musculus*. Tinción PAS-Hematoxilina. 30X.

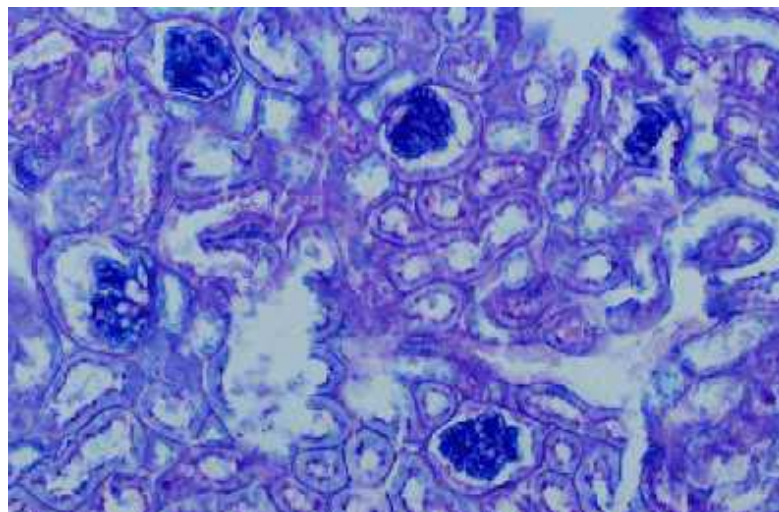


Figura 2. Imagen de riñón de *Mus musculus*, teñido mediante la doble, tinción PAS-Azul de Alcían. Obsérvese la estructura glomerular. 150X.

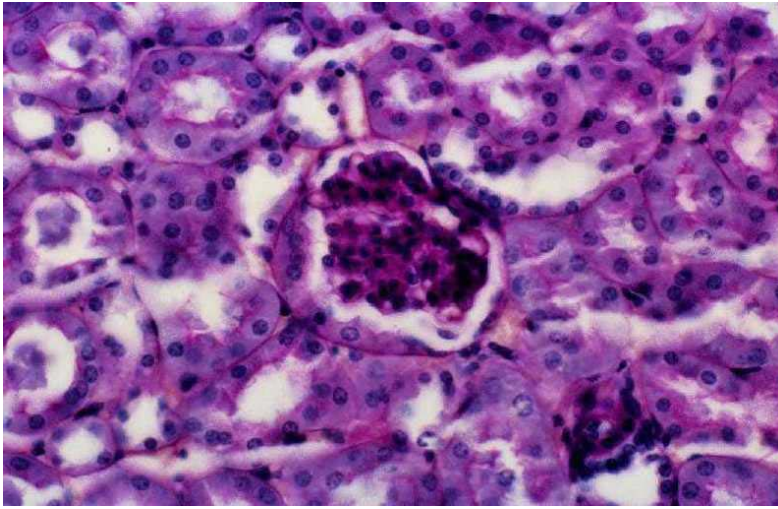


Figura 3. Detalle que muestra un glomérulo y la especificidad de la tinción en el marcaje de las láminas basales, así como de las estructuras ricas en glicosaminoglicanos. 300X.

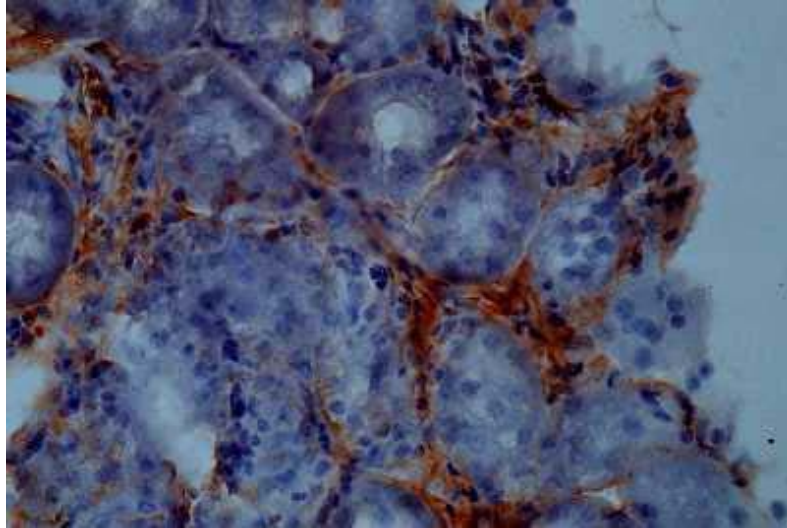


Figura 4. Riñón de *Mus musculus*. Fibronectina-Inmunoperoxidasa. El marcador se localiza en el tejido conectivo peritubular. 300X.

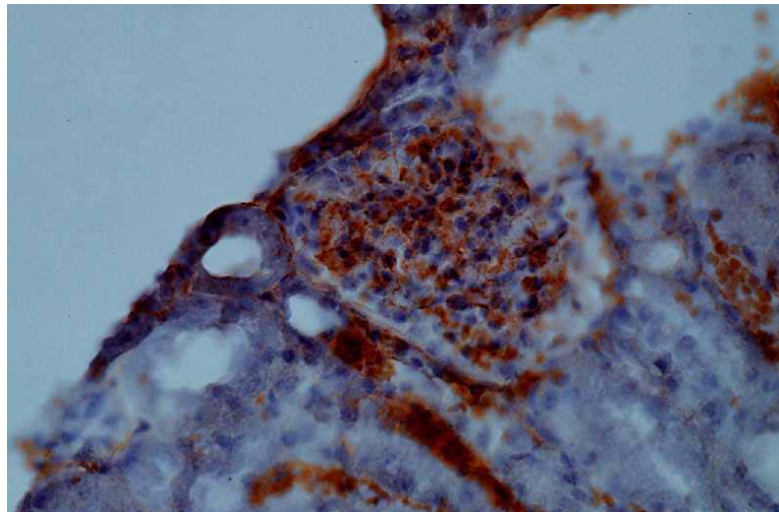
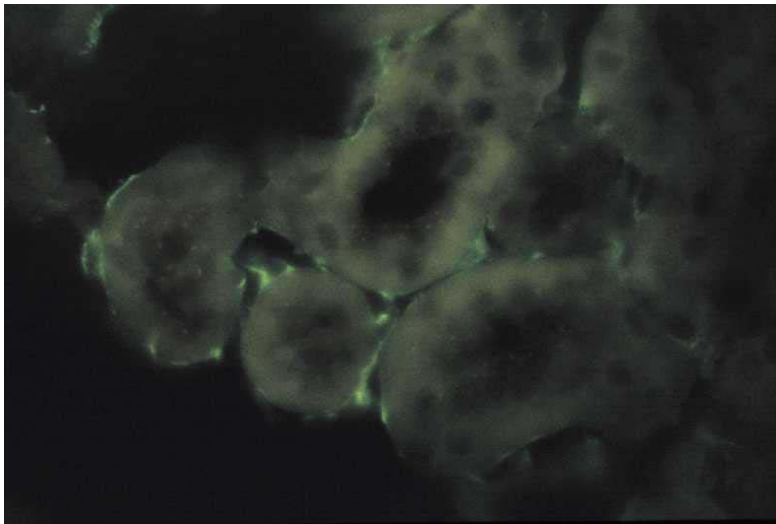
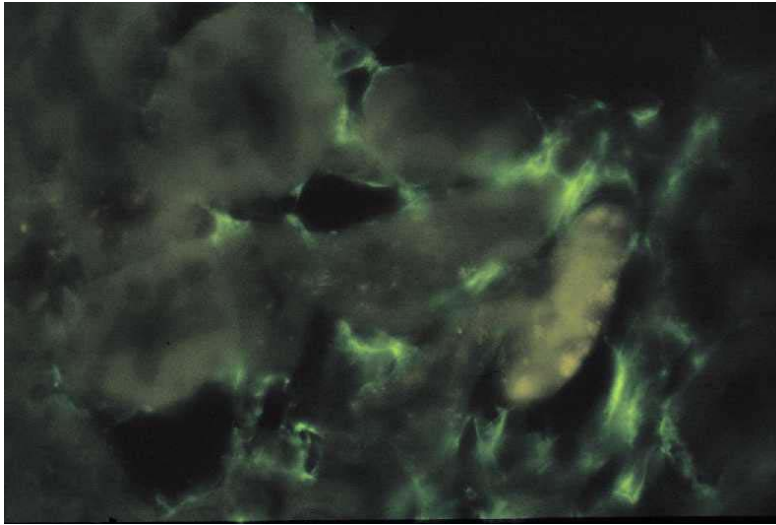


Figura 5. Riñón de *Mus musculus*. Fibronectina-Inmunoperoxidasa. En el interior del glomérulo se observa el marcaje a nivel de la membrana basal glomerular. 300X.



Figuras 6 y 7. Riñón de *Mus musculus*. Fibronectina-Immunofluorescencia. Se puede observar el marcador a nivel del tejido conectivo del espacio peritubular. 500X.

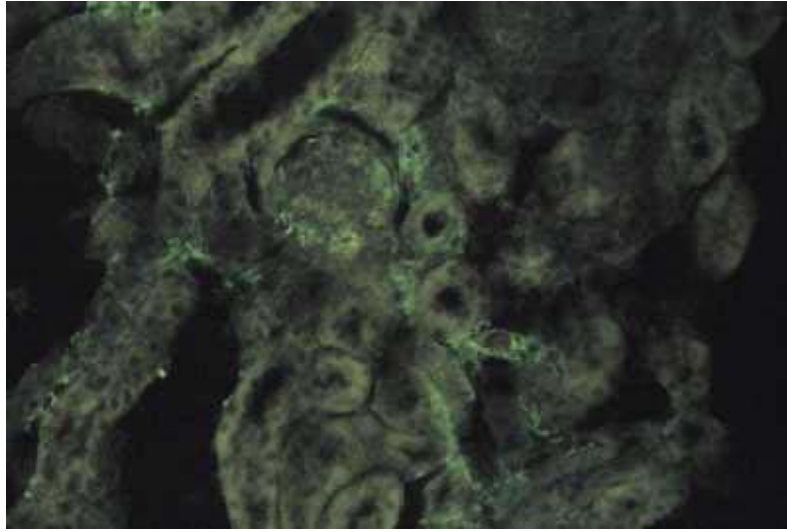
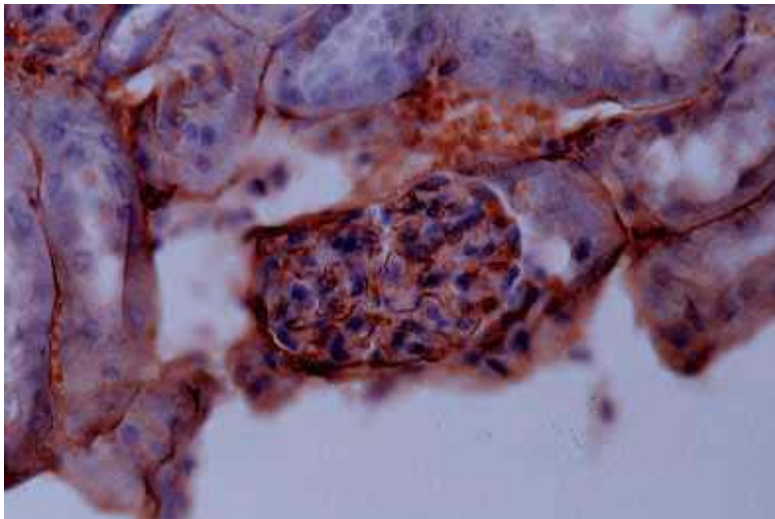
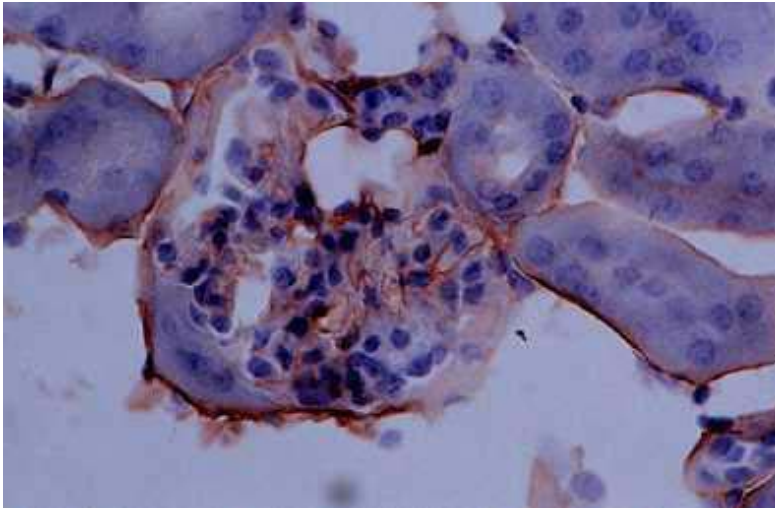
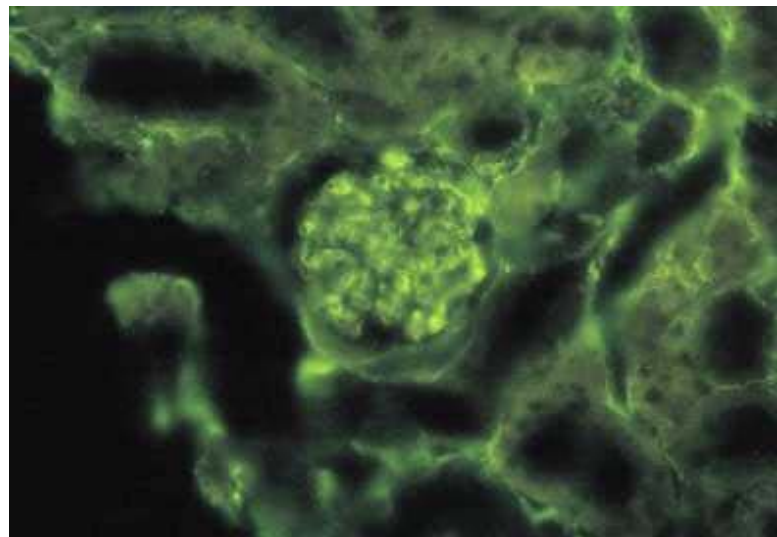
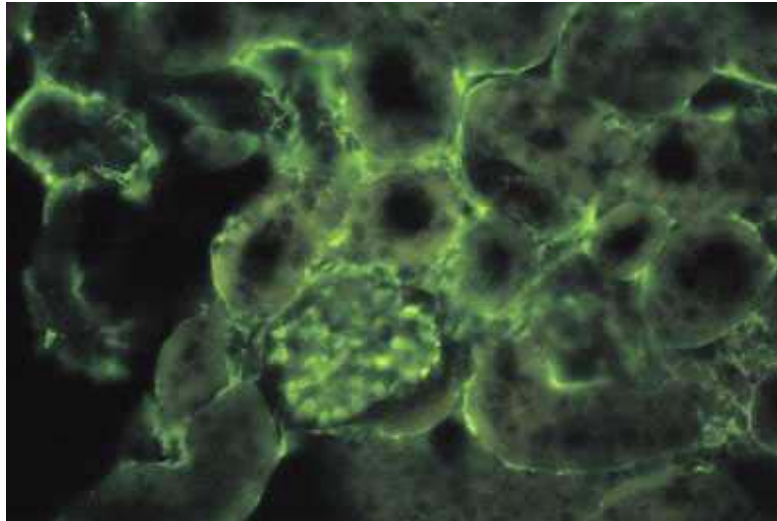


Figura 8. Riñón de *Mus musculus*. Fibronectina-Immunofluorescencia. La imagen muestra túbulos y un glomérulo. El marcador se encuentra localizado a nivel intraglomerular en la membrana basal glomerular. 200X.



Figuras 9 y 10. Riñón de *Mus musculus*. Laminina-Inmunoperoxidasa. Se observa la presencia del marcador en las láminas basales de los túbulos renales. A nivel glomerular es visible el marcaje positivo para la laminina a nivel de la cápsula de Bowman y en la membrana basal glomerular. 400X.



Figuras 11 y 12. Imágenes de riñón de *Mus musculus* en los que se ha aplicado la técnica de inmunofluorescencia. El anticuerpo anti-laminina se muestra positivo a nivel glomerular y en la periferia de los túbulos. 400X.

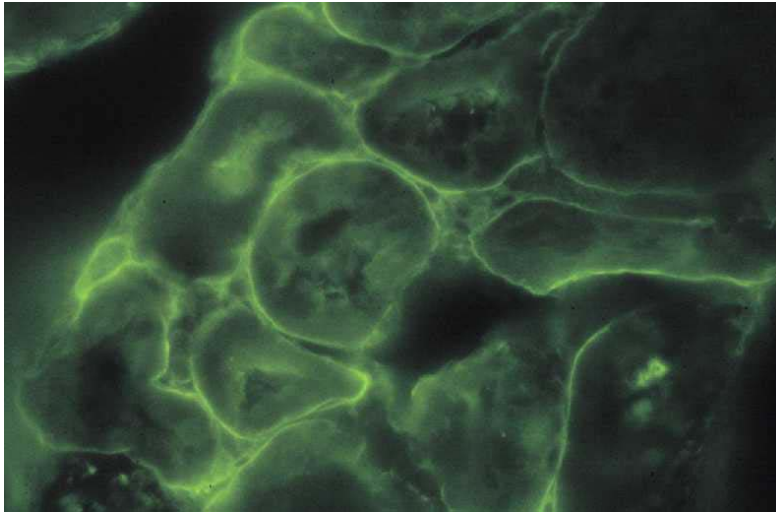


Figura 13. Riñón de *Mus musculus*. Laminina-Inmunofluorescencia. Se observa el marcador en las láminas basales de los túbulos renales. 500X.

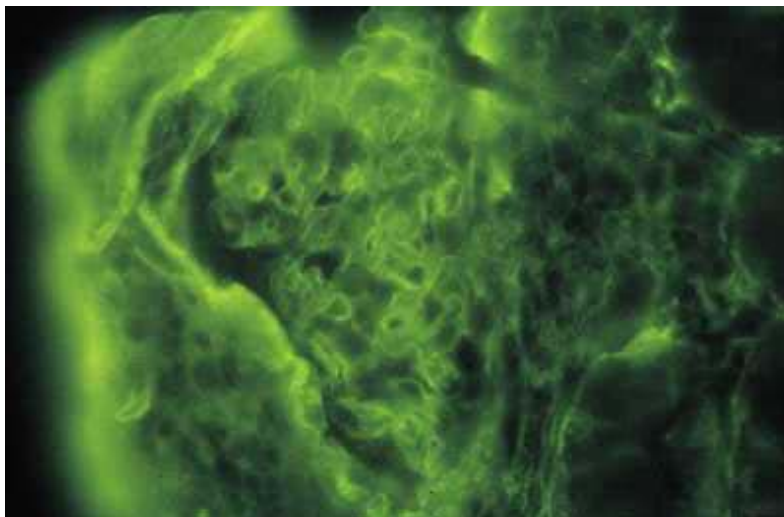


Figura 14. Riñón de *Mus musculus*. Laminina-Inmunofluorescencia. La laminina muestra reactividad a nivel de la cápsula de Bowman y en el interior del glomérulo a nivel de la membrana basal glomerular. 500X.

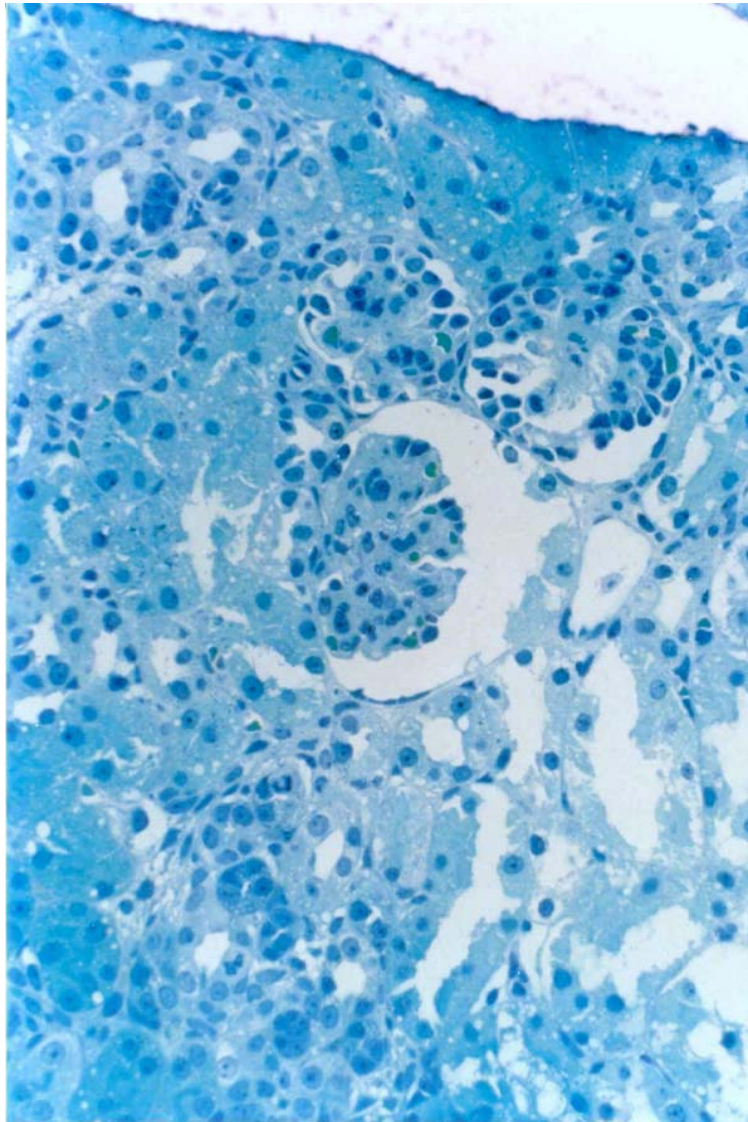


Fig. 15. Imagen de un corte semifino que muestra la presencia de varios corpúsculos renales. Azul de toluidina. *Mus musculus*. 400 X.

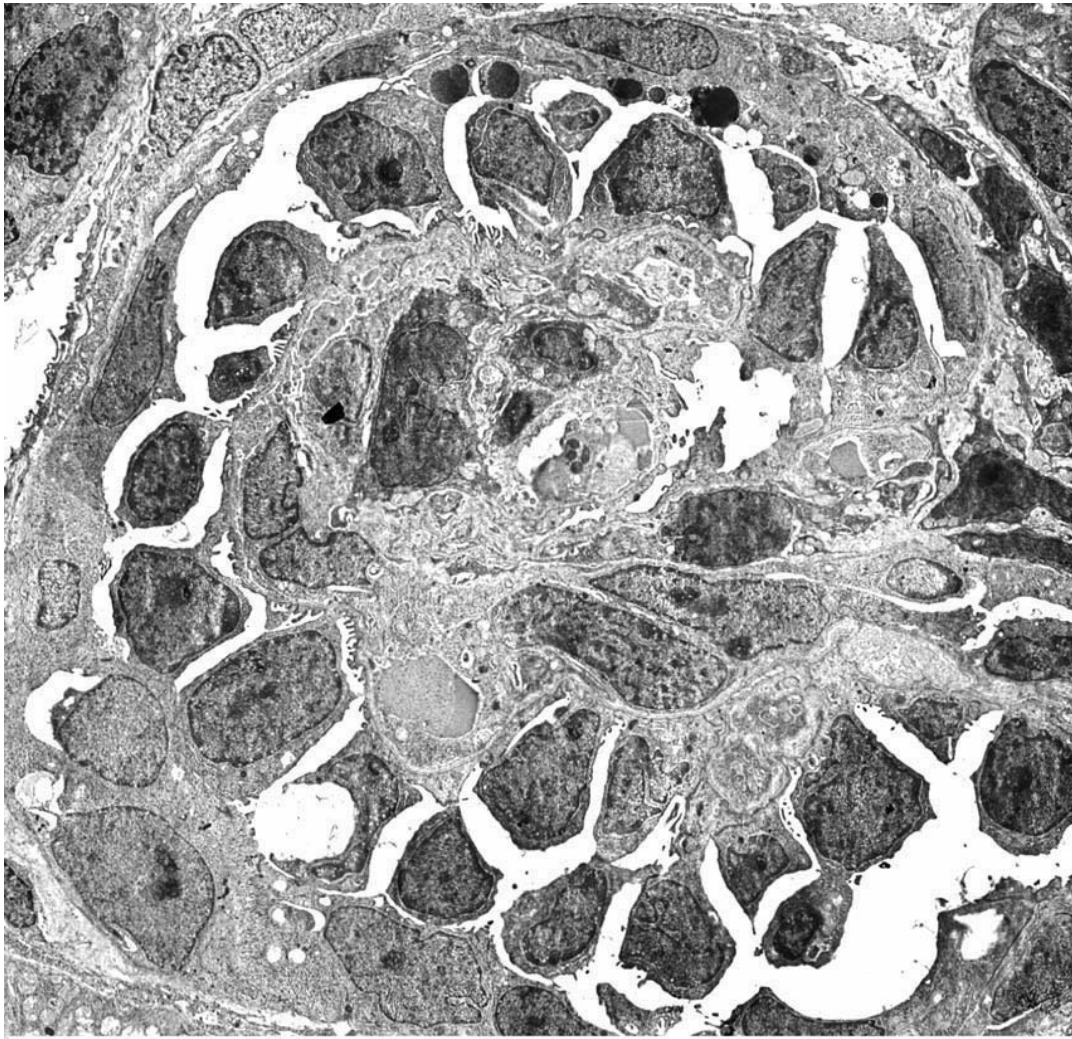


Fig. 16. Visión panorámica de un corpúsculo renal, mostrando el epitelio parietal de la cápsula renal, el espacio urinario, células del epitelio visceral y parte del ovillo capilar junto con células mesangiales. *Mus musculus*. 1.500 X.



Fig. 17. Imagen de capilares, rodeados por podocitos. Se puede observar perfectamente la formación de pedicelos por parte de los podocitos y su adhesión a la membrana basal glomerular. Esta membrana muestra su estructura trilaminar característica. Hacia el interior de la luz del capilar se pueden observar microproyecciones de las células endoteliales. *Mus musculus*. 4.000 X

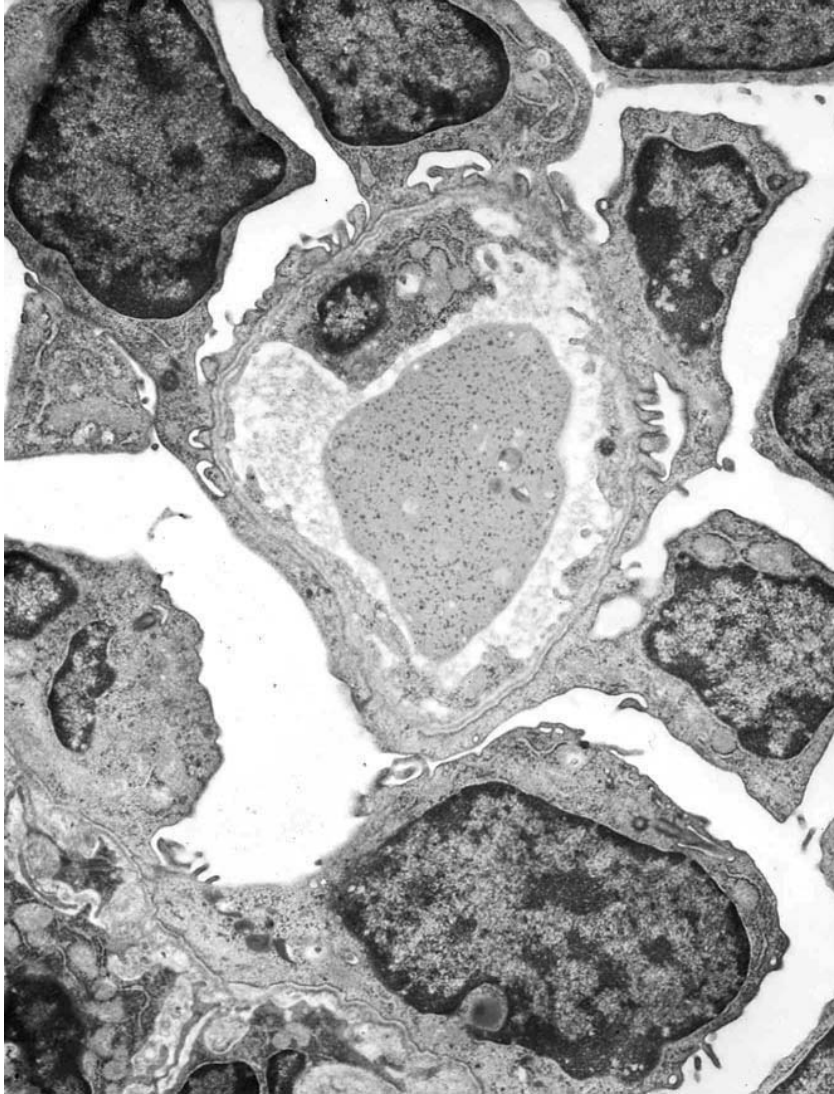


Fig. 18. Imagen de un capilar rodeado por podocitos. Obsérvese como los podocitos emiten sus prolongaciones citoplasmáticas hacia la superficie del capilar rodeando toda la superficie del mismo. Se puede observar la estructura trilaminar de la membrana basal glomerular. *Mus musculus*. 5.000 X

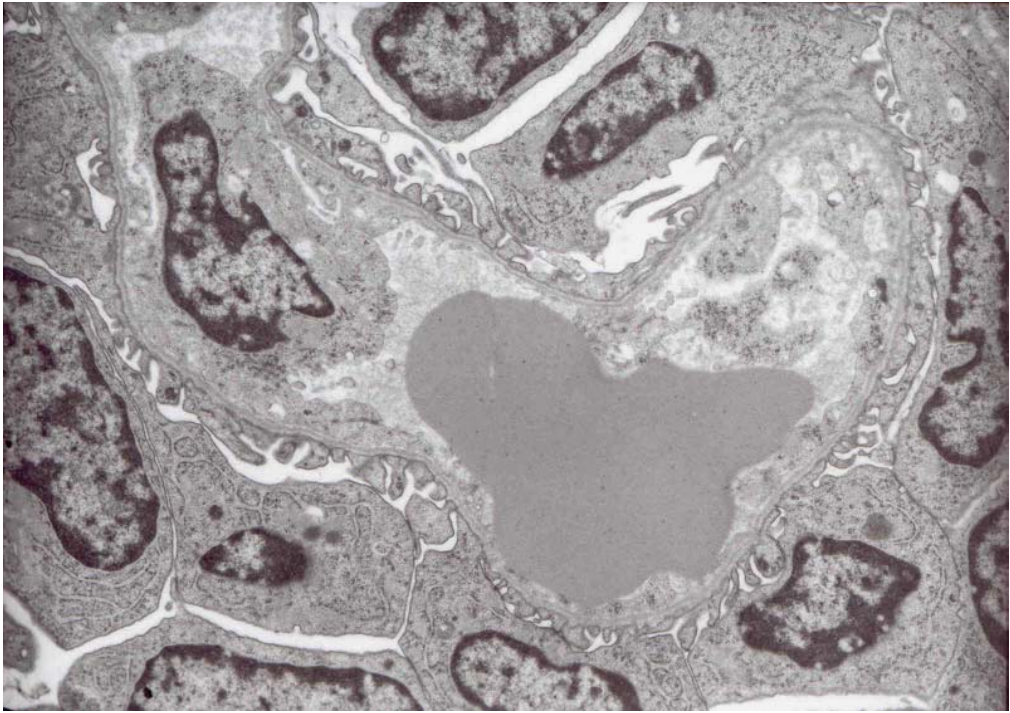


Fig. 19. Capilar rodeado por numerosos pedicelos, su luz muestra abundantes prolongaciones citoplasmáticas y un hematie. Los podocitos muestran un retículo rugoso claramente diferenciado. *Mus musculus*. 4.000 X.



Fig. 20. Podocito, mostrando retículo endoplasmático rugoso bien diferenciado y algunas mitocondrias redondeadas, en las que es difícil apreciar las crestas mitocondriales debido a su alta densidad. Entre los pedicelos puede observarse la presencia de diafragmas de hendidura simples y dobles. *Mus musculus*. 12.000 X.



Fig. 21. Pedicelos y diafragmas de hendidura entre los mismos. Además de los diafragmas, parece existir un material de relleno procedente de la lámina rara externa. *Mus musculus*. 30.000 X.

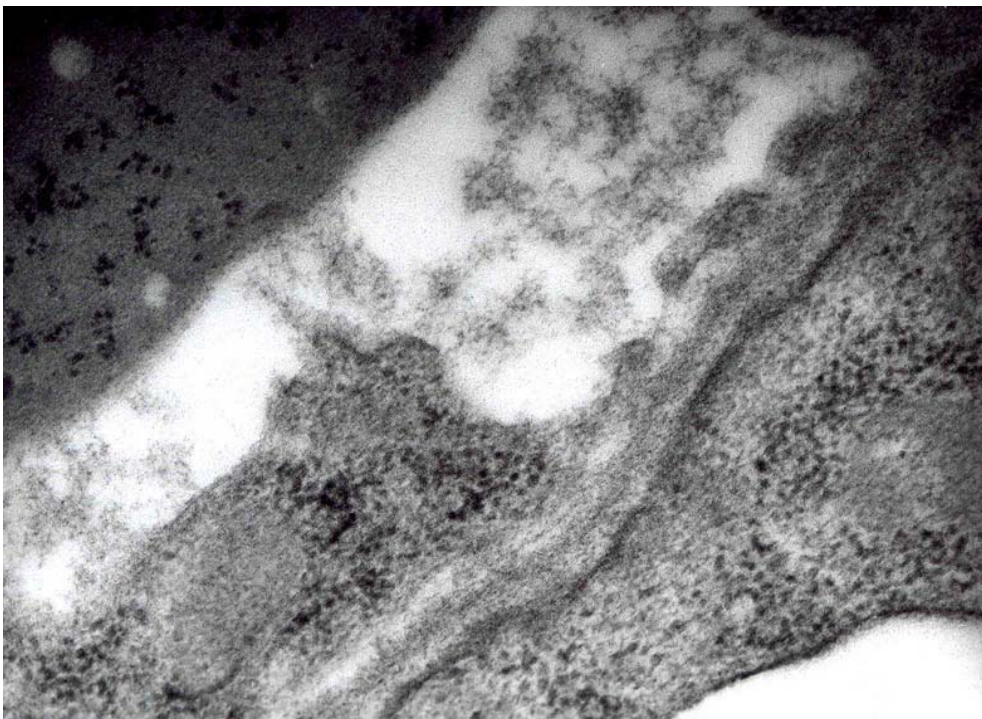


Fig. 22. Imagen de la membrana basal glomerular que muestra su estructura trilaminar. A nivel endotelial puede apreciarse la existencia de poros que limitan con la lámina rara interna. *Mus musculus*. 30.000 X.

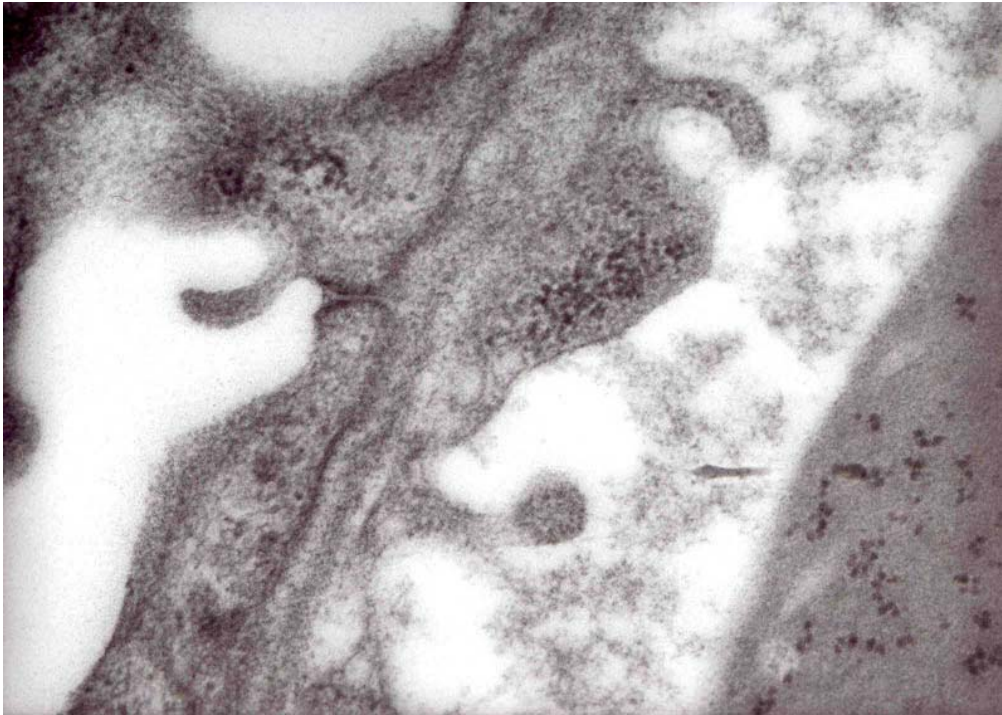


Fig. 23. Prolongaciones citoplasmáticas de las células endoteliales dirigidas hacia la luz del capilar, se puede observar un poro capilar. A nivel de los pedicelos existe una unión densa entre dos prolongaciones citoplasmáticas. *Mus musculus*. 30.000 X.



Figura 24. Membrana basal glomerular pericapilar. Se observa un podocito y numerosos pedicelos. Son visibles varios diafragmas de hendidura entre los pedicelos, así como los poros del endotelio fenestrado. No se observa la presencia de fibronectina en la membrana basal glomerular. *Mus musculus*. 25.000X.

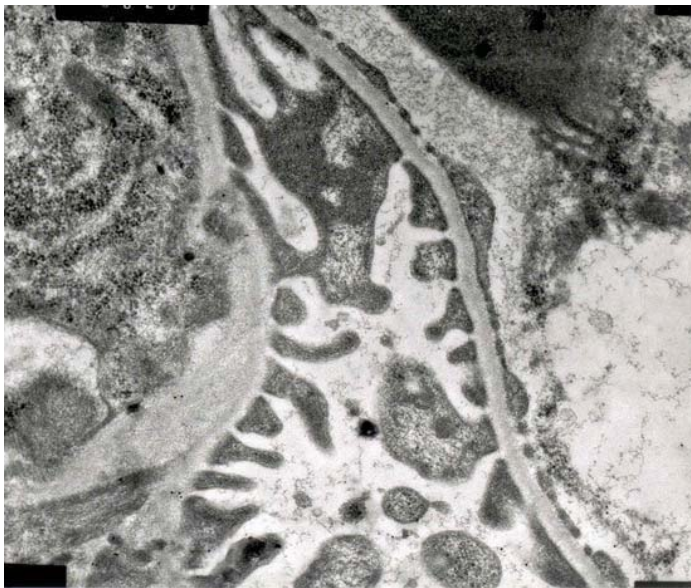
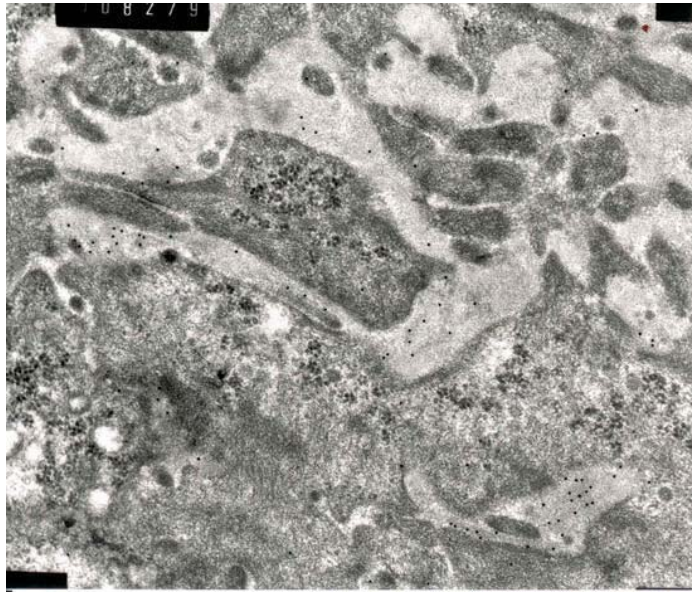
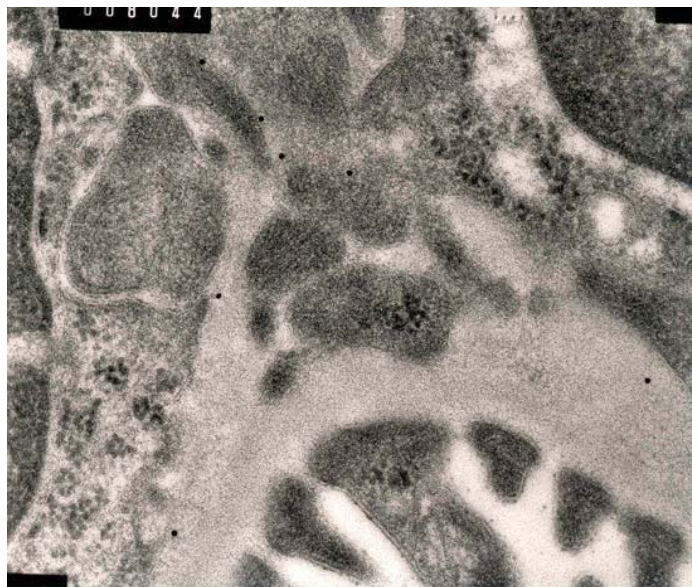
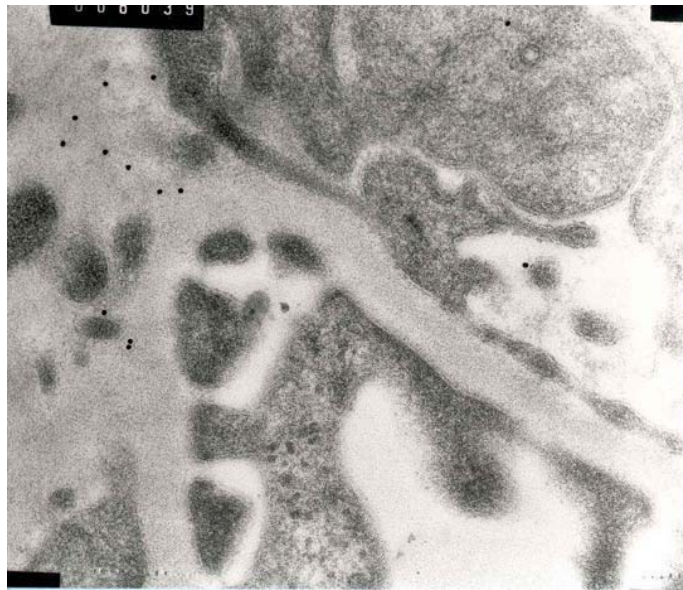


Figura 25. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial. En ambas membranas se puede observar la presencia de pedicelos. En la membrana basal glomerular pericapilar aparecen diafragmas de hendidura simple entre los pedicelos, no visibles a nivel perimesangial. A nivel capilar es visible el endotelio fenestrado. Se observa un ligero marcaje para la fibronectina, en este caso no concluyente en la membrana basal glomerular perimesangial. *Mus musculus*. 19.000X.



Figuras 26 y 27. Matriz mesangial. Las dos imágenes muestran el marcaje positivo a la fibronectina en la zona más densa de esta matriz. La matriz presenta abundantes microfilamentos. Algunas células muestran uniones tipo *zonula occludens* entre ellas. *Mus musculus*. 25.000X.



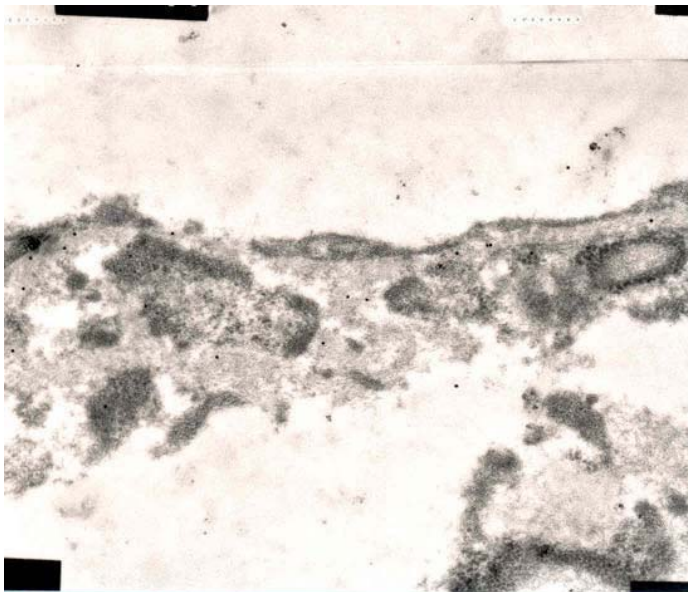
Figuras 28 y 29. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial. Zona de continuación entre ambas membranas basales. El marcaje es positivo para la fibronectina a nivel de la matriz mesangial, pero no es aparente en ambas membranas basales glomerulares. *Mus musculus*. 45.000X.



Figura 30. Membrana basal peritubular. En la imagen aparece la membrana basal sobre la que descansan las células del túbulo contorneado. Son visibles numerosas uniones intercelulares tipo *zonula occludens* y *zonula adherens*. No aparece marcaje positivo a la fibronectina. *Mus musculus*. 25.000X.



Figura 31. Membrana basal peritubular y membrana basal glomerular perimesangial. Ninguna de las dos membranas basales muestra un marcaje positivo para la fibronectina. *Mus musculus*. 25.000X.



Figuras 32 y 33. Matriz extracelular. Imágenes de la matriz extracelular del tejido conectivo que se encuentra alrededor de las estructuras glomerulares. Pueden observarse numerosos microfilamentos y algunos microtúbulos así como la presencia de fibrillas de colágeno. Aparecen zonas positivas a la presencia de fibronectina. El marcaje no aparece ligado, en concreto, a ninguna estructura reconocible. *Mus musculus*. 25.000X.

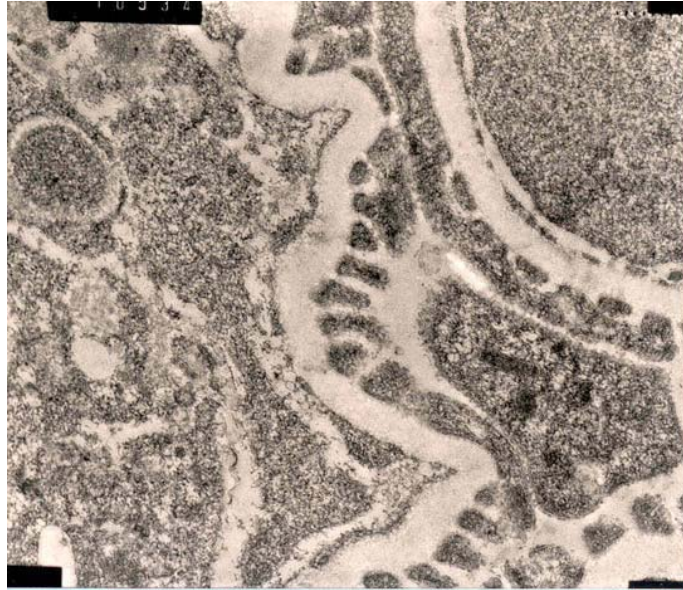


Figura 34. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial. El marcaje de ambas membranas basales glomerulares es negativo con el anticuerpo anti-fibronectina. En la imagen aparecen algunos diafragmas de hendidura simples entre los pedicelos. El endotelio capilar muestra abundantes fenestraciones. El citoplasma de los pedicelos muestra una estructura granular difusa. *Mus spretus*. 25.000X.



Figura 35. Membrana basal glomerular pericapilar. La membrana basal glomerular no presenta reacción positiva para la fibronectina (la presencia de un gránulo no puede considerarse positiva, sino que se considera un artefacto). Entre los pedicelos se observan diafragmas de hendidura simples. La membrana basal glomerular se muestra relativamente homogénea. El citoplasma de los pedicelos muestra una estructura granular difusa. *Mus spretus*. 34.000X.

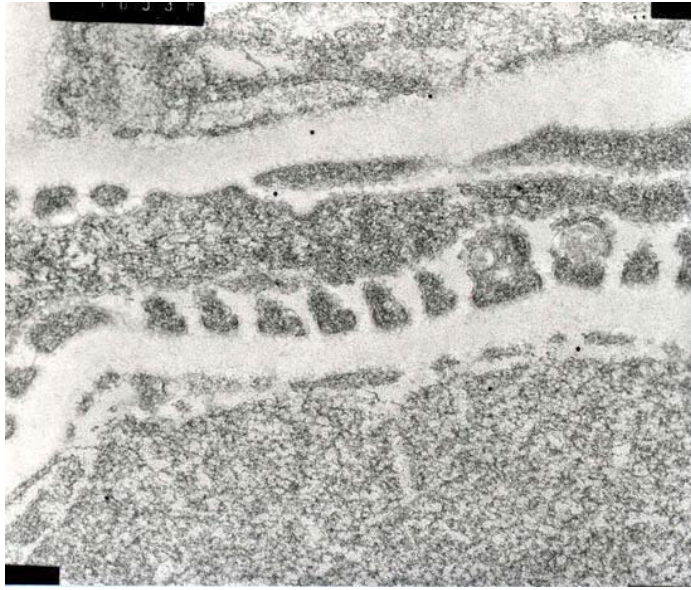


Figura 36. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial. Las membranas basales glomerulares no presentan marcaje positivo para la fibronectina (la presencia de algunos gránulos no la consideramos positiva). En el interior de algunos pedicelos pueden observarse estructuras de carácter vacuolar. En esta imagen tampoco se puede observar una clara diferenciación entre las láminas de la membrana basal glomerular. *Mus spretus*. 34.000X.

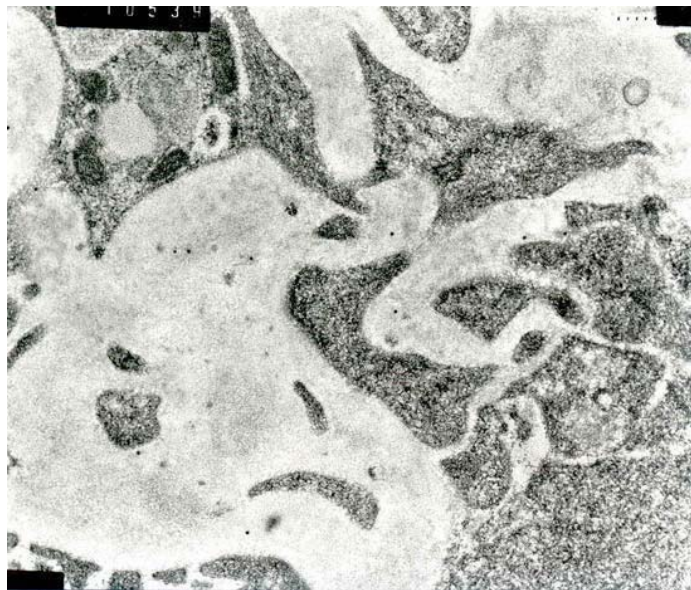


Figura 37. Matriz mesangial. Las imágenes muestran una reacción ligeramente positiva a la presencia de fibronectina. La matriz mesangial presenta un aspecto granular con la presencia de algún elemento de carácter fibrilar. *Mus spretus*. 25.000X.



Figura 38. Matriz mesangial. Las imágenes muestran una reacción ligeramente positiva a la presencia de fibronectina. La matriz mesangial presenta un aspecto granular con la presencia de algún elemento de carácter fibrilar. *Mus spretus*. 34.000X.



Figura 39. Membrana basal glomerular pericapilar. A nivel de la membrana basal glomerular pericapilar no se observa la presencia de fibronectina. Las laminas de la membrana basal glomerular no aparecen claramente definidas. *Clethrionomys glareolus*. 34.000X.

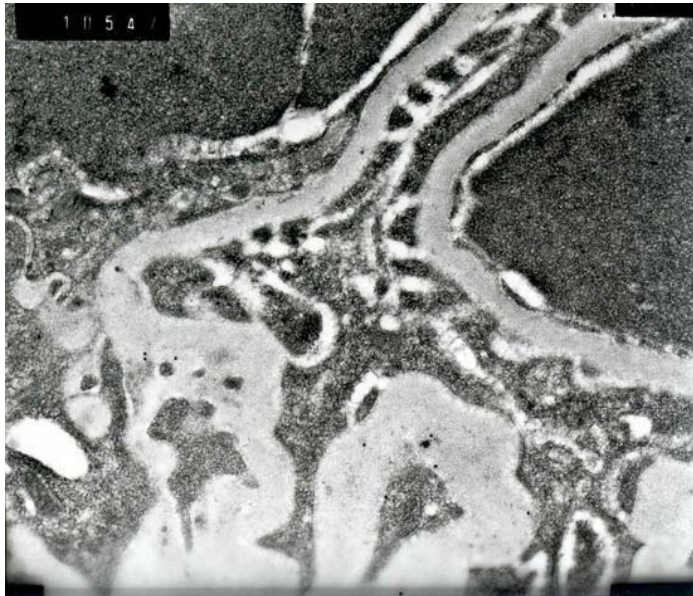
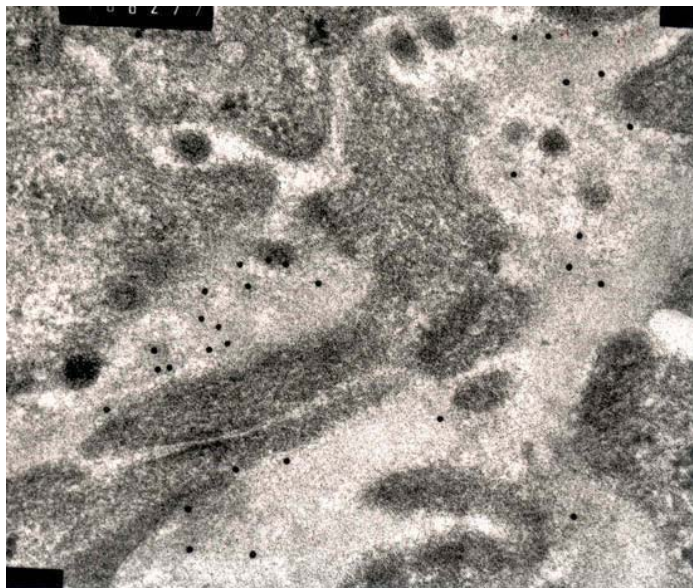
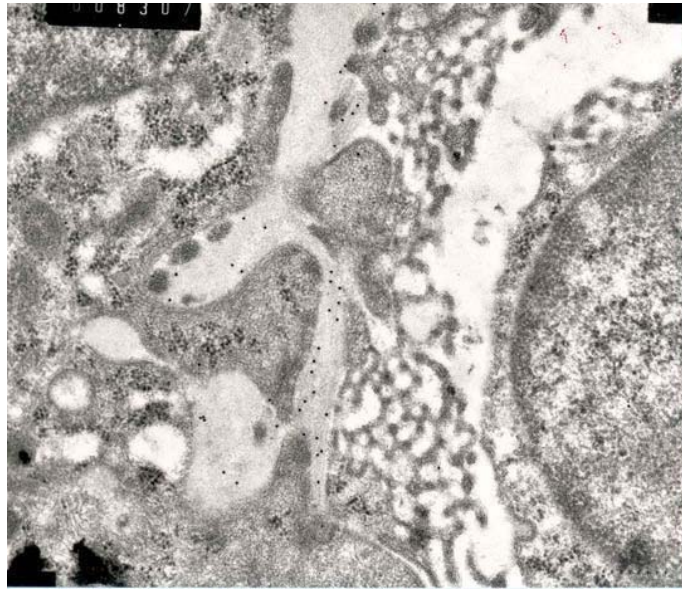


Figura 40. Membrana basal glomerular pericapilar y matriz mesangial. En la imagen se muestra la presencia de un ligero marcaje positivo a la fibronectina a nivel de la zona del mesangio. La membrana basal glomerular no muestra ninguna traza de marcaje. *Clethrionomys glareolus*. 25.000X.



Figuras 41 y 42. Matriz mesangial. Las imágenes muestran la existencia de marcaje positivo para la fibronectina. En las imágenes el marcaje parece estar asociado a estructuras de carácter fibrilar. *Clethrionomys glareolus*. 25.000X y 57.000X.

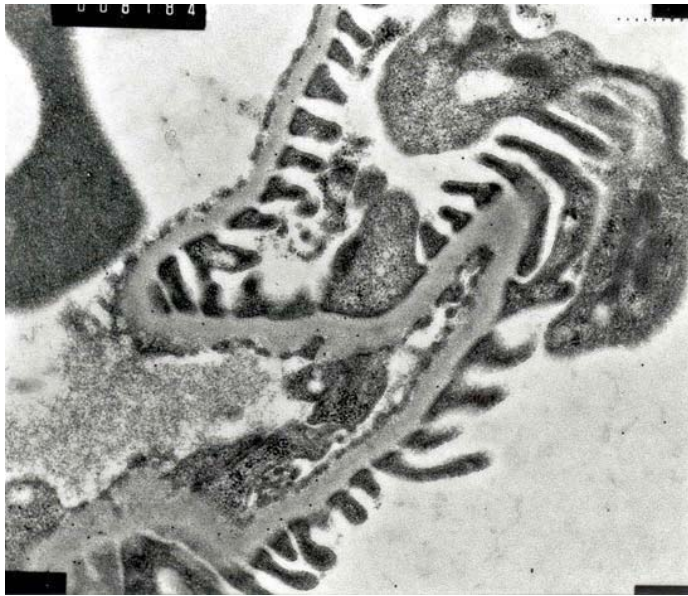


Figura 43. Membrana basal glomerular pericapilar. En la imagen se observa un podocito y numerosos pedicelos. A nivel del endotelio existen gran cantidad de fenestraciones. Se observa el marcaje positivo a la presencia de laminina a nivel de la membrana basal glomerular pericapilar. La distribución de los gránulos parece estar en relación con las láminas raras externa e interna. *Mus musculus*. 19.000X

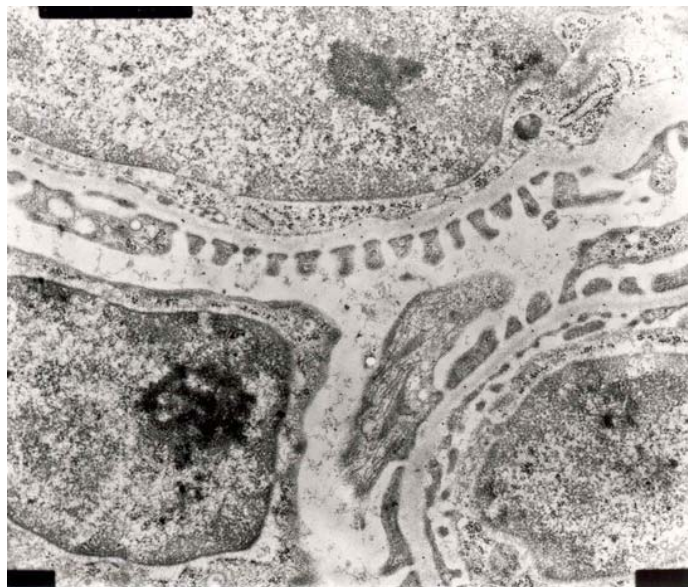


Figura 44. Membranas basales glomerulares pericapilares. Se observan podocitos con vesículas y microtúbulos citoplasmáticos. Entre los pedicelos aparece algún diafragma de hendidura simple. La pared de los capilares presenta numerosas fenestraciones. El marcaje es positivo para la laminina a nivel de la membrana basal glomerular pericapilar. *Mus musculus*. 15.000X.



Figura 45. Membrana basal glomerular pericapilar. Podocito y pedicelos, entre éstos aparecen diafragmas de hendidura simples. En la pared del endotelio capilar se observan gran cantidad de fenestraciones con diafragmas y poros. El marcaje positivo para la laminina se sitúa en esta imagen en relación con la lámina densa. *Mus musculus*. 25.000X.

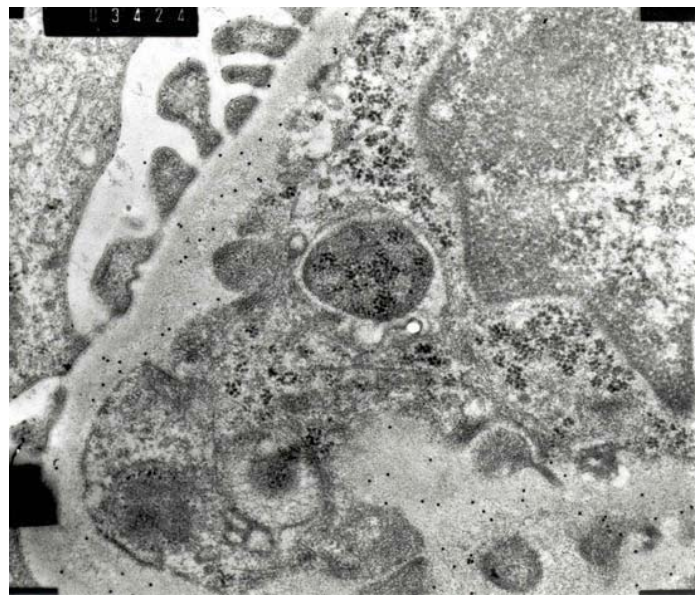
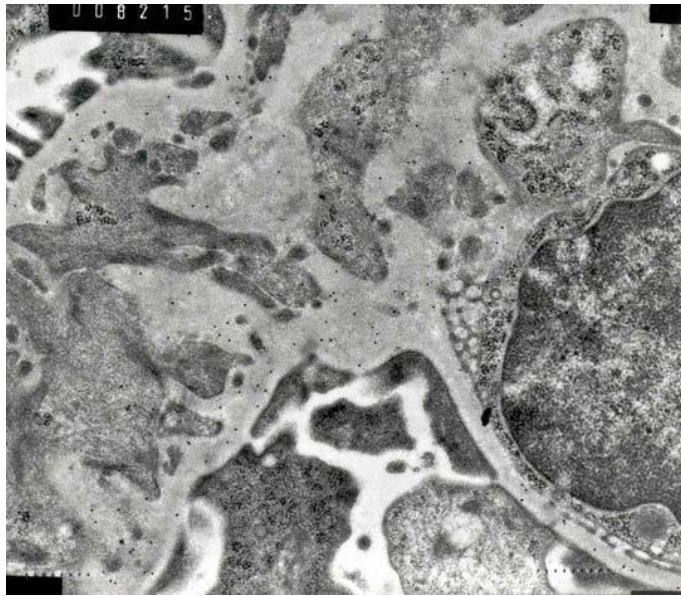


Figura 46. Membrana basal glomerular perimesangial y matriz mesangial. El marcaje para la laminina resulta positivo tanto a nivel de la membrana basal glomerular como en la matriz mesangial. *Mus musculus*. 25.000X.



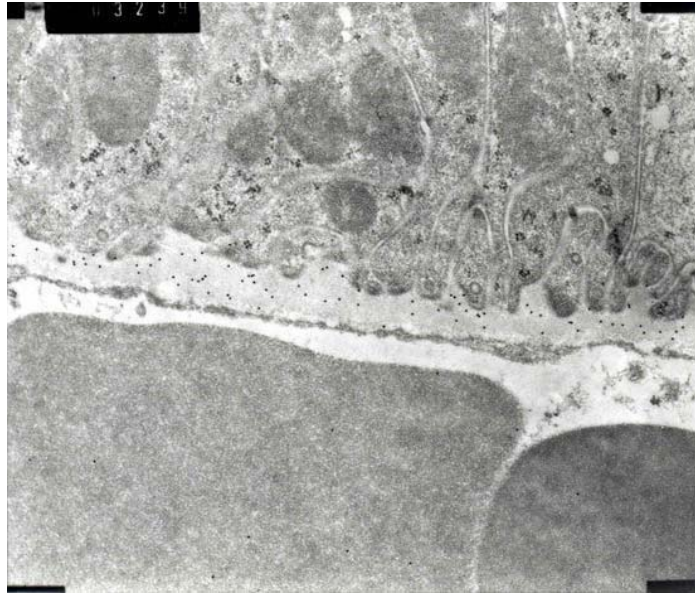
Figuras 47 y 48. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial y matriz mesangial. Las imágenes muestran el marcaje positivo para la laminina de las dos membranas basales glomerulares, pericapilar y perimesangial, así como de la matriz mesangial. La mayor parte del marcaje se localiza en las láminas raras externa e interna. También se puede observar como la membrana basal glomerular se confunde con la matriz mesangial sin que estructuralmente haya diferencias notables entre la lamina densa y esta matriz. *Mus musculus*. 19.000X y 25.000X.



Figura 49. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial y matriz mesangial. En esta imagen en la zona de confluencia de las membranas basales glomerulares y la pared endotelial del capilar es visible el marcaje positivo para la laminina de ambas membranas basales glomerulares y de la matriz mesangial. *Mus musculus*. 25.000X.



Figura 50. Matriz mesangial. Marcaje positivo para la laminina. Las prolongaciones citoplasmáticas de las células mesangiales muestran abundantes microfilamentos. *Mus musculus*. 25.000X.



Figuras 51 y 52. Membrana basal peritubular. Las células tubulares muestran abundantes mitocondrias. Se observan uniones intercelulares en su mayoría tipo *zonula adherens* junto con alguna *zonula occludens*. La membrana basal peritubular muestra un marcaje positivo para la laminina. *Mus musculus*. 19.000X y 34.000X.

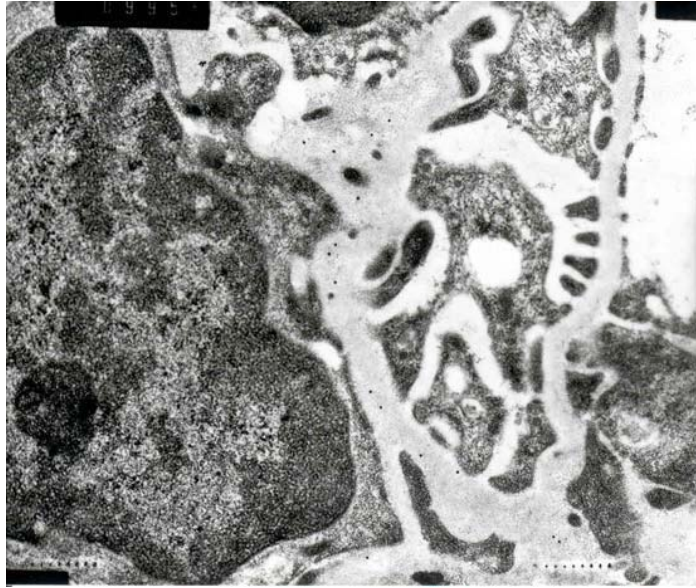


Figura 53. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial. En esta imagen la membrana basal glomerular pericapilar no muestra reacción positiva para la laminina, por el contrario si que aparece reacción positiva en la membrana basal glomerular perimesangial. *Mus spretus*. 19.000X.

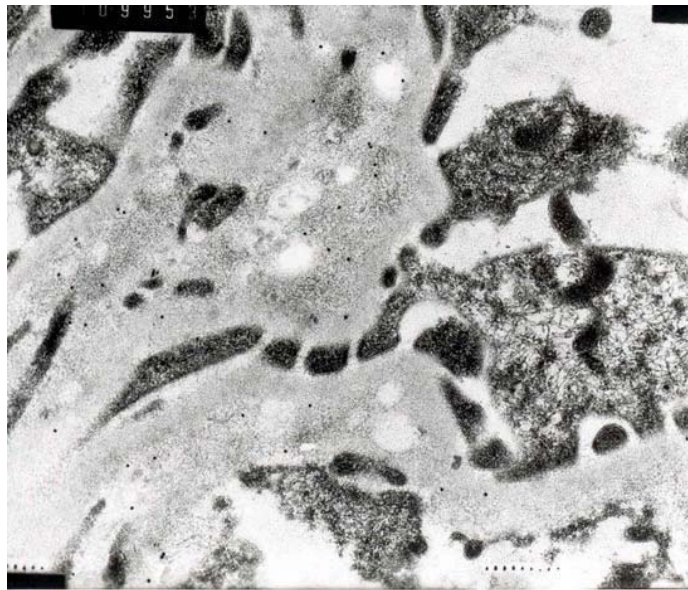
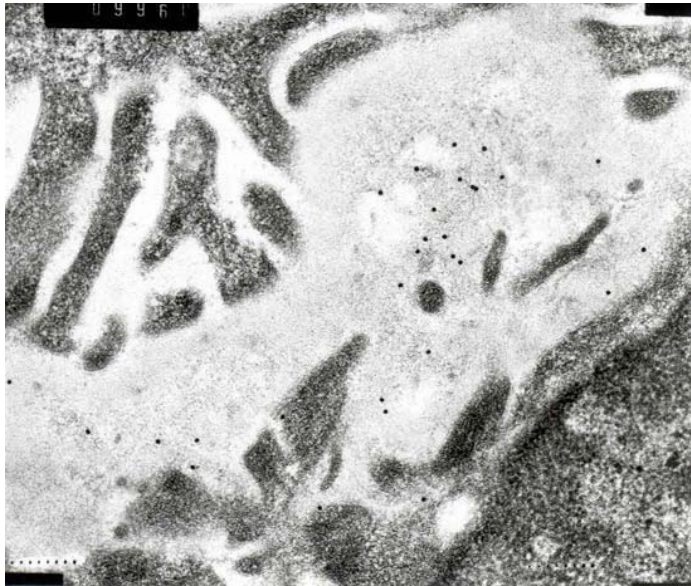
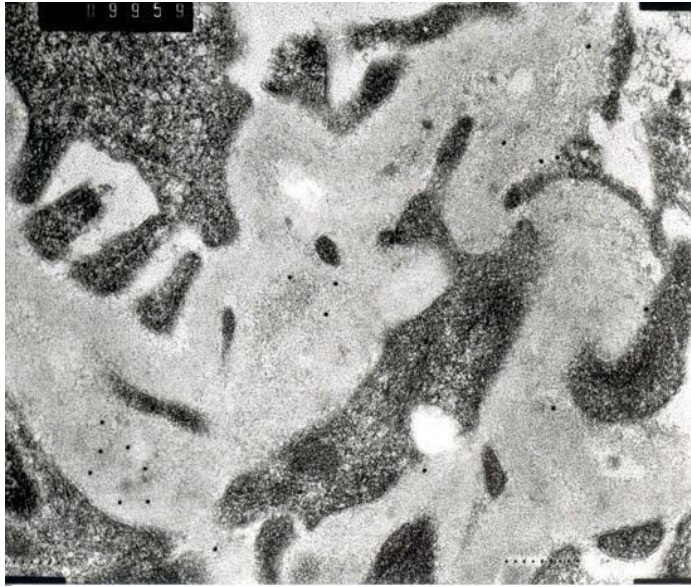
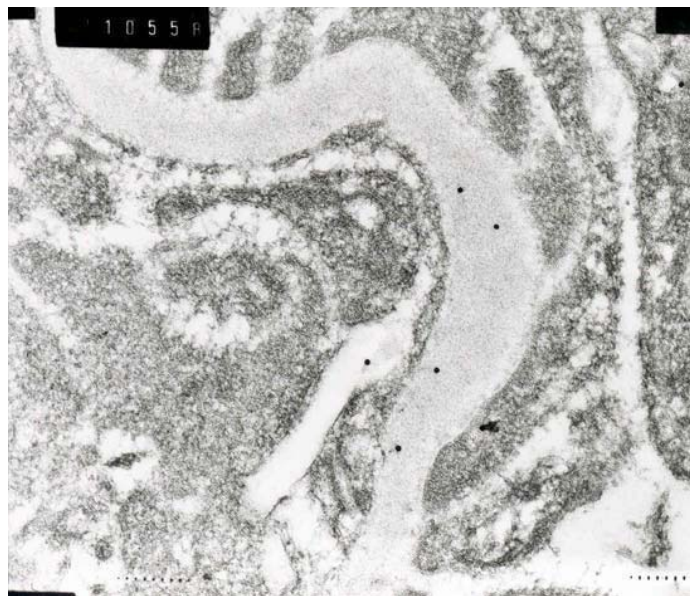
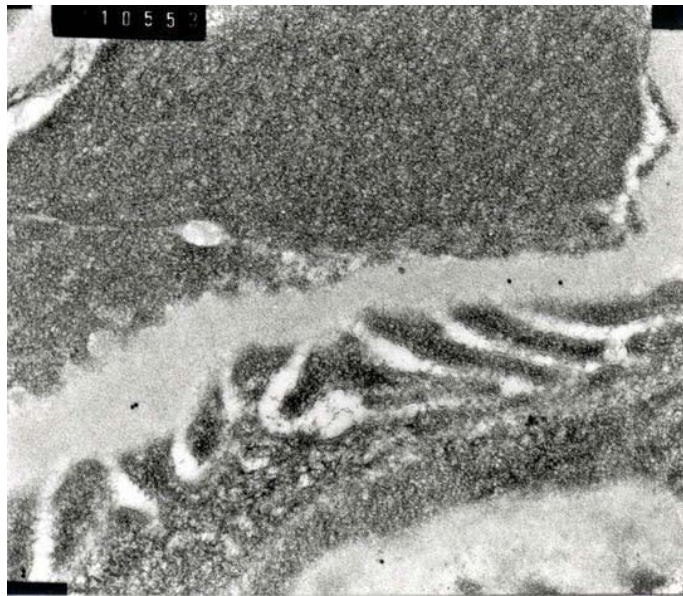


Figura 54. Membranas basales glomerulares pericapilar y perimesangial. La imagen muestra el punto de confluencia entre ambas membranas basales glomerulares. Tanto la membrana basal glomerular pericapilar como la perimesangial muestran marcaje positivo para la laminina. En el interior de los podocitos puede observarse además de un denso material granular la clara presencia de una trama de material fibrilar. *Mus spretus*. 25.000X.



Figuras 55 y 56. Membrana basal glomerular perimesangial. Las imágenes muestran la presencia de laminina a nivel de la membrana basal glomerular perimesangial, próxima a la membrana basal glomerular pericapilar. Apparently no clear differentiation is visible between both basement membranes, showing both a slightly granular appearance of equal density. *Mus spretus*. 34.000X.



Figuras 57 y 58. Membrana basal glomerular pericapilar. Las imágenes muestran un tenue marcaje positivo frente a la laminina a nivel de la membrana basal glomerular. A nivel de esta membrana la existencia de las láminas es difícil de reconocer, ya que la membrana aparece con un aspecto homogéneo. *Clethrionomys glareolus*. 34.000X y 45.000X.



Figura 59. Membrana basal glomerular pericapilar. Marcaje positivo para la laminina a nivel de la membrana basal glomerular pericapilar. La membrana basal glomerular presenta un aspecto bastante homogéneo. *Clethrionomys glareolus*. 25.000X.

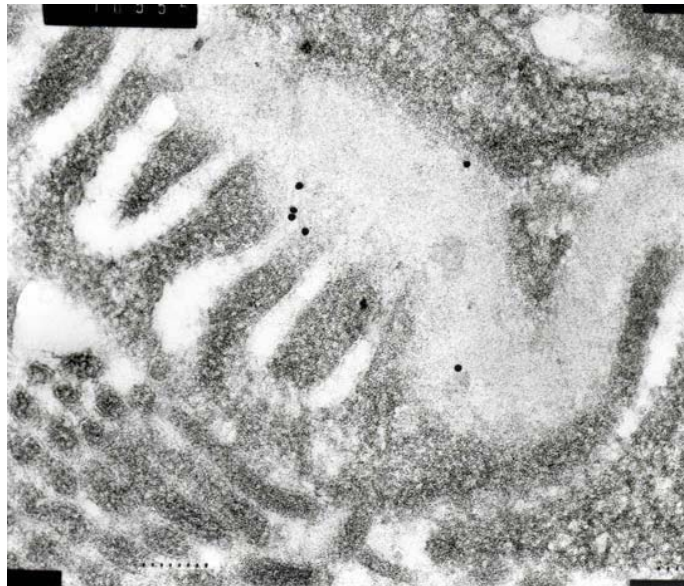


Figura 60. Membrana basal glomerular pericapilar. Marcaje positivo para la laminina. Aunque los límites entre la misma y los podocitos no se encuentran bien definidos por la disposición del corte, la membrana basal glomerular no muestra la imagen trilaminar, mostrando un aspecto granular homogéneo. *Clethrionomys glareolus*. 57.000X.

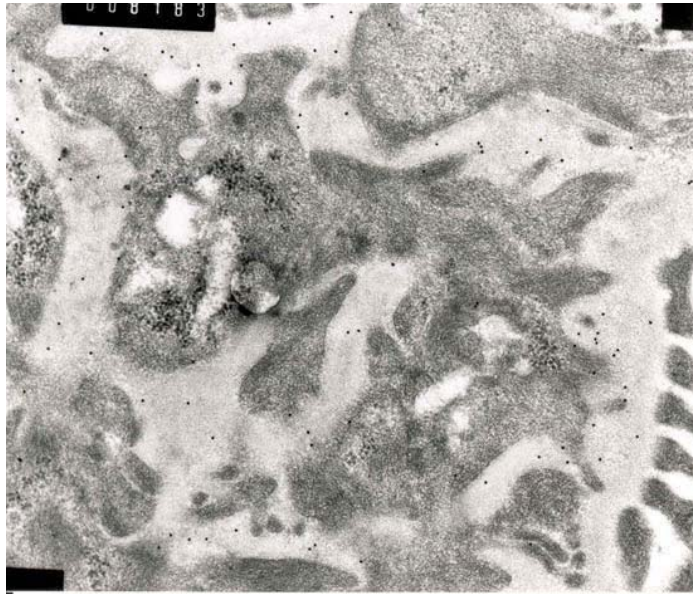


Figura 61. Membrana basal glomerular perimesangial y matriz mesangial. Marcaje positivo para la laminina a nivel de la membrana basal glomerular perimesangial y de la matriz mesangial. Se puede observar como una y otra presentan una estructura semejante sin que haya una clara diferenciación morfológica entre ambas. *Clethrionomys glareolus*. 25.000X.

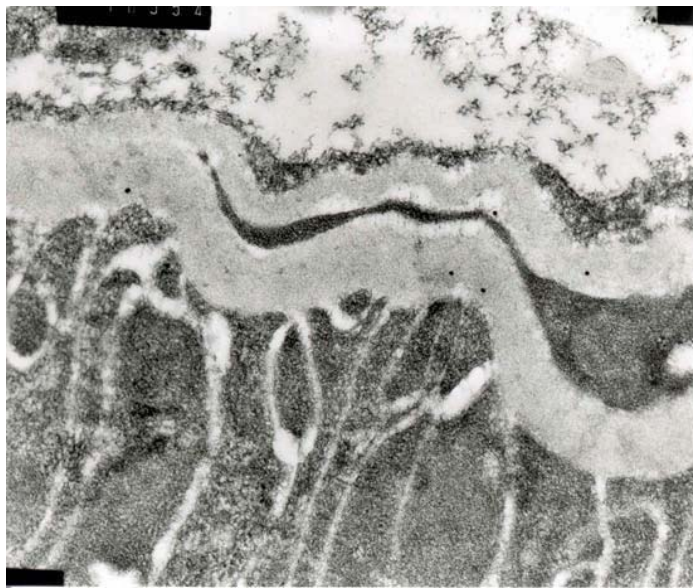


Figura 62. Membrana basal peritubular. Imagen a nivel de la membrana basal de un túbulo contorneado en la que aparece un marcaje ligeramente positivo para la laminina. *Clethrionomys glareolus*. 34.000X.



Figura 63. Imagen de la membrana basal glomerular. Se observan numerosos pedicelos, así como la presencia de claros diafragmas de hendidura. No se observa una clara disposición trilaminar de la membrana. *Apodemus sylvaticus*. 45.000X

5 Discusión

La evolución de la nefrona, como unidad funcional del sistema excretor de los vertebrados, ha estado condicionada por el medio (marino, dulceacuícola o terrestre) en el cual habitan. De forma similar, dentro de las diferentes clases de vertebrados la adaptación evolutiva se ha realizado según los hábitats de las diferentes especies. Así, por ejemplo, dentro de los mamíferos existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad de agua que se encuentra a su disposición y la longitud del asa de Henle.

En sus rasgos esenciales, a pesar de la diversidad de tipos de nefronas, éstas son similares en todas las clases de vertebrados, desde los Agnatos hasta los Mamíferos, al igual que es similar la organización histológica y celular del corpúsculo renal, como unidad de filtración del plasma. Ésta crítica función fisiológica depende, en parte, de la precisa composición de los constituyentes de las matrices extracelulares glomerulares y del correcto ensamblaje entre ellos y con los receptores específicos de las membranas celulares con las que están íntimamente relacionados; puesto que entre otras funciones biológicas mantener la integridad de la matriz extracelular es un factor crucial para determinar la estructura glomerular y su función de filtración (Farquhar, 1991).

Existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* (Howard et al., 1976; Hart, 1978; Killen y Striker, 1979; Sage et al., 1979; Foidart et al., 1980, Striker et al., 1980;

Stow et al., 1989; Sariola et al., 1984, Abrahamson, 1985; Desjardins y Bendayan, 1991) que son tres tipos de células (las epiteliales viscerales, las endoteliales capilares y las células mesangiales) los que intervienen en la síntesis de los componentes moleculares que conforman las dos matrices extracelulares del glomérulo, la membrana basal glomerular y la matriz mesangial, diferenciándose de forma tradicional una de otra por la posición espacial dentro del glomérulo y más actualmente por los componentes moleculares constituyentes. Sin embargo, como la membrana basal glomerular forma por un lado una capa continua de matriz alrededor de cada uno de los capilares y por otro también puede reflejarse sobre el mesangio axial, morfológicamente se suelen diferenciar tres matrices extracelulares glomerulares: la membrana basal glomerular pericapilar, la membrana basal glomerular perimesangial y la matriz mesangial.

Cuando se compara la membrana basal glomerular, del glomérulo adulto, mediante microscopía electrónica de transmisión, con la mayoría de las láminas basales de otros tejidos adultos, se observa que a diferencia de éstas últimas, la membrana basal glomerular está constituida por tres láminas de distinta densidad, una lámina rara externa en contacto directo con las células epiteliales viscerales, una lámina central densa y una lámina rara interna en contacto directo con las células endoteliales vasculares (Farquhar, 1991), dicha diferencia de densidad electrónica según Paulsson (1992), Yurchenco y O'Rear (1993) y Yurchenco y O'Rear (1994), se debe al modelo de organización fibrilar molecular que estructura las diferentes láminas; de forma que para estos autores la mayor densidad se debe a la localización de las moléculas de colágeno tipo IV y/o de laminina que conectarán de forma perpendicular, atravesando las láminas raras, con las membranas celulares del epitelio y del endotelio (Caulfield, 1979; Takami et al., 1991). La estructura trilaminar de la membrana basal glomerular surge de la fusión durante el desarrollo embrionario de las dos láminas basales, la epitelial visceral y la endotelial, cada una de carácter bilaminar.

La matriz mesangial glomerular, si bien se caracteriza por estar constituida por los mismos componentes básicos encontrados en otras láminas basales, mediante observación con microscopía electrónica no presenta el modelo estructural laminar.

Otra característica de las matrices extracelulares es el hecho de que si bien se puede dar una composición química generalizada a todas ellas (colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas), cada una, dependiendo del tejido y la localización del mismo presenta su propia composición particular, tanto a nivel del tipo de moléculas que la conforman, como a nivel de las distintas isoformas que se pueden expresar de cada una de ellas. Así, por ejemplo, con respecto a la laminina la cadena alfa 5 parece ser que es la que se expresa de forma más generalizada en todos los tejidos mientras que la cadena alfa 1 es la más restrictiva (Miner et al., 1997; Ekblom et al., 1998; Falk et al., 1999; Virtanen et al., 2000). La cadena alfa 3 se encuentra en la mayoría de láminas basales epiteliales, con excepción de la de algún epitelio simple, por ejemplo a nivel de la membrana basal glomerular (Carter et al., 1991; Marinkovich et al., 1992; Lohi et al., 1997), mientras que las cadenas alfa 2 parecen ser las predominantes en relación con las células de origen mesodérmico junto con las cadenas de laminina alfa 4 (Vuolteenaho et al., 1994; Liu y Mayne, 1996; Frieser et al., 1997; Iivanainen et al., 1997; Miner et al., 1997; Perreault et al., 1998; Lefebvre et al., 1999; Talts et al., 2000).

La complejidad aumenta cuando se comparan los distintos componentes moleculares de las matrices extracelulares y sus isoformas durante las distintas etapas del desarrollo embrionario del tejido.

El glomérulo refleja estos conceptos ya que existen evidencias que demuestran la constante renovación y redistribución de los componentes de las matrices glomerulares tanto durante las diversas etapas del desarrollo embrionario como en los glomérulos adultos (Butkowski et al., 1989; Desjardins et al., 1990; McCarthy y

Couchman, 1990; Miner y Sanes, 1994; Sanes et al., 1990; McCarthy, 1997; Miner, 1998).

Así, mediante la utilización de anticuerpos policlonales se detecta la presencia de laminina 1 en todas las fases del desarrollo glomerular así como en el glomérulo maduro si bien con distintas intensidades de marcaje y distintos resultados según los autores. Mounier y colaboradores en 1986 y Abrahamson en 1985, en riñón humano y de rata, respectivamente, ponen de manifiesto la presencia de laminina 1 en todas las fases del desarrollo glomerular incluido el glomérulo adulto con presencia más intensa en la membrana basal glomerular desde la etapa en S hasta el glomérulo adulto, sin embargo difieren en la determinación del grado de presencia relativa en la matriz mesangial en la fase de bucle capilar; ya que mientras Mounier y colaboradores obtienen una presencia débil, Abrahamson indica una presencia intermedia aunque ambos coinciden en determinar el carácter positivo de la matriz mesangial en el glomérulo adulto.

McCarthy y colaboradores en 1993, en ratas, indican los mismos resultados para la laminina 1 que Mounier et al., 1986, desde la fase de vesícula hasta la fase del bucle capilar no ofreciendo resultados sobre el glomérulo adulto; ajustándose prácticamente también a los resultados ya indicados por Ekblom y colaboradores en 1981.

Diversos autores, también obtienen resultados diversos con la utilización de antisueros monoclonales, para las diferentes cadenas de laminina. Así, la cadena alfa 1 de laminina, presente en la fase de vesícula y de coma desaparece progresivamente hasta estar ausente en el glomérulo adulto tanto a nivel de la membrana basal glomerular como del mesangio aunque en este último aparece en algunas observaciones con un débil marcaje (Ekblom et al., 1994; Klein et al., 1988; Miner et al., 1997). El marcaje débil en la matriz mesangial del glomérulo adulto también

aparece para la cadena alfa 2, cadena que no parece dar resultados francamente positivos en ninguna fase del desarrollo glomerular (Miner et al., 1997) sin embargo, dentro de las características generales, cabe indicar que a esta cadena se la considera como una cadena de origen mesodérmico. La presencia de la cadena alfa 4, también de origen mesodérmico, aparece en todas las etapas del desarrollo glomerular, aunque con mayor intensidad en las etapas de vesícula, de coma y de S (Miner et al., 1997).

La cadena alfa 5 aparece en la fase de S y se mantiene con marcaje intenso en la membrana basal glomerular en la fase del bucle capilar y en la membrana basal glomerular madura (Miner et al., 1997) pero está ausente de la matriz mesangial.

En relación con las cadenas beta, la cadena beta 2 sigue una distribución parecida a la de la cadena alfa 5 es decir, aparece en la fase posterior a la etapa de S pero sólo en las membranas basales glomerulares maduras estando totalmente ausente de la matriz mesangial, al contrario de la cadena beta 1 que aparece en las fases tempranas del desarrollo, desaparece en la fase del bucle capilar de las membranas basales glomerulares aunque se mantiene en la matriz mesangial del glomérulo adulto (Miner y Sanes, 1994). Así, la membrana basal glomerular adulta estará conformada por las cadenas alfa 5, beta 2 y gamma 1 (Sanes et al., 1990; Miner y Sanes, 1994) de las cuales la cadena gamma 1 aparece y persiste en todas las secuencias del desarrollo del glomérulo.

Sorokin y colaboradores en 1997, determinan, en ratón, que la cadena alfa 1 de laminina tiene una marcada presencia a nivel de la cápsula de Bowman en los estadios de 13 días, en el periodo comprendido entre los 17 días y hasta el nacimiento así como también en el adulto pero que ésta está totalmente ausente, en los mismos periodos de estudio, de la membrana basal glomerular y del endotelio, apareciendo con tinción difusa a nivel de la matriz mesangial en el glomérulo adulto;

también ponen de manifiesto que el patrón de distribución para la cadena alfa 5, en los mismos periodos de estudio, indica el aumento progresivo hasta el adulto en la cápsula de Bowman y en la membrana basal glomerular, mientras que en el endotelio sólo se determina su presencia en el adulto pero no en los periodos prenatales.

Otro punto de investigación, llevado a cabo por otros investigadores, ha sido el de cual o cuales son los tipos celulares encargados de la renovación de los componentes moleculares de las matrices extracelulares glomerulares. Así, el concepto general determinado mediante técnicas de marcaje con radioisótopos, con nitrato de plata o con anticuerpos de limitada especificidad, indica que sólo las células epiteliales viscerales intervienen en la síntesis de renovación de las proteínas que forman la membrana basal glomerular adulta (Kurtz y Feldman, 1962; Abrahamson, 1985; Stow et al., 1985; Abrahamson y Perry, 1986; Farquhar, 1991) mientras que las células endoteliales y las mesangiales tienen la función de degradación de las proteínas ya existentes (Walker, 1973; Romen et al., 1976). Sin embargo, Lee y colaboradores en 1993, ponen de manifiesto en riñón de rata, mediante técnicas de transcripción inversa *in situ*, que los proteoglicanos de heparan sulfato y la fracción laminina-S (cadena beta 2) son sintetizados principalmente por las células epiteliales viscerales; que las cadenas de colágeno alfa 1 y alfa 2 tipo IV lo son por las células endoteliales y que las cadenas de laminina A (cadena alfa 1) y B2 (cadena gamma 1) son expresadas por los tres tipos de células glomerulares mientras que la laminina B1 (cadena beta 1) y la fibronectina son transcritas por el mesangio. Así pues, la única diferencia de secreción entre las células epiteliales viscerales y las endoteliales, en referencia a la molécula de laminina, sería que las células viscerales, además de cadenas alfa 1 y gamma 1, sintetizan la cadena de laminina beta 2 de la membrana basal glomerular y que las células mesangiales además de sintetizar, igual que los otros dos tipos celulares, las cadenas alfa 1 y gamma 1 de laminina, sintetizan la cadena beta 1 y fibronectina.

Aún a tenor de la abundancia de resultados sobre la distribución de moléculas y monómeros de fibronectina y laminina de la membrana basal glomerular y de la matriz mesangial en glomérulos adultos podemos considerar poco concluyente la localización y distribución exacta de la molécula íntegra de fibronectina y laminina en la membrana basal glomerular y la matriz mesangial en glomérulos adultos, así como menos concluyentes son los resultados cuando los mismos lo son de diferentes especies.

Poco frecuentes son los estudios comparativos realizados para las moléculas estructurales de las matrices extracelulares entre especies próximas, pertenecientes o no a un grupo taxonómico común, y que aún así, pueden presentar perfiles metabólicos diferentes como consecuencia de sus distintas estrategias tróficas.

Es por ello que, en el presente estudio se ha utilizado, como especie patrón de comparación al ratón común *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) en su variedad de laboratorio, y a tres especies silvestres de roedores: *Mus spretus* (Lataste, 1883), *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758); y *Clethrionomys glareolus* (Screber, 1780).

Mus musculus requiere en estado silvestre, al igual que en el laboratorio, de la libre disposición de agua. La especie está totalmente ausente de los medios xerófilos con ausencia de agua.

Mus spretus, el ratón mediterráneo, es una especie totalmente silvestre que frecuenta las maquias y las garrigas de la zona mediterránea. Se alimenta de frutos y semillas y sus requerimientos de agua son muy reducidos, mucho menores que las de otros múridos, siendo animales que pueden pasar varios días sin beber.

Apodemus sylvaticus, el ratón de bosque, habita las zonas marginales de los bosques caducifolios, de los pinares y los encinares, si bien su presencia se ve favorecida en

aquellos lugares donde hay presencia de agua. Con régimen alimenticio prácticamente omnívoro. Esta especie silvestre ha sido utilizada en diversos estudios como especie comparativa con otras especies de roedores silvestres y de laboratorio. En estos estudios se demuestra la existencia de diferencias interespecíficas estructurales entre moléculas proteicas enzimáticas así como entre la composición de la orina y el plasma sanguíneo, poniendo de manifiesto que los datos metabólicos de los animales de laboratorio no siempre son extrapolables con los de las especies silvestres (Xiaoling et al., 1998; Griffin et al., 2000).

Clethrionomys glareolus, el topillo rojo, habita los bosques y sotobosques medianamente densos y húmedos. Con dieta básicamente herbívora, partes verdes de plantas, frutos y hongos, complementada con alimentos de origen animal como gusanos y pequeños invertebrados. Esta especie, en origen silvestre, actualmente es utilizada como animal de laboratorio (UFAW, 1999). También, en estado silvestre ha sido utilizada como especie para la detección y la capacidad de almacenaje de metales pesados contaminantes en diversos tejidos en estudios toxicológicos medioambientales (Wlostowski et al., 1996; Swiergosz et al., 1998; Milton et al., 1999; Erry et al., 2000; Griffin et al., 2000a; Griffin et al., 2000b; Wlostowski et al., 2000a; Wlostowski et al., 2000b; Griffin et al., 2001). Además, también se ha utilizado en estudios comparativos con otras especies de roedores silvestres y de laboratorio, en los que se demuestra que, igual que para *Apodemus sylvaticus*, existen diferencias interespecíficas entre las distintas especies silvestres y las de laboratorio (Xiaoling et al., 1998; Griffin et al., 2000a).

5.1 Fibronectina

Estudios realizados mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica, en glomérulo humano y animales de experimentación ponen de manifiesto la

localización de la molécula de fibronectina en la matriz mesangial glomerular (Stenman y Vaheiri, 1978; Courtoy et al., 1980a; Courtoy et al., 1980b; Madri et al., 1980; Boselli et al., 1981; Martínez-Hernández et al., 1981; Courtoy et al., 1982; Mounier et al., 1986; Ishimura et al., 1989; Laitinen et al., 1991; Büyükbabani y Droz, 1994; Abrass et al., 1995). Lee et al., en 1993, indican que la única fuente de síntesis de fibronectina en el glomérulo adulto son las células mesangiales.

Sin embargo, algunos de estos autores discrepan en los resultados obtenidos sobre la localización de la fibronectina en la membrana basal glomerular. Así, Madri et al. (1980), no detectan presencia de fibronectina fuera de la matriz mesangial, al igual que Boselli et al. (1981) y Martínez-Hernández et al. (1981), quienes remarcan la ausencia de fibronectina en las membranas basales glomerulares; mientras que otros autores (Courtoy et al., 1980a; Courtoy et al., 1980b; Courtoy, 1982; Mounier et al., 1986; Abrass et al., 1995) por medio de estudios realizados con técnicas de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y ultraestructurales determinan la presencia de fibronectina en la membrana basal glomerular. Courtoy et al. (1980a); Courtoy et al. (1980b) y Courtoy (1982) sitúan a la molécula de fibronectina en la lámina rara interna y externa, indicando marcaje discontinuo en la cápsula de Bowman mientras que Abrass et al. (1995) detectan además, en ratas jóvenes, la presencia de fibronectina en la cápsula de Bowman, en la membrana basal peritubular y en la sustancia intersticial; aunque en todas ellas con menor intensidad que en la matriz mesangial. En comparación con los resultados obtenidos por Abrass et al. (1995), otros autores como Stenman y Vaheiri (1978), Boselli et al. (1981), Martínez-Hernández et al. (1981) y Laitinen et al. (1991), no detectan la molécula de fibronectina en las láminas basales de los túbulos aun que sí lo hacen en el tejido intersticial.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, mediante la técnica de la inmunoperoxidasa en muestras de ratón adulto de laboratorio, presentan un claro

marcaje positivo de la matriz mesangial y del tejido conjuntivo peritubular. También aparece un cierto marcaje positivo a nivel de la membrana basal glomerular, mientras que no detectamos marcaje ni en las membranas basales peritubulares ni en las cápsulas de Bowman. Los resultados obtenidos mediante la técnica de la inmunofluorescencia si bien son semejantes, a los que hemos obtenido mediante la técnica de la inmunoperoxidasa, para la reacción positiva del tejido conectivo peritubular y negativos para la membrana basal peritubular y la cápsula de Bowman, no lo son en intensidad de marcaje para la membrana basal glomerular ni para el mesangio, donde mediante ésta última técnica no podemos concluir de forma categórica la presencia de fibronectina en la matriz mesangial.

Así pues, a tenor de los resultados sobre la localización de la fibronectina mediante la utilización de ambas técnicas de marcaje, inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia, no podemos afirmar de forma definitiva la presencia claramente positiva, que determinan otros autores, para la matriz mesangial.

La técnica de marcaje con oro coloidal, nos permite dar valores más resolutivos. Así, los resultados obtenidos en las muestras de ratón adulto de laboratorio, demuestran que el marcaje es claramente positivo tanto para el tejido conectivo intersticial peritubular como para la matriz mesangial, mientras que no se observa reactividad positiva en el caso de la membrana basal glomerular, ni para la membrana de la cápsula de Bowman, ni tampoco para la membrana basal peritubular. Por tanto, coincidimos con todos aquellos autores que localizan a la fibronectina a nivel de la matriz mesangial y no a nivel de la membrana basal glomerular, permitiéndonos mediante esta técnica de inmunolocalización mediante oro coloidal poner de manifiesto la distribución de esta molécula a nivel del mesangio glomerular.

Los resultados de distribución de la fibronectina obtenidos en *Mus musculus* son extrapolables a los obtenidos para las especies de roedores silvestres *Mus spretus* y

Clethrionomys glareolus, si bien la intensidad de marcaje es mucho menor en ambas especies en comparación con la observada en el ratón de laboratorio. Cabe indicar también que ninguna de las muestras procesadas de *Apodemus sylvaticus* han mostrado resultados positivos a la presencia de fibronectina.

5.2 Laminina

La distribución y localización de la molécula de laminina resulta más compleja que la de la fibronectina, ya que mientras de fibronectina existe un único tipo de molécula proteica dimérica, con diferentes isoformas en base a la presencia o no de los módulos EDA, EDB y/o IIICS, las isoformas de la laminina aparecen como consecuencia de las posibles combinaciones entre las tres distintas cadenas polipeptídicas que la conforman y donde cada una de las cadenas tiene distintas posibles representaciones estructurales, lo que conlleva a que se puedan obtener resultados diversos según la metodología que se utilice para ponerla de manifiesto.

Mientras los primeros estudios para la localización de la laminina utilizaban anticuerpos obtenidos a partir de antígenos de molécula completa de laminina sin remarcar la existencia de las posibles isoformas constituyentes de los mismos (anticuerpos antilaminina policlonales inespecíficos), los más recientes son, mayoritariamente, aquellos que utilizan la localización de la molécula a partir de alguno de sus monómeros por separado (anticuerpos antilaminina monoclonales) o por medio de la localización de algún epítipo. Todo ello conduce a considerables discrepancias entre los distintos resultados obtenidos por diferentes investigadores.

Así, diversos estudios realizados, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta o ultraestructurales, sobre secciones de riñón adulto de ratón con utilización de anticuerpos policlonales anti laminina-1, determinan que la laminina se localiza tanto a nivel de la membrana basal glomerular como a nivel de la membrana basal

tubular (Madri et al., 1980; Abrahamson y Caulfield, 1981; Abrahamson y Caulfield, 1982; Abrahamson et al., 1983; Abrahamson y Caulfield, 1985; Abrahamson, 1986) o de forma más generalizada en todas las membranas basales renales con excepción de las de la médula interna (Sorokin et al., 1997). Otros trabajos hacen referencia a la presencia de la laminina tanto a nivel de la membrana basal glomerular como en la matriz mesangial (Abrahamson, 1985, Mounier et al., 1986) o a la presencia, por separado, en la matriz mesangial y en la membrana basal glomerular (Ekblom, 1981; Desjardins y Bendayan, 1991).

Abrahamson y St John en 1993, utilizando anticuerpos monoclonales para regiones concretas de la molécula de laminina-1 que abarcan las tres cadenas polipeptídicas, obtuvo resultados claramente reactivos en el mesangio y la membrana basal tubular y negativos o muy débilmente positivos para la membrana basal glomerular.

Los resultados son algo discrepantes en cuanto a la localización exacta de la laminina en la membrana basal glomerular ya que mientras Abrahamson (1986), la sitúa tanto en la lámina rara, externa e interna, como en la lámina densa, Courtoy y colaboradores (1980b y 1982), la sitúan únicamente en las láminas raras externa e interna.

Otros autores utilizan anticuerpos monoclonales para cada una de las cadenas constituyentes de la laminina-1 por separado (alfa 1, beta 1, gamma 1). Si bien con ello no se determina la presencia concreta de la molécula de laminina-1, si se determina la presencia de la laminina como molécula estructural. La mayoría de estos estudios se han realizado con el fin de determinar cuales son las variaciones en la composición trimérica molecular que ocurre en las diferentes fases del desarrollo embrionario hasta la madurez del glomérulo. Sanes et al. (1990) y Miner y Sanes (1994) coinciden en determinar que la membrana basal glomerular da resultados positivos a la presencia de la cadena gamma 1 y negativos para beta 1. Ekblom et al.

(1990) indican que en el glomérulo adulto de ratón la cadena alfa 1 sólo aparece en la membrana basal tubular; mientras que Miner y colaboradores en 1997, en su trabajo sobre localización de las distintas cadenas alfa de laminina, remarcan la ausencia de la cadena alfa 1 de laminina en la membrana basal glomerular y en algunas membranas basales tubulares proximales; también Sterk et al., en 1998, mediante utilización de técnicas bioquímicas y de inmunotinción en riñón de rata adulta determinan la presencia negativa de alfa 1 y de beta 1 en la membrana basal glomerular mientras que en la misma membrana basal glomerular obtienen expresión fuertemente intensa para la cadena gamma 1.

Virtanen y colaboradores en 1995, mediante utilización de técnicas de inmunofluorescencia indirecta en biopsias de riñón adulto humano determinan, de forma coincidente a los resultados anteriormente citados para ratón y rata adultos, la presencia positiva de gamma 1 y negativa de beta 1 en las membranas basales glomerulares, así como también presencia positiva de la cadena alfa 1 en las membranas basales tubulares. No obstante y en controversia con el resultado de los autores anteriormente citados, obtiene resultados positivos a la presencia de la cadena alfa 1 en la membrana basal glomerular.

La diferencia de resultados en relación a la localización de la cadena alfa 1 en la membrana basal glomerular de riñón adulto indujo a Sorokin et al. (1997) a obtener nuevos anticuerpos monoclonales de fragmentos concretos de la cadena alfa 1. Con la utilización de técnicas de inmunofluorescencia determinó la presencia de dicha cadena polipeptídica sólo en la membrana basal de los túbulos proximales y de la cápsula de Bowman, si bien el mismo indica que los resultados mediante técnicas de inmunofluorescencia deben interpretarse con sumo cuidado.

Distintos autores obtienen resultados semejantes entre si sobre la detección de la laminina en el mesangio en riñones adultos de ratón independientemente del tipo de

metodología utilizada bien sea por medio de la utilización de antisueros policlonales de laminina-1, mediante antisueros monoclonales de regiones moleculares concretas de laminina-1 o por medio de anticuerpos monoclonales específicos y por separado para cada uno de los monómeros de la misma.

Otros autores confirman la presencia de laminina en la matriz mesangial (Madri et al., 1980; Ekblom, 1981; Courtoy et al., 1982; Abrahamson, 1985; Mounier et al., 1986). También, Abrahamson y St. John, en 1993, obtienen resultados positivos en la matriz mesangial utilizando anticuerpos monoclonales contra porciones del terminal del brazo largo de la laminina-1 (5D3) y de la zona de entrecruzamiento de los tres brazos de la misma (8B3) mientras que Sterk et al. (1998), en glomérulo de rata indican que las células mesangiales segregan laminina-1.

Con la utilización de anticuerpos monoclonales anti alfa 1, Sanes et al. (1990) obtienen resultados positivos en la matriz mesangial, no obstante con intensidades variables desde valores comprendidos entre una intensidad intermedia hasta débil; estos resultados se asemejan al concepto de débil de Miner et al. (1997) y de difuso de Sorokin et al. (1997). Los resultados obtenidos por Sanes et al. (1990) y Miner y Sanes, en 1994, para la determinación de la cadena beta 1 en la matriz mesangial también son positivos en ambos casos; si bien, también difieren en la intensidad del resultado, dando valores de intensidad débil e intensa respectivamente. Para la cadena de laminina gamma 1 tanto Sanes et al. (1990), como Miner y Sanes (1994) obtienen resultados positivos con valoración intermedia en la matriz mesangial.

En 1998, Sterk et al., mediante la utilización de técnicas de tinción inmunohistoquímicas en riñón humano adulto obtienen valores negativos en la matriz mesangial tanto para la cadena alfa 1 como para la gamma 1 de laminina y no hacen referencia a la localización de la cadena beta 1.

En glomérulos de riñón humano mediante estudios ultraestructurales y de inmunofluorescencia se ha puesto de manifiesto la expresión de la laminina en toda la membrana basal glomerular y en la matriz mesangial (Ekblom et al., 1982; Smith et al., 1989).

En nuestro estudio, mediante la técnica de la inmunoperoxidasa en muestras de ratón adulto de laboratorio, los resultados, presentan un claro marcaje a la presencia de laminina en la membrana basal tubular y en la cápsula de Bowman, así como un marcaje difuso sobre la región de la matriz mesangial, el cual no nos permite dar una valoración concluyente. Los resultados obtenidos mediante la técnica de la inmunofluorescencia para la localización de la molécula de laminina, son semejantes a los obtenidos mediante la técnica de la inmunoperoxidasa y por tanto si bien mediante estas dos técnicas podríamos determinar, de forma general, la presencia de laminina en la membrana basal tubular proximal, en la cápsula de Bowman y en la membrana basal glomerular no podemos concluir de forma categórica la presencia de ésta molécula en la matriz mesangial. Así, coincidimos plenamente con los resultados positivos obtenidos por Madri et al. (1980), Abrahamson y Caulfield (1981), Abrahamson y Caulfield (1982), Abrahamson et al. (1983), Abrahamson (1985), Abrahamson y Caulfield (1985), Abrahamson (1986), Mounier et al. (1986), Desjardins y Bendayan (1991) y Sorokin et al. (1997) sobre la presencia de laminina en la membrana basal peritubular, la cápsula de Bowman y la membrana basal glomerular. Nuestros resultados son no obstante discrepantes de los obtenidos por Abrahamson y St. John (1993), en cuanto a la localización de la laminina con resultados débilmente positivos en la membrana basal glomerular y claramente reactivos para el mesangio; si bien estos autores utilizaron anticuerpos monoclonales para regiones concretas de la molécula de laminina.

Al utilizar anticuerpos policlonales contra laminina-1 podríamos interpretar los resultados positivos de Sanes et al. (1990), Miner y Sanes (1994) y Sterk et al. (1998)

para la presencia de la cadena gamma 1 en la membrana basal glomerular como coincidentes con los nuestros; así como, también podríamos valorar como coincidentes los resultados positivos a la cadena alfa 1 de la membrana basal tubular de Miner et al. en 1997.

Con respecto a la localización positiva de laminina en la matriz mesangial citada por Madri et al. (1980), Ekblom (1981), Courtoy et al. (1982), Abrahamson (1985), Mounier et al. (1986) y Abrahamson y St John (1993) en ratón y por Sterk et al. (1998), en rata, no podemos afirmar, mediante las técnicas de la inmunoperoxidasa y la inmunofluorescencia, que estamos en total acuerdo debido a nuestros resultados poco concluyentes mediante éstas técnicas si bien al igual que Sorokin et al. (1997), interpretamos la localización exacta de la molécula de laminina sobre las estructuras glomerulares mediante las técnicas de la inmunoperoxidasa y la inmunofluorescencia con sumo cuidado.

La técnica de marcaje con oro coloidal, nos permite dar resultados más resolutivos y definitivos. Así, podemos afirmar que para las muestras de riñón de ratón adulto el marcaje es claramente positivo tanto para la membrana basal peritubular como para la membrana basal glomerular en la porción pericapilar y en la perimesangial.

De acuerdo con nuestros resultados, la localización exacta de la molécula de laminina en la membrana basal glomerular pericapilar parece que no está exclusivamente ligada a ninguna de las láminas raras ni a la densa; si bien estos resultados apoyan el criterio de que existe una ligera tendencia a que esta molécula se localice a nivel de las láminas raras tanto externa como interna. De este modo, los resultados obtenidos están más de acuerdo con los obtenidos por Abrahamson (1986), quién la sitúa tanto en las láminas raras como en la lámina densa y no son coincidentes con los de Courtoy y colaboradores (1980b y 1982), quienes la sitúan exclusivamente en las láminas rara externa e interna y no en la densa.

Además, mediante la técnica del oro coloidal también obtenemos resultados claramente positivos para la matriz mesangial y por lo tanto coincidentes con los de Madri et al. (1980), Ekblom (1981), Courtoy et al. (1982), Abrahamson (1985), Mounier et al. (1986), Abrahamson y St John (1993), en ratón y con los de Sterk et al. (1998), en rata y de forma interpolada con los resultados de Sanes et al. (1990), Miner y Sanes (1994), Miner et al. (1997) y Sorokin et al. (1997) para la determinación positiva de las cadenas alfa 1, beta 1 y gamma 1.

Los resultados de distribución de la laminina obtenidos en *Mus musculus*, al igual que para la fibronectina son extrapolables a los obtenidos para las especies de roedores silvestres *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus*, si bien y también de forma semejante a lo que ocurre con la molécula de fibronectina la intensidad de marcaje es mucho menor en ambas especies en comparación con lo que ocurre en el ratón de laboratorio. Otra coincidencia de resultados entre las moléculas de laminina y fibronectina y la especie *Apodemus sylvaticus* es la de que ninguna de las muestras procesadas han mostrado resultados positivos a la presencia de laminina en esta especie.

5.3 Membrana basal glomerular

En las muestras procedentes de *Mus spretus*, *Apodemus sylvaticus* y *Clethrionomys glareolus* aparece una característica común y diferenciadora con las del ratón de laboratorio. Mientras en la membrana basal glomerular del ratón de laboratorio podemos observar las tres láminas de densidad variable a los electrones (láminas raras externa e interna y lámina densa central) en ninguna de las muestras de las tres especies silvestres anteriormente citadas aparece dicha diferenciación trilaminar; en ellas las membranas basales glomerulares aparecen con densidad prácticamente uniforme en todo su espesor y también con densidad uniforme en comparación con la matriz mesangial.

El cómo las moléculas segregadas por las células epiteliales viscerales por un lado y las células endoteliales por otro se "fundan" entre sí, en una capa trilaminar, a partir de dos bilaminares, no ha sido todavía explicado. Tampoco podemos explicar cómo la trilaminar lo hace, en estos casos, en una monolaminar. No obstante, cabe pensar que la diferencia de densidades es posible bajo el concepto de distribución, disposición y/o proporción del conjunto de cada una de las moléculas que estructuran la membrana basal glomerular de una forma asimétrica y que si bien existe una secreción asimétrica de los componentes de la membrana basal glomerular (Lee et al., 1993; Sorokin et al., 1997) esto no implica que estos componentes no puedan distribuirse de forma simétrica, con localización relativamente distante a su lugar de síntesis, aunque ello comporte un flujo direccional de los componentes a través de todo el espesor de la membrana basal glomerular.

5.4 Apodemus sylvaticus

Ninguna de las muestras procesadas de *Apodemus sylvaticus* han mostrado resultados positivos a la presencia de fibronectina y de laminina; para su localización fueron utilizados en una primera fase de experimentación los mismos anticuerpos comerciales que se utilizaron para el resto de las especies, tanto de laboratorio como silvestres, primero con los mismos valores de dilución y posteriormente con valores superiores. En una segunda fase de localización, se utilizaron los mismos tipos de anticuerpos comerciales pero suministrados por otras casas comerciales con el mismo resultado negativo.

Cabe recordar que actualmente se considera a cada una de las matrices extracelulares como exclusiva de su tejido y por tanto de las funciones que éste desempeñe. Así, es posible, que dentro de un mismo tipo de tejido, en diferentes especies animales, las moléculas que conforman la membrana basal glomerular puedan presentar distinta distribución, disposición y/o proporción si es que entre ellas existen diferencias

dentro de las propias funciones; como por ejemplo, ocurre con la adaptación a una dieta natural que puede afectar tanto al metabolismo renal como a los perfiles urinarios como indican Xiaoling et al. (1998) y Griffin et al. (2000), quienes demuestran que los datos metabólicos de las especies de laboratorio no pueden extenderse, sin confirmación, a las especies silvestres. En relación con esta característica recordemos también, que algunas isoformas de laminina desaparecen mientras otras hacen su aparición a medida que avanza el desarrollo embrionario del organismo (Ekblom et al., 1990; Miner y Sanes, 1994; Miner et al., 1997; Sorokin et al., 1997; Kashtan et al., 2001). También es posible que no toda la molécula varíe sino quizá ciertos epitopes de las moléculas, como apuntan Abrahamson et al. (1989) y Abrahamson y St John (1993), en el periodo posterior al desarrollo glomerular y al de maduración del glomérulo; además, como ocurre en las patologías renales, la variación en la proporción y/o distribución de una molécula influye en la variación y aparición de otras moléculas o de sus isoformas como ocurre por ejemplo con el colágeno tipo IV y la laminina y la fibronectina (Cosgrove et al., 1996; Miner y Sanes 1996; Lees et al., 1998; Cosgrove et al., 2000; Kashtan et al., 2001; Andrews et al., 2002).

También estudios realizados sobre determinados grupos de proteínas, han determinado que éstas han ido modificando su estructura original junto con los cambios evolutivos de un determinado grupo filogenético (Sarich et al., 1967, Wilson et al., 1977). De forma inversa Sayama y colaboradores en 1991, utilizando anticuerpos anti colágeno tipo IV de la membrana basal sobre corpúsculos y túbulos renales expone el nivel de proximidad o distanciamiento filogenético entre algunas especies de vertebrados utilizados como animales de laboratorio (rata, ratón, praoimis, jerbo, hámster, cobaya, conejo, musaraña, vaca y pollo) y entre ellas y el ser humano, tomando como base el menor o mayor grado de reactividad inmunológica entre determinantes antigénicos. Así, las relaciones filogenéticas que obtienen entre las distintas especies utilizadas ponen de manifiesto que éstas están en posición

filogenética más cercana al ratón de laboratorio (*Mus musculus*) siguiendo el siguiente orden: el praomis (*Praomys coucha*); el grupo formado por la rata (*Rattus norvegicus*), el jerbo (*Meriones unguiculatus*) y el hámster (*Mesocricetus auratus*); el cobaya (*Cavia porcellus*); el grupo formado por el ser humano (*Homo sapiens*), la musaraña (*Suncus murinus*) y el conejo (*Oryctolagus cunicullus*); la vaca (*Bos taurus*) y el pollo (*Gallus domesticus*). Es de remarcar que los miembros del Orden *Rodentia* que se utilizaron (ratón, rata, jerbo, hámster y cobaya) están mucho más subdivididos que los otros órdenes por la antigenicidad del colágeno tipo IV de ratón. Así, a tenor de los resultados obtenidos, se indica que el praomis, asignado taxonomicamente primero al género *Mus* y posteriormente al género *Rattus*, está más cerca filogenéticamente del ratón que de la rata; que tanto la rata, como el jerbo y el hámster pertenecientes a familias taxonómicas diferentes (*Muridae* y *Cricetidae*) están igualmente alejados, por su antegenicidad, del ratón pero sin embargo, están más cercanos que el cobaya perteneciente a la familia de los cricétidos.

Si el colágeno tipo IV, el mayoritario de las laminas basales, no comparte los mismos determinantes entre especies filogenéticas cercanas y/o de un mismo grupo taxonómico se reafirma el concepto de que las láminas basales y sus componentes moleculares deben ser consideradas como exclusivas de su tejido. Además la variación molécula de uno de sus componentes estructurales posiblemente está asociada al hecho de que las moléculas que interrelacionan con dicho componente, en nuestro caso la laminina y la fibronectina, también podrían haber variado evolutivamente, haciendo posible la falta o ausencia de reactividad de los anticuerpos comerciales en algunas especies.

CONCLUSIONES

- 1.- La ultraestructura trilaminar de la membrana basal glomerular presente en *Mus musculus* no es observable ni en *Mus spretus*, ni en *Apodemus sylvaticus*, ni en *Clethrionomys glareolus*; presentando en estas tres especies una densidad prácticamente uniforme en todo su espesor.
- 2.- Ultraestructuralmente, en todas las especies de roedores silvestres utilizadas la membrana basal pericapilar, la membrana basal perimesangial y la matriz mesangial presentan una misma densidad uniforme; lo cual no permite diferenciar el límite entre la membrana basal glomerular perimesangial y la matriz mesangial.
- 3.- En las especies *Mus musculus*, *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus* la fibronectina se localiza única y exclusivamente a nivel de la matriz mesangial y en ningún caso en las membranas basales glomerulares.
- 4.- En las especies de *Mus musculus*, *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus* la laminina se localiza tanto a nivel de las membranas basales glomerulares, pericapilar y perimesangial, como en la cápsula de Bowman, la membrana basal tubular y la matriz mesangial.
- 5.- La presencia de la laminina en la membrana basal glomerular pericapilar muestra una ligera tendencia a localizarse en las láminas raras externa e interna.

6.- El marcaje menos intenso en *Mus spretus* y *Clethrionomys glareolus* y la ausencia del mismo en *Apodemus sylvaticus* para la fibronectina y la laminina en la membrana basal glomerular y la matriz mesangial puede indicar un carácter de divergencia filogenética que corroboraría la idea de la especificidad de los componentes moleculares exclusivos respecto a un tejido y a una especie.

Bibliografia

Abrahamson, D.R. (1985) Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys. *J. Cell Biol.*, 100:1988-2000.

Abrahamson, D.R. (1986) Post-embedding colloidal gold immunolocalization of laminin to the lamina rara interna, lamina densa, and lamina rara externa of renal glomerular basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.*, 34:847-853.

Abrahamson, D.R. (1987) Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am. J. Physiol.*, 253:783-794.

Abrahamson, D.R. (1991) Glomerulogenesis in the developing kidney. *Sem. Nephrol.*, 11:375-389.

Abrahamson, D.R.; Caulfield, J.P. (1981) Laminin distribution in the rat glomerulus. *J. Cell Biol.*, 91, (2 pt 2) 148a.

Abrahamson, D.R.; Caulfield, J.P. (1982) Proteinuria and structural alterations in rat glomerular basement membranes induced by intravenously injected anti-laminin immunoglobulin G. *J. Exp. Med.*, 156:128-145.

Abrahamson, D.R.; Caulfield, J.P. (1985) Distribution of laminin within rat and mouse renal, splenic, intestinal, and hepatic basement membranes identified after the intravenous injection of heterologous anti-laminin IgG. *Lab. Invest.*, 52:169-181.

Abrahamson, D.R.; Hein, A.; Caulfield, J.P. (1983) Laminin in glomerular basement membranes of aminonucleoside nephrotic rats. Increased proteinuria induced by anti-laminin immunoglobulin. *G. Lab. Invest.*, 48:263-268.

Abrahamson, D.R.; Perry, E.W. (1986) Distribution of intravenously injected cationized ferritin within developing glomerular basement membranes of newborn rat kidneys. *Anat. Rec.*, 216:534-543.

Abrahamson, D.R.; St. John, P.L. (1993) Laminin distribution in developing glomerular basement membranes. *Kidney International*, 43:73-78.

Abrass, C.K.; Adcox, M.J.; Raugi, G.J. (1995) Aging-Associated changes in renal extracellular matrix. *Am. J. Pathol.*, 146:742-752.

Abrass, C.K.; Spicer, D.; Raugi, G.J. (1994) Insulin induces a change in extracellular matrix glycoproteins synthesized by rat mesangial cells in culture. *Kidney Int.*, 46:613-620.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1983) *Molecular Biology of the Cell*. Ed. Garland Publishing, Inc. New York.

Alexander, S. S.; Colonna, G.; Edelhoch, H. (1979) The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin. *J. Biol. Chem.*, 254:1501-1505.

Alexander, S.S.; Colonna, G.; Yamada, K. M.; Pastan, I.; Edelhoch, H. (1978) Molecular properties of a major cell surface protein from chick embryo fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 253:5820-5824.

Ali, I.U.; Mautner, V.M.; Lanza, R.P.; Hynes, R.O. (1977) Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation-sensitive surface protein. *Cell*, 11:115-126.

Alitalo, K.; Hovi, T.; Vaheri, A. (1980a) Fibronectin is produced by human macrophages. *J. Exp. Med.*, 151:602-613.

Alitalo, K.; Kurkinen, M.; Vaheri, A.; Krieg, T.; Timpl, R. (1980b) Extracellular matrix components synthesis by human amniotic epithelial cells in culture. *Cell*, 19:1053-1062.

- Altroff, H.; van Der Walle, C.F.; Asselin, J.; Fairless, R.; Campbell, I.D.; Mardon, H.J.** (2001) The Eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha 5 beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *J. Biol. Chem.*, 276(42): 38885-38892.
- Andac, Z.; Sasaki, T.; Mann, K.; Brancaccio, A.; Deutzmann, R.; Timpl, R.** (1999). Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, 287:253-264.
- Andrews, K.L.; Mudd, J.L.; Li, C.; Miner, J.H.** (2002) Quantitative trait loci influence renal disease progression in a mouse model of Alport syndrome. *Am. J. Pathol.*, 160:721-730.
- Ann, S.S.; Jiménez-Barbero, J.; Petersen, T.E.; Llinás, M.** (1992) The two polypeptide chains in fibronectin are joined in antiparallel fashion: NMR structural characterization. *Biochemistry*, 31:9927-9933.
- Antignac, C.** (1995) Molecular genetics of basement membranes: the paradigm of Alport syndrome. *Kidney Int.*, 47 (Suppl 49):S29-S33.
- Arakawa, M.** (1970) Scanning Electron Microscopy of the Glomerulus of Normal and Nephrotic Rats. *Lab. Invest.*, 23:489-496.
- Atherton, B.T.; Hynes, R.O.** (1981) A difference between plasma and cellular fibronectins located with monoclonal antibodies. *Cell*, 25:133-141.
- Atkin, C.L.; Gregory, M.C.; Border, W.A.** (1988) Alport syndrome. En *Diseases of the Kidney*. Eds Schrier, R.W.; Gottschalk, C.W. Little, Brown and Company, Boston. pp. 617-641
- Aumailley, M.** (1995) Structure and supramolecular organization of basement membranes. *Kidney Int.*, 47 (suppl 49):S4-S7.
- Aumailley, M.; Gayraud, B.** (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.*, 76:253-265.
- Aumailley, M.; Krieg, T.** (1996) Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J. Invest. Dermatol.*, 106:209-214.

- Aumailley, M.; Timpl, R.; Sonnenberg, A.** (1990) Antibody to integrin alpha 6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8. *Exp. Cell Res.*, 188:55–60.
- Ausiello, D.A.; Kreisberg, J. I.; Roy, C.; Karnovsky, M.J.** (1979) Contraction of cultured rat mesangial cells after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *Kidney Int.*, 16:804a.
- Bachmann, S.; Sakai, T.; Kriz, W.** (1988) Bichler, Strohmaier, Nephrocalcinosis, calcium antagonist, and kidney. En *Nephron and collecting duct structure in the kidney rat*. Ed. Springer, Heidelberg. pp. 7-33.
- Bargmann, W.; Von Hehn, G.** (1971) Über das Nephron der Elasmobranchier. *Z. Zellforsch.*, 114:1-21.
- Baron, M.; Main, A.L.; Driscoll, P.C.; Mardon, H.J.; Boyd, J.; Campbell, I.D.** (1992) Assignment and secondary structure of the cell adhesion type III module of fibronectin. *Biochemistry*, 31:2068-2073.
- Baron, M.; Norman, D.G.; Willis, A.; Campbell, I.D.** (1990) Structure of the fibronectin type 1 module. *Nature*, 345:642-646.
- Bassel-Duby, R.; Jayasuriya, A.; Chatterjee, D.; Sonenberg, N.; Maizel, J.V. Jr.; Fields, B.N.** (1985) Sequence of reovirus haemagglutinin predicts a coiled-coil structure. *Nature*, 315:421-423.
- Beck, K.; Dixon, T.W.; Engel, J.; Parry, D.A.** (1993) Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J. Mol. Biol.*, 231:311-323.
- Benecky M.J.; Kolvenbach C.G.; Amrani D.L.; Mosesson M.W.** (1988) Evidence that binding to the carboxyl-terminal heparin-binding domain (Hep II) dominates the interaction between plasma fibronectin and heparin. *Biochemistry*, 27:7565-7571.
- Bentley, P.J.** (1971) *Endocrines and osmoregulation*. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Bergijk, E.C.; Munaut, C.; Baelde, J.J.; Prins, F.; Foidart, J.M.; Hoedemaeker, P.J.; Bruijn, J.A.** (1992) A histologic study of the extracellular matrix during the

- development of glomerulosclerosis in murine chronic graft-versus-host disease. *Am. J. Pathol.*, 140:1147–1156.
- Bernfield, M.** (1989) Extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1: 953-955.
- Birdwell, C.R.; Gospodarowicz, D.; Nicolson, G.L.** (1978) Identification, localization and role of fibronectin in cultured bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3273-3277.
- Blau, E.B.; Haas, J.E.** (1973) Glomerular sialic acid and proteinuria in human renal disease. *Lab. Invest.*, 28:477-481.
- Blumberg, B.; MacKrell, A.J.; Olson, P.F.; Kurkinen, M.; Monson, J.M.; Natzle, J.E.; Fessler, J.H.** (1987) Basement membrane procollagen IV and its specialized carboxyl domain are conserved in *Drosophila*, mouse, and human. *J. Biol. Chem.*, 262:5947-5950.
- Blumenstock, F.A.; Saba, J.M.; Weber, P.; Cho, E.** (1976) Purification and biochemical characterization of a macrophage stimulating alpha-2-globulin opsonic protein. *Res. J. Reticuloendothel. Soc.*, 19:157-172.
- Bork, P.** (1992) Motif modules and motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:413-421.
- Bork, P.; Doolittle R.F.** (1992) Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:8990-8994.
- Boselli, J.M.; Macarak, E.J.; Clark, C.C.; Brownell, A.G; Martínez-Hernández, A.** (1981) Fibronectin: its relationship to basement membrane. I. Light microscopic studies. *Coll. Res.*, 5:391-404.
- Boutaud, A.; Borza, D.B.; Bondar, O.; Gunwar, S.; Netzer, K.O.; Singh, N.; Ninomiya, Y.; Sado, Y.; Noelken, M.E.; Hudson, B.G.** (2000) Type IV collagen of the glomerular basement membrane: evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.*, 275:30716-30724.
- Bowditch R.D.; Hariharan M.; Tominna E.F.; Smith J.W.; Yamada K.M.; Getzoff E.D.; Ginsberg M.H.** (1994) Identification of a novel integrin binding site

in fibronectin. Differential utilization by beta 3 integrins. *J Biol Chem.*, 269:10856-10863.

Bowe, M.A.; Deyst, K.A.; Leszyk, J.D.; Fallon, J.R. (1994) Identification and purification of an agrin receptor from *Torpedo* postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron*, 12:1173-1180.

Brazel, D.; Oberbaumer, I.; Dieringer, H.; Babel, W.; Glanville, R.W.; Deutzmann, R.; Kuhn, K. (1987) Completion of the amino acid sequence of the alpha 1 chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non-triplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur. J. Biochem.*, 168:529-536.

Bulger R. E. (1986) En *Histología , biología celular y tisular*; León Weiss Ed. El Ateneo, 5a ed. Buenos Aires. pp. 793-832

Bulger, R.E.; Trump, B.F. (1968) Renal morphology of the English sole (*Parophrys vetulus*). *Am. J. Anat.*, 123:195-226.

Burger, J.W.; Hess, W.N. (1960) Function of the rectal gland in the spiny dogfish. *Science*, 131:670-671.

Burgeson, R.E.; Chiquet, M.; Deutzmann, R.; Ekblom, P.; Engel, J.; Kleinman, H.; Martin, G.R.; Meneguzzi, G.; Paulsson, M.; Sanes, J.; Timpl, R.; Tryggvason, K.; Yamada, Y.; Yurchenco, P. D. (1994) A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.*, 14:209–211.

Butkowski, R.J.; Wieslander, J.; Kleppel, M.; Michael, A.F.; Fish, A.J. (1989) Basement membrane collagen in the kidney: Regional localization of novel chains related to collagen IV. *Kidney Int.*, 35:1195–1202.

Büyükbabani, N.; Droz, D. (1994) Distribution of extracellular matrix components in human glomerular lesions. *J. Pathol.*, 172:199-207.

Cai, Y.; Beziau, A.; Sich, M.; Kleppel, M.M.; Gubler, M.C. (1996) Collagen distribution in human membranous glomerulonephritis. *Pediatr. Nephrol.*, 10:14–21.

- Cai, Y.I.; Sich, M.; Beziau, A.; Kleppel, M.M.; Gubler, M.C.** (1996) Collagen distribution in focal and segmental glomerulosclerosis: an immunofluorescence and ultrastructural immunogold study. *J. Pathol.*, 179:188–196.
- Carlin, B.; Jaffe, R.; Bender, B.; Chung, A.E.** (1981) Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 256:5209-5214.
- Carter, W.G.; Ryan, M.C. ; Gahr, P.J.** (1991) Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alfa 3 beta 1 in ephitelial basement membranes. *Cell*, 65:599-610.
- Claudy, A.L.** (1987) La laminine. *Séminaire INSERM.*, 148:103-110.
- Caulfield, J.P.** (1979) Alterations in the distribution of alcian blue staining fibrillar anionic sites in the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest.*, 40:503-511.
- Cohen, M.P.; Sharma, K.; Ziyadeh, F.N.** (1997) The renal TGF-beta system in the db/db mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 46[Suppl 1]:47a.
- Cognato, H.; MacCarrick, M.; O'Rear, J.J.; Yurchenco, P.D.** (1997) The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1 beta1 and alpha2 beta1 integrins. *J. Biol. Chem.*, 272: 29330–29336.
- Cognato, H.; Yurchenco, P.D.** (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics*, 218:213-234.
- Cognato-Pyke, H.; O'Rear, J.J.; Yamada, Y.; Carbonetto, S.; Cheng, Y.S.; Yurchenco, P.D.** (1995) Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha chain short arm of laminin-1. *J. Biol. Chem.*, 270:9398–9406.
- Constantine, K.L.; Brew, S.A.; Ingham, K.C.; Llinás, M.** (1992a) ¹H-NMR studies of the fibronectin 13 kDa collagen binding fragment. *Biochem J.*, 283:247-254.
- Constantine, K.L.; Madrid, M.; Bányai, L.; Trexler, M.; Patthy, L.; Llinás, M.** (1992b) Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b. *J. Mol. Biol.*, 223:281-298.

- Constantine, K.L.; Ramesh, V.; Bányai, L.; Trexler, M.; Patthy, L.; Llinás, M.** (1991) Sequence-specific ¹H-NMR assignments and structural characterization of bovine seminal fluid protein PDC-109 domain b. *Biochemistry*, 30:1663-1672.
- Cooper, A.R.; Kurkinen, M.; Taylor, A.; Hogan, B.L.M.** (1981) Studies on the biosynthesis of laminin by murice parietal endoderm cells. *Eur. J. Biochem.*, 119:189-197.
- Cosgrove, D.; Meehan, D.T.; Grunkemeyer, J.A.; Kornak, J.M.; Sayers, R.; Hunter, W.J.; Samuelson, G.C.** (1996) Collagen COL4A3 knockout: A mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev.*, 10:2981-2992.
- Cosgrove, D.; Rodgers, K.; Meehan, D.; Miller, C.; Bovard, K.; Gilroy, A.; Gardner, H.; Kotelianski, V.; Gotwals, P.; Amatucci, A.; Kalluri, R.** (2000) Integrin alpha1 beta1 and Transforming growth factor-beta1 play distinct roles in Alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am. J. Pathol.*, 157:1649-1659.
- Cotman, S.L.; Halfter, W.; Cole, G.J.** (1999) Identification of extracellular matrix ligands for the heparan sulfate proteoglycan agrin. *Exp. Cell Res.*, 249:54-64.
- Couchmann, J.R.; Woods, A.** (1993) Structure and biology of pericellular proteoglycans. En *Cell Surface and Extracellular Glyconjugates*. Eds. Roberts, D.D.; Mecham, R.R., Academic Press, San Diego. pp. 33-82.
- Courtoy, P.J.; Kanwar, Y.S.; Hynes, R.O.; Farquhar, M.G.** (1980a) Fibronectin localization in the rat glomerulus. *J. Cell Biol.*, 87:691-696.
- Courtoy, P.J.; Kanwar, Y.S.; Timpl, R.; Hynes, R.O.; Farquhar, M.G.** (1980b) Comparative distribution of fibronectin, type IV collagen and laminin in the rat glomerulus. *J. Cell Biol.*, 87, (2 pt 2) 124.
- Courtoy, P.J.; Timpl, R.; Farquhar, M.G.** (1982) Comparative distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in the rat glomerulus. *J. Histochem. Cytochem.* 30:874-886.
- Crouch, E.; Balian, G.; Holbrook, K.; Duksin, D.; Bornstein, P.** (1978) Amniotic fluid fibronectin. *J. Cell Biol.*, 78:701-715.

Chakravarti, S.; Tam, M.F.; Chung, A.E. (1990) The basement membrane glycoprotein entactin promotes cell attachment and binds calcium ions. *J. Biol. Chem.*, 265:10597-10603.

Champlaud, M.F.; Lunstrum, G.P.; Rousselle, P.; Nishiyama, T.; Keene, D.R.; Burgeson, R.E. (1996) Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J. Cell Biol.* 132:1189–1198.

Charonis, A.S.; Tsilibary, E.C.; Yurchenco, P.D.; Furthmayr, H. (1985) Binding of laminin to type IV collagen: a morphological study. *J. Cell Biol.*, 100:1848-1853.

Chen, L.B. (1977) Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis. *Cell*, 10:393-400.

Chen, L.B.; Maitland, N.; Gallimore, P.H.; Mcdougall, J.K. (1977) Detection of the large external transformation-sensitive protein on some epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, 106:39-46.

Chernousov, M.A.; Fogerty, F.J.; Koteliansky, V.E.; Mosher, D.F. (1991) Role of the I-9 and III-1 modules of fibronectin in formation of an extracellular fibronectin matrix. *J. Biol. Chem.*, 266:10851-10858.

Chernousov, M.A.; Metsis, M.L.; Koteliansky, V.E. (1985) Studies of extracellular fibronectin matrix formation with fluoresceinated fibronectin and fibronectin fragments. *FEBS Lett.*, 183:365-369.

Chew, R.M. (1961) Water metabolism of desert-inhabiting vertebrates. *Biol. Rev.* 36: 1-31.

Chi, H-C.; Hui, C.-F. (1989) Primary structure of *Drosophila* laminin B2 chain and comparison with human, mouse, and *Drosophila* laminin B1 and B2 chains. *J. Biol. Chem.*, 25:1543-1550.

Chiquet, M.; Masuda-Nakagawa, L.; Beck, K. (1988) Attachment to an endogenous laminin-like protein initiates sprouting by leech neurons. *J. Cell Biol.*, 107:1189-1198.

- Chung, A.E.; Jaffe, R.; Freeman, I.L.; Vergnes, J.P.; Braginski, J.E.; Carlin, B.** (1979) Properties of a basement membrane related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell*, 16:277-287.
- Damsky, C.H.; Werb, Z.** (1992) Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4:772-781.
- De Krogh, A.** (1939) *Osmotic Regulation in Animals*. Ed. University Press, Cambridge.
- De Ruiter, A.J.H.** (1981) Testosterone-dependent changes in vivo and in vitro in the structure of the renal glomeruli of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *Cell tissue Res.*, 219:253-266.
- De Sperber.** Studies on mammalian Kidney. *Zoll. Bidr. Upps.* 22: 249-432.
- De Vos, A.M.; Ultsch, M.; Kossiakoff, A.A.** (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255:306-312.
- Denzer, A.J.; Brandenberger, R.; Gesemann, M.; Chiquet, M.; Rugg, M.A.** (1997) Agrin binds to the nerve-muscle basal lamina via laminin. *J. Cell. Biol.*, 137:671-683.
- Denzer, A.J.; Schulthess, T.; Fauser, C.; Schumacher, B.; Kammerer, R.A.; Engel, J.; Rugg, M.A.** (1998) Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO J.*, 17:335-343.
- Derynck, R.; Roberts, A.B.; Winkler, M.E.; Chen, E.Y.; Goeddel, D.V.** (1984) Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell*, 38:287-297.
- Desjardins, M.; Bendayan, M.** (1991) Ontogenesis of glomerular basement membrane: Structural and functional properties. *J. Cell Biol.*, 113:689-700.
- Desjardins, M.; Gros, F.; Wieslander, J.; Gubler, M.-C.; Bendayan, M.** (1990) Heterogeneous distribution of monomeric elements from the globular domain (NC1)

of type IV collagen in renal basement membranes as revealed by high resolution quantitative immunocytochemistry. *Lab. Invest.*, 63:637-646.

Dessau, W.; Sasse, J.; Timpl, R.; Jilek, F.; Von Der Mark, K. (1978) Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. *J. Cell. Biol.*, 79:342-355.

Dickinson C. D.; Veerapandian B.; Dai X. P.; Hamlin R. C.; Xuong N.H.; Ruoslahti E.; Ely K. R. (1994) Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *J. Mol. Biol.*, 236:1079-1092.

Dion, A.S.; Myers, J.C. (1987) COOH-terminal propeptides of the major human procollagens. Structural, functional and genetic comparisons. *J. Mol. Biol.*, 193:127-143.

Doolittle. R.F.; Bork, P. (1993) Evolutionarily mobile modules in proteins. *Sci. Am.*, 269:50-56.

Doolittle R.F.; Goldbaum, D.M.; Doolittle, L.R. (1978) Designation of sequences involved in the "coiled-coil" interdomainal connections in fibrinogen: constructions of an atomic scale model. *J. Mol. Biol.*, 120:311-325.

Doolittle, R.F. (1985) The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 114:233-237.

Downie, S.A.; Newman, S.A. (1995) Different roles for fibronectin in the generation of fore and hind limb precartilaginous condensations. *Develop. Biol.*, 172:519-530.

Ehara, T.; Carone, F.A.; McCarthy, K.J.; Couchman, J.R. (1994) Basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan alterations in a rat model of polycystic kidney disease. *Am. J. Pathol.*, 144:612-621.

Ekblom, M.; Falk, M.; Salmivirta, K.; Durbeej, M.; Ekblom, P. (1998) Laminin isoforms and epithelial development. *Ann. NY Acad. Sci.*, 857:194-211.

Ekblom, M.; Klein, G.; Mugrauer, G.; Fecker, L.; Deutzman, R.; Timpl, R.; Ekblom, P. (1981) Formation of basement membranes in the embryonic kidney: An immunohistochemical study. *J. Cell Biol.*, 91:1-10.

- Ekblom, P.** (1990) Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis. *Cell*, 60:337-346.
- Ekblom, P.; Ekblom, M.; Fecker, L.; Klein, G.; Zhang, H.-Y.; Kadoya, Y.; Chu, M.-L.; Mayer, U.; Timpl, R.** (1994) Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development*, 120:2003-2014.
- Ekblom, P.; Lehtonen, E.; Saxén, L.; Timpl, R.** (1981) Shift in collagen type as an early response to induction of the metanephric mesenchyme. *J. Cell Biol.*, 89:276-283.
- Ekblom, P.; Miettinen, A.; Rapola, J.; Foidart, J.M.** (1982) Demonstration of laminin, a basement membrane glycoprotein, in routinely processed formalin-fixed human tissues. *Histochem.*, 75:301-307.
- Ekblom, P.; Vestweber, D.; Kemler** (1986) Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2:27-47.
- Elger, M., Kaune, R., Hentschel, H.** (1984) Glomerular intermittency in a freshwater teleost, *Carassius auratus gibelio*, after transfer to salt water. *J. comp. Physiol. B.*, 154, 225-231.
- Elger, M.; Henschel, H.** (1981) The glomerulus of a stenohaline fresh-water teleost, *Carassius auratus gibelio*, adapted to saline water: a scanning and transmission electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.*, 220:73-85.
- Engel, J.** (1991) Common structural motifs in proteins of the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3:779-785.
- Engel, J.; Furthmayr, H.** (1987) Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: Laminin, Fibronectin, Collagen IV, Collagen VI and Proteoglycans. *Methods in Enzymology*, 145,3-78.
- Engel, J.; Odermatt, E.; Engel, A.; Madri, J.A.; Furthmayr, H.; Rohde, H.; Timpl, R.** (1981) Shapes domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J. Mol. Biol.* 150:97-120.

- Engvall, E.; Wewer, U.M.** (1996) Domains of laminin. *J. Cell Biochem.*, 61:493-501.
- Erickson, H.P.; Carrell, N.A.** (1983) Fibronectin in extended and compacted conformations. Electron microscopy and sedimentation analysis. *J. Biol. Chem.*, 258:14539-14544.
- Ericksson, A.C.; Couchman, J.R.** (2000) Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.*, 48:1291-1306. Review.
- Erry, B.V.; Macnair, M.R.; Meharg, A.A.; Shore, R.F.** (2000) Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Envir. Poll.*, 110:179-187.
- Ervasti, J.M.; Campbell, K.P.** (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.*, 122:809-823.
- Falk, M.; Ferletta, M.; Forsberg, E.; Ekblom, P.** (1999) Restricted distribution of laminina alfa 1 chain in normal adult mouse tissues. *Matrix Biol.*, 18:557-568.
- Fänge, R.** (1963) Structure and function of the excretory organs of myxinooids. En *The biology of Myxine*, Ed. Brodal y Fänge. Universitetsforlaget, Oslo. pp. 516-529.
- Farquhar, M.G.** (1991) The glomerular basement membrane: A selective macromolecular filter. En Hay, E.D. (ed.): *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York, 2a, ed. pp 365-418.
- Fessler, L.I.; Campbell, A.G.; Duncan, K.G.; Fessler, J.H.** (1987) *Drosophila* laminin: characterization and localization. *J. Cell Biol.*, 105:2383-2391.
- Ffrench-Constant, C.** (1995) Alternative splicing of fibronectin-many different proteins but few different functions. *Exp. Cell. Res.*, 221:261-271.
- Fischer, E.; Mougenot, B.; Callard, P.; Ronco, P.; Rossert, J.** (2000) Abnormal expression of glomerular basement membrane laminins in membranous glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 15:1956-1964.

- Foidart, J.M.; Berman, J.J.; Paglia, L.; Rennard, S.I.; Abe, S.; Pecantoni, A.; Martin, G.R.** (1980) Synthesis of fibronectin, laminin, and several collagens by a liver-derived epithelial cell line. *Lab. Invest.*, 42: 525-532.
- Forster, R.P.; Goldstein, L.** (1979) Amino acids and cell volume regulation. *Yale J. Biol. Med.*, 52:497-515.
- Fox, H.** (1963) The amphibian pronephros. *Quart. Rev. Biol.*, 38:1-25.
- Fox, J.W.; Mayer, U.; Nischt, R.; Aumailley, M.; Reinhardt, D.; Wiedemann, H.; Mann, K.; Timpl, R.; Krieg, T.; Engel, J. et al.** (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.*, 10:3137-3146.
- Frieser, M.; Nöckel, H.; Pausch, F.; Röder, C.; Hahn, A.; Deutzmann, R.; Sorokin, L.M.** (1997) Cloning of the mouse laminin alfa 4 cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur. J. Biochem.*, 246:727-735.
- Fukuda, M.; Hakomori, S.** (1979) Proteolytic and chemical fragmentation of galactoprotein a, a major transformation-sensitive glycoprotein released from hamster embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 254:5442-5449.
- Fukui, M.; Nakamura, T.; Ebihara, I.; Shirato, I.; Tomino, Y.; Koide, H.** (1992) ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes*, 41:1520 -1527.
- Furcht, L.T.; Mosher, D.F.; Wedwlschafer-Crabb, G.** (1978) Effects of cell density and transformation on the formation of a fibronectin extracellular filamentous matrix on human fibroblasts. *Cancer Res.*, 38:4618-4623.
- Gahmberg, C.G.; Hakomori, S.** (1973) Altered behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3329-3333.
- Gee, S.H.; Blacher, R.W.; Douville, P.J.; Provost, P.R.; Yurchenco, P.D.; Carbonetto, S.** (1993) Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin- associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J. Biol. Chem.*, 268:14972-14980.

- Gee, S.H.; Montanaro, F.; Lindenbaum, M.H.; Carbonetto, S.** (1994) A role for dystrophin associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*, 77:663-674.
- Gehris, A.L.; Oberlender, S.A.; Shepley, K.J.; Tuan, R.S.; Benett, V.D.** (1996) Fibronectin m-RNA alternative splicing is temporally and spatially regulated during chondrogenesis in vivo and in vitro. *Develop. Dyn.*, 206:219-230.
- Geisler, N.; Weber, K.** (1982) The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *EMBO J.*, 1:1649-1656.
- Gesemann, M.; Brancaccio, A.; Schumacher, B.; Ruegg, M.A.** (1998) Agrin is a high-affinity binding protein of dystroglycan in non-muscle tissue. *J. Biol. Chem.*, 273:600-605.
- Gesemann, M.; Cavalli, V.; Denzer, A.J.; Brancaccio, A.; Schumacher, B.; Ruegg, M.A.** (1996) Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. *Neuron*, 16:755-767.
- Gesemann, M.; Denzer, A.J.; Ruegg, M.A.** (1995) Acetylcholine receptor aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J. Cell Biol.*, 128:625-636.
- Gordon, M.S., Schmidt-Nielsen, K., Kelly, H.M.** (1961) Osmotic regulation in the crabeating frog (*Rana cancrivora*). *J. Exp. Biol.*, 38:659-678.
- Gordon, M.S., Tucker, V.A.** (1965) Osmotic regulation in the tadpoles of the crabeating frog (*Rana cancrivora*). *J. Exp. Biol.*, 42:437-445.
- Gospodarowicz, D.; Delgado, D.; Vlodavsky, I.** (1980) Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4094-4098.
- Gray, A.; Dull, T.J.; Ullrich, A.** (1983) Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature*, 303:722-725.

Gray, C.J.; Brown, J.A. (1987) Glomerular ultrastructure of the trout, *Salmo gairdneri*: effects of angiotensin II and adaptation to sea water. *Cell Tissue Res.*, 249:437-442.

Griffin, J.L.; Walker, L.A.; Garrod, S.; Holmes, E.; Shore, R.F.; Nicholson, J.K. (2000) NMR spectroscopy based metabonomic studies on the comparative biochemistry of the kidney and urine of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), with the toothed shrew (*Crocidura suaveolens*) and the laboratory rat. *Com. Biochem. Physiol.*, 127B: 357-367.

Griffin, J.L.; Walker, L.A.; Troke, J.; Osborn, D.; Shore, R.F.; Nicholson, J.K. (2000) The initial pathogenesis of cadmium induced renal toxicity. *FEBS Letter*, 478:147-151.

Griffin, J.L.; Walker, L.A.; Shore, R.F.; Nicholson, J.K. (2001) High-resolution magic angle spinning ¹H-NMR spectroscopy studies on the renal biochemistry in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the effects of arsenic (As³⁺) toxicity. *Xenobiotica*, 31:377-385.

Grinnell, F.; Harp, D.G.; Minter, D. (1977) Cell adhesion and spreading factor. *Exp. Cell Res.*, 110:175-190.

Groffen, A.J.; Buskens, C.A.; Van Kuppevelt, T.H.; Veerkamp, J.H.; Monnens, L.A.; van den Heuvel, L.P. (1998a) Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *Eur. J. Biochem.*, 254:123-128.

Groffen, A.J.; Ruegg, M.A.; Kijkman, H.; Van de Velden, T.J.; Buskens, C.A.; van den Born, J.; Assmann, K.J.; Monnens, L.A.; Veerkamp, J.H.; Van den Heuvel, L.P. (1998b) Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J. Histochem. Cytochem.*, 46:19-27.

Gubler, M.C.; Antignac, C.; Deschenes, G.; Knebelmann, B.; Hors-Cayla, M.C.; Grunfeld, J-P.; Broyer, M.; Habib, R. (1993) Genetic, clinical, and morphologic heterogeneity in Alport's syndrome. *Adv. Nephrol.*, 22:15-35.

Gubler, M.C.; Knebelmann, B.; Beziau, A.; Broyer, M.; Pirson, Y.; Haddoum, F.; Kleppel, M.M.; Antignac, C. (1995) Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int.*, 47: 1142-1147.

Gunwar, S.; Ballester, F.; Kalluri, R.; Timoneda, J.; Chonko, A.M.; Edwards, S.J.; Noelken, M.E.; Hudson, B.G. (1991) Glomerular basement membrane. Identification of dimeric subunits of the noncollagenous domain (hexamer) of collagen IV and the Goodpasture antigen. *J. Biol. Chem.*, 266:15318-15324.

Gunwar, S.; Ballester, F.; Noelken, M.E.; Sado, Y.; Ninomiya, Y.; Hudson, B.G. (1998) Glomerular basement membrane: identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J. Biol. Chem.*, 273:8767-8775.

Gunwar, S.; Saus, J.; Noelken, M.E.; Hudson, B.G. (1990) Glomerular basement membrane. Identification of a fourth chain, alpha 4, of type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, 265:5466-5469.

Gunzler, W.A. Steffens, G.J.; Otting, F.; Kim, S.M.; Frankus, E.; Flohe, L. (1982) The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete aminoacid sequence of the A chain. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 363:1155-1165.

Guo, X.D.; Kramer, J.M. (1989) The two *Caenorhabditis elegans* basement membrane (type IV) collagen genes are located on separate chromosomes. *J. Biol. Chem.*, 264:17574-17582.

Gutman, A.; Kornblihtt, A.R. (1987) Identification of a third region of cell specific alternative splicing in human fibronectin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7179-7182.

Ha, T.S.; Barnes, J.L.; Stewart, J.L.; Ko, C.W.; Miner, J.H.; Abrahamson, D.R.; Sanes, J.R.; Kasinath, B.S. (1999) Regulation of renal laminin in mice with type II diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:1931-1939.

- Habib, R.; Gubler, M.C.; Hinglais, N.; Noel, L.H.; Droz, D.; Levy, M.; Mahieu, P.; Foidart, J.M.; Perrin, D.; Bois, E.; Grunfeld, J.P.** (1982) Alport's syndrome: Experience at Hospital Necker. *Kidney Int.*, 21:S20-S28
- Halfter, W.; Dong, S.; Schurer, B.; Cole, G.J.** (1998) Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, 273:25404-25412.
- Hall, D.E.; Reichardt, L.F.; Crowley, E.; Holley, B.; Moezzi, H.; Sonnenberg, A.; Damsky, C.H.** (1990) The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J. Cell Biol.*, 110:2175-2184.
- Haramoto, T.; Makino, H.; Ikeda, S.; Wieslander, J.; Ota, Z.** (1994) Ultrastructural localization of the three major basement membrane components -type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan and laminin- in human membranous glomerulonephritis. *Am. J. Nephrol.*, 14:30-36.
- Hart, G.W.** (1978) Biosynthesis in glycosaminoglycans by the separated tissues of the embryonic chick cornea. *Dev. Biol.*, 62:78-98.
- Harvey, S.J.; Zheng, K.; Sado, Y.; Naito, I.; Ninomiya, Y.; Jacobs, R.M.; Hudson, B.G.; Thorner, P.S.** (1998) Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int.*, 54:1857-1866.
- Hassell, J.R.; Pennypacker, J.P.; Kleinman, H.K.; Pratt, R.M.; Yamada, K.M.** (1979) Enhanced cellular fibronectin accumulation in chondrocytes treated with vitamin A. *Cell*, 17, 821-826.
- Hay, E.D.** (1981) Extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, 91:205-223.
- Hayashi, M.; Yamada, K.M.** (1981) Difference in domain structures between plasma and cellular fibronectins. *J. Biol. Chem.*, 256:11292-11300.
- Hayman, E.G.; Oldberg, A.; Martin, G.R.; Ruoslahti, E.** (1982) Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. *J. Cell Biol.*, 94:28-35.

- Hayman, E.G.; Ruoslahti, E.** (1979) Distribution of fetal bovine serum fibronectin and endogenous rat cell fibronectin in extracellular matrix. *J. Cell. Biol.*, 83:255-259.
- Heath-Eves, M.J.; Mcmillan, D.B.** (1974) The morphology of the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa* (L.). *Am. J. Anat.*, 139:309-334.
- Hendsch, Z.S.; Tidor, B.** (1994) Do salt bridges stabilise proteins? A continuum electrostatic analysis. *Protein Sci.*, 3:211-226.
- Hentschel, H.** (1977) The kidney of *Spinachia spinachia* (L.) Flem. (Gasterosteidae, Pisces). I. Investigations of juvenile sticklebaacks: anatomy, circulation and fine structure. *Z. mikrosk. anat. Forsch.*, 91:4-21.
- Hentschel, H.** (1987) Renal architecture of the dogfish *Scyliorhinus caniculus* (Chondrichthyes, Elasmobranchii). *Zoomorphology*, 107:115-125.
- Hentschel, H.** (1988) Renal blood vascular system in the elasmobranch, *Raja erinacea* Mitchill, in relation to kidney zones. *Am. J. Anat.*, 183:130-147.
- Hill, R.W.** (1980) *Fisiología animal comparada. Un enfoque ambiental*. Ed Reverté. Barcelona
- Hoar, R.M.** (1976) Comparative developmental aspects of selected organ systems. II. Gastrointestinal and urogenital systems. *Environmental Health Perspectives*. 18:61-66.
- Hoar, W.S.** (1978) *Fisiología general y comparada*. Ed. Omega. Barcelona.
- Hogg, N.M.** (1974) A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:489-492.
- Hohenester, E., Tisi, D.; Talts, J.F.; Timpl, R.** (1999) The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alphadystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol. Cell*, 4:783-792.
- Holmgren, N.** (1950) On the pronephros and blood in *Myxine glutinosa*. *Acta zool.*, Stockholm 31:233-248.
- Hopper, K.E.; Adelman, B.C.; Gentner, G.; Gay, S.** (1976) Recognition by guinea-pig peritoneal exudate cells of conformationally different states of the collagen molecule. *Immunology*, 30:249-259.

- Hostikka, S.L.; Eddy, R.L.; Byers, M.G.; Hoyhtya, M.; Shows, T.B.; Tryggvason, K.** (1990) Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:1606-1610.
- Hostikka, S.L.; Tryggvason, K.** (1988) The complete primary structure of the alpha 2 chain of human type IV collagen and comparison with the alpha 1(IV) chain. *J. Biol. Chem.*, 263:19488-19493.
- House, C.R.** (1963) Osmotic regulation in the brackish water teleost *Blennius pholis*. *J. Exp. Biol.*, 40:87-104.
- Howard, B.V.; Macarak, E.J.; Gunson, D.; Kefalides, N.A.** (1976). Characterization of the collagen synthesized by endothelial cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:2361-2364.
- Huber, A.H.; Wang, Y.E.; Bieber, A.J.; Bjorkman, P.J.** (1994) Crystal structure of tandem type III fibronectin domains from *Drosophila* neuroglian at 2.0 Å. *Neuron*, 12:717-731.
- Hudson, B.G.; Reeders, S.T.; Tryggvason, K.** (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. *J. Biol. Chem.*, 268:26033-26036.
- Humphries, M.J.** (1990) The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J. Cell Sci.*, 97:585-592.
- Hutter, H.; Vogel, B.E.; Plenefisch, J.D.; Norris, C.R.; Proenca, R.B.; Spieth, J.; Guo, C.; Mastwal, S.; Zhu, X.; Scheed, J.; Hedgecock, E.M.** (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science*, 287:989-994.
- Hynda, K.K.; Klebe, R.J.; Martin, G.R.** (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, 88:473-485.
- Hynes, R.O.** (1973) Alteration of cell- surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3170-3173.
- Hynes, R.O.** (1976) Cell surface proteins and malignant transformation. *Biochem. Biophys. Acta*, 458:73-107.

- Hynes, R.O.** (1985) Molecular Biology of fibronectin. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1:67-90.
- Hynes, R.O.** (1990) *Fibronectins*. Ed. Springer-Verlag. New York.
- Hynes, R.O.; Ali, I.M.; Destree, A.J.; Mautner, V.; Perkins, M.E.; Senger, D.R.; Wagner, D.D.; Simth, K.K.** (1978) A large glycoprotein lost from the surfaces of transformed cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 312:317-342.
- Hynes, R.O.; Yamada, K.M.** (1982) Fibronectin: multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.*, 95:369-372.
- Iivanainen, A.; Korttesmaa, J.; Sahlberg, C.; Morita, T.; Bermann, U.; Thesleff, I.; Tryggvason, K.** (1997) Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha 4 chain. *J. Biol. Chem.*, 272:27862-27868.
- Iivanainen, A.; Sainio, K.; Sariola, H.; Tryggvason, K.** (1995) Primary structure and expression of a novel human laminin alpha 4 chain. *FEBS Lett.*, 365:183-188.
- Ingham, K.C.; Brew, S.A.; Migliorini, M.M.; Busby, T.F.** (1993) Binding of heparin by type III domains and peptides from the carboxy terminal Hep-2 region of fibronectin. *Biochemistry*, 32:12548-12553.
- Ishimura, E.; Sterzel, R.B.; Budde, K.; Kashgarin, M.** (1989) Formation of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Am. J. Pathol.*, 134:843-855.
- Jaffe, E.A.; Mosher, D.F.** (1978) Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *J. Exp. Med.*, 147:1779-1791.
- Janvier, P.** (1981) The phylogeny of the Craniata with particular reference to the significance of the fossil "agnathans". *J. Vertebr. Paleont.*, 1:121-159.
- Johansson, S.; Rubin, K.; Hook, M.; Ahlgren, T.; Seljelin, R.** (1979) In vitro biosynthesis of cold-insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.*, 105:313-316.
- Jorgensen, F.** (1966) *The ultrastructure of the Normal Human Glomerulus*. Ed. Munksgaard, Copenhagen.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J.** (1973) *Histologia Básica*. Ed. Salvat, Barcelona.

Kalluri, R.; Shield, C.F.; Todd, P.; Hudson, B.G.; Neilson, E.G. (1997) Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J. Clin. Invest.*, 99:2470-2478.

Kanwar, Y.S. ; Farquhar, M.G. (1980) Detachment of endothelium and epithelium from the glomerular basement membrane produced by kidney perfusion with neuraminidase. *Laboratory Investigation*. 42:375-84

Kanwar, Y.S.; Liu, Z.Z.; Kashihara, N.; Wallner, E.I. (1991) Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin. Nephrol.*, 11: 390-413.

Kar, L.; Lai, C-S.; Wolff, C.E.; Nettesheim, D.; Sherman, S.; Johnson, M.E. (1993) ¹H-NMR-Based determination of the three-dimensional structure of the human plasma fibronectin fragment containing inter-chain disulphide bonds. *J. Biol. Chem.*, 268:8580-8589.

Karnovsky, M.J. (1979) The structural bases for glomerular filtration. En *Kidney disease -present status*, Chung; Spargo; Mostofi y Abell, Ed. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1-41.

Kashtan, C.E.; Kim, Y. (1992) Distribution of the 1 and 2 chains of collagen IV and of collagens V and VI in Alport syndrome. *Kidney Int.*, 42:115-126.

Kashtan, C.E.; Kim, Y.; Lees, G. E.; Thorner, P.S.; Virtanen, I.; Miner, J. H. (2001) Abnormal Glomerular Basement Membrane Laminins in Murine, Canine, and Human Alport Syndrome: Aberrant Laminin 2 Deposition Is Species Independent. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 252-260.

Kashtan, C.E.; Michael, A.F. (1993) Alport syndrome: from bedside to genome to bedside. *Am. J. Kidney Dis.*, 22:627-640.

Keys, A. B. (1933) The mechanism of adaptation to varying salinity in the common eel and the general problem of osmotic regulation in fishes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 112:184-199.

- Killen, P.D.; Striker, G.E.** (1979) Human glomerular epithelial cells synthesize a basal lamina collagen in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3518-3522.
- Kim, Y.; Butkowski, R.; Burke, B. Kleppel, M.M.; Crosson, J.; Katz, A.; Michael, A.F.** (1991) Differential expression of basement membrane collagen in membranous nephropathy. *Am. J. Pathol.*, 139:1381-1388.
- Kimura, N.; Toyoshima, T.; Kojima, T.; Shimane, M.** (1998) Entactin-2 a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp. Cell Res.*, 241:36-45.
- Klebe, R.J.** (1974) Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature*, 250:248-251.
- Klein, D.J.; Brown, D.M.; Oegema, T.R.; Brenchely, P.E.; Anderson, J.C.; Dickinson, M.A.J.; Horigan, E.A.; Hassell, J.R.** (1988) Glomerular basement membrane proteoglycans are derived from a large precursor. *J. Cell Biol.*, 106:963-970.
- Kleinman, H.K.; Cannon, F.B.; Laurie, G.W.; Hassell, J.R.; Aumailley, M.; Terranova, V.P.; Martin, G.R.; Dubois-Dalcq, M.** (1985) Biological activities of laminin. *J. Cell Biol.*, 27:317-325.
- Kleinman, H.K.; Klebe, R.J.; Martin, G.R.** (1981): Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, 88, 473-485.
- Kleinman, H.K.; Mcgarvey, M.L.; Hassell, J.R.; Martin, G.R.; Van Evercooren, A.B.; Dubois-Dalcq, M.** (1984) The role of laminin in basement membranes and in the growth adhesion, and differentiation of cells. *The role of extracellular matrix in development*. Trelstad, R.; Ed. Alan R. Liss, Inc. New York, pp.123-143.
- Kleinman, H.K.; Weeks, B.S.** (1989) Laminin: structure, functions and receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1:964-967.
- Knecht, R.; Leber, R.; Hassalcher, C.** (1987) Degradation of glomerular basement membrane in diabetes. *Res. Exp. Med.*, 187:323-328.
- Koch, M.; Olson, P.F.; Albus, A.; Jin, W.; Hunter, D.D.; Brunken, W.J.; Burgeson, R.E.; Champlaud, M.F.** (1999) Characterization and expression of the

laminin gamma 3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J. Cell Biol.*, 145:605-618.

Kohfeldt, E.; Sasaki, T.; Gohring, W.; Timpl, R. (1998) Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J. Mol. Biol.* 282:99-109.

Komoriya, A.; Green, L.J.; Mervic, M.; Yamada, S.; Yamada, K.; Humphries, M.J. (1991) The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.*, 266:15075-15079.

Kootstra, C.J.; Bergijk, E.C.; Veningaa, A.; Prins, F.A.; de Heer, E.; Abrahamson, D.R.; Bruijn, J.A. (1995) Qualitative alterations in laminin expression in experimental lupus nephritis. *Am. J. Pathol.*, 147: 476-488.

Kornblihtt, A.R.; Umezawa, K.; Vibe-Pedersen, K.; Baralle, F.E. (1985) Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.*, 4:1755-1759.

Kornblihtt, A.R.; Vibe-Pedersen, K.; Baralle, F.E. (1983) Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3218-3222.

Kramer, R.H.; Vu, M.P.; Cheng, Y.F.; Ramos, D.M.; Timpl, R.; Waleh, N. (1991) Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regul.*, 2:805-817.

Kriz, W.; Kaisslin, B. (1985) Structural organization of the mammalian kidney. *The kidney: physiology and pathophysiology*. Seldin y Giebisch, Ed. Raven Press, New York, pp. 265-306.

Krug, E.L.; Mjaatvedt, C.H.; Markwald, R.R. (1987) Extracellular matrix from embryonic myocardium elicits an early morphogenetic event in cardiac endothelial differentiation. *Dev. Biol.*, 120:348-355.

- Kühn, K.; Stolte, H.; Reale, E.** (1975) The fine structure of the kidney of the hagfish (*Myxine glutinosa* L.): a thin section and freeze-fracture study. *Cell Tissue Res.*, 164:201-213.
- Kunkel, P.A. jr.** (1930) Number and size of glomeruli in kidney of several mammals. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 47: 285-291.
- Kurachi, K.; Davie, E.W.** (1982) Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6461-6464.
- Kurkinen, M; Alitalo, K.** (1979) Fibronectin and procollagen produced by a clonal line of Schwann cells. *FEBS Lett.*, 102:64-68.
- Kurtz, S.M.; Feldman, J.D.** (1962) Experimental studies on the formation of the glomerular basement membrane. *J. Ultrastruct. Res.*, 6:19-27.
- Kuusela, P.E.; Ruoslahti, E.; Engvall, E.; Vaheri, A.** (1976) Immunological interspecies cross-reactions of fibroblast surface antigen (fibronectin). *Immunochemistry*, 13:639-642.
- Lacy, E.R.; Castelucci, M.; Reale, E.** (1987) The elasmobranch renal corpuscle: fine structure of Bowman's capsule and the glomerular capillary wall. *Anat. Rec.*, 218:294-305.
- Laitinen, L.; Vartio, T.; Virtanen, I.** (1991) Cellular fibronectins are differentially expressed in human fetal and adult kidney. *Lav. Invest.*, 64:492-498.
- Langeveld, J.P.M.; Noelken, M.E.; Hard, K.; Todd, P.; Vliegthart, J.F.; Rouse, J.; Hudson, B.G.** (1991) Bovine glomerular basement membrane. Location and structure of the asparagine-linked oligosaccharide units and their potential role in the assembly of the 7 S collagen IV tetramer. *J. Biol. Chem.*, 266:2622-2631.
- Languino, L.R.; Gehlsen, K.R.; Wayner, E.; Carter, W.G.; Engvall, E.; Ruoslahti, E.** (1989) Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J. Cell Biol.*, 109:2455-2462.
- Latimer, H.B.; Sawin, P.B.** (1961) Morphogenetic studies of the rabbit. XXX. Measurements of the digestive tube and of its parts in race III rabbits. *Anat. Rec.* 141: 267-274.

- Laurie, G.W.; Leblond, C.P.; Martin, G.R.** (1982) Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J. Cell Biol.*, 95:340-344.
- Lawler, J.; Hynes, R.O.** (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell Biol.*, 103:1635-1648.
- Leahy, D.J.; Hendrickson, W.A.; Aukhil, I., Ericksson, H.P.** (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*, 258:987-991.
- Lee, E.C.; Lotz, M.M.; Steele, G.D.J.; Mercurio, A.M.** (1992) The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J. Cell Biol.*, 117:671-678.
- Lee, L.K.; Pollock, A.S.; Lovett, D.H.** (1993) Asymmetric origins of the mature glomerular basement membrane. *J. Cell Physiol.*, 157:169-177.
- Lees, G.; Helman, R.G.; Kashtan, C.E.; Michael, A.F.; Homco, L.D.; Millichamp, N.J.; Ninomiya, Y.; Sado, Y.; Kim, Y.** (1998) A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney Int.*, 54:706-719.
- Lefebvre, O.; Sorokin, L.; Keding, M.; Simon-Assmann, P.** (1999) Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha 2, alpha 4 and alpha 5 chains in the intestine. *Dev. Biol.*, 210:135-150.
- Leivo, I.; Laurila, P.; Wahlstrom, T.; Engvall, E.** (1989) Expression of merosin, a tissue-specific basement membrane protein, in the intermediate trophoblast cells of choriocarcinoma and placenta. *Lab Invest.*, 60:783-790.
- Lelongt, B.; Makino, H.; Kanwar, Y.S.** (1987) Maturation of developing renal glomerulus with respect to basement membrane proteoglycans. *Kidney Int.*, 32:498-506.
- Lindblom, A.; Marsh, T.; Fauser, C.; Engel, J.; Paulsson, M.** (1994) Characterization of native laminin from bovine kidney and comparison with other laminin variants. *Eur. J. Biochem.*, 219:383-392.

- Litvinovich, S.V.; Strickland, D.K.; Medved, L.V.; Ingham, K.C.** (1991) Domain structure and interactions of the type I and type II modules in the gelatin-binding region of fibronectin. *J. Mol. Biol.*, 217:563-575.
- Liu, J.; Mayne, R.** (1996) The complete cDNA coding sequence and tissue specific expression of the mouse laminin alpha 4 chain. *Matrix Biol.*, 15:433-437.
- Lohi, J.; Leivo, I.; Franssila, K.; Virtanen, I.** (1997) Changes in the distribution of integrins and their basement membrane ligands during development of human thyroid follicular epithelium. *Histochem. J.*, 29:337-345.
- Lu, W.; Phillips, C.L.; Killen, P.D.; Hlaing, T.; Harrison, W.R.; Elder, F.F.; Miner, J.H.; Overbeek, P.A.; Meisler, M.H.** (1999) Insertional mutation of the collagen genes Col4a3 and Col4a4 in a mouse model of Alport syndrome. *Genomics*, 61:113-124.
- Lubec, G.; Pollak, A.** (1980) Reduced susceptibility of nonenzymatically glycosylated glomerular basement membranes to proteases. *Ren. Physiol.*, 3:4-8.
- Lutz, P.L., Robertson, J.D.** (1971) Osmotic constituents of the coelacanth *Latimeria chalumnae* Smith. *Biol. Bull.*, 141:553-560.
- Lloyd, K.O.; Travassos, L.R.; Takahashi, T.; Old, L.J.** (1979) Cell surface glycoproteins of human tumor cell lines: Unusual characteristics of malignant melanome. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63:623-633.
- Macarak, E.J.; Kirby, E.; Kirk, T.; Kefalides, N.A.** (1978) Synthesis of cold-insoluble globulin by cultured calf endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2621-2625.
- Macmillen, R.E.; Lee, A.K.** (1967) Australian desert mice: Independence of exogenous water. *Science*, 158:383-385.
- Madri, J.A.; Roll, F.J.; Furthmayr, H.; Foidart, J.M.** (1980) Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of the murine kidney. *J. Cell Biol.*, 86:682-687.
- Maetz, J.; Campanini, G.** (1966) Potentiels transépithéliaux de la branchie d'anguille *in vivo* en eau douce et eau de mer. *J. Physiol.*, 58:248.

- Main, A.L.; Harvey, T.S.; Baron, M.; Boyd, J.; Campbell, I.D.** (1992) The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell*, 71:1-20.
- Mann, K.; Deutzmann, R.; Timpl, R.** (1988) Characterization of proteolytic fragments of the laminin-nidogen complex and their activity in ligand-binding assays. *Eur. J. Biochem.*, 178:71-80.
- Mardon, H.J.; Grant, K.E.** (1994) The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett.*, 340:197-201.
- Marinkovich, M.P.; Lunstrum, G.P.; Burgeson, R.E.** (1992) The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J. Biol. Chem.*, 267:17900-17906.
- Marinkovich, M.P.; Lunstrum, G.P.; Keene, D.R.; Burgeson, R.E.** (1992) The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J. Cell Biol.*, 119:695-703.
- Mariyama, M.; Kalluri, R.; Hudson, B.G.; Reeders, S.T.** (1992) The alpha 4 (IV) chain of basement membrane collagen. Isolation of cDNAs encoding bovine alpha 4 (IV) and comparison with other type IV collagens. *J. Biol. Chem.*, 267:1253-1258.
- Martin, D.; Zusman, S.; Li, X.; Williams, E.L.; Khare, N.; DaRocha, S.; Chiquet-Ehrismann, R.; Baumgartner, S.** (1999) Wing blister, a new *Drosophila* laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J. Cell Biol.*, 145:191-201.
- Martin, G.R.; Timpl, R.** (1987) Laminin and other basement membrane components. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 3:57-85.
- Martin, G.R.; Timpl, R.; Kühn, K.** (1988) Basement membrane proteins: molecular structure and function. *Advances in Protein Chemistry*, 39:1-50.
- Martínez-Hernández, A.; Marsh, C.A.; Clark, C.C.; Macarak, E.J.; Brownell, A.G.** (1981) Fibronectin: its relationship to basement membrane. II. Ultrastructural studies in rat kidney. *Coll. Res.*, 5:415-418.

- Mayer, N.** (1969) Adaptation de *Rana esculenta* à des milieux varies. Étude spéciale de l'excrétion rénale de l'eau et des électrolytes au cours des changements de milieu. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29:27-50.
- Mbassa, G.; Elger, M.; Kriz, W.** (1988) The ultrastructural organization of the basement membrane of Bowman's capsule in the rat renal corpuscle. *Cell Tissue Res.*, 253:151-163.
- McCarthy, K.J.** (1997) Morphogenesis of the glomerular filter: the synchronous assembly and maturation of two distinct extracellular matrices. *Microsc. Res. Tech.*, 39:233-253.
- McCarthy, K.J.; Bynum, K.; St. John, P.L.; Abrahamson, D.R.; Couchman, J.R.** (1993) Basement membrane proteoglycans in glomerular morphogenesis: Chondroitin sulfate proteoglycan is temporally and spatially restricted during development. *J. Histochem. Cytochem.*, 41:401-414.
- McCarthy, K.J.; Couchman, J.R.** (1990) Basement membrane chondroitin sulfate proteoglycans: Localization in adult rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 38:1479-1486.
- McCarthy, R.A.; Beck, K.; Burger, M.M.** (1987) Laminin is structurally conserved in the sea urchin basal lamina. *EMBO J.*, 6:1587-1593.
- McDonald, J.A.** (1988) Extracellular matrix assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4:183-207.
- McLachlan, A.D.; Karn, J.** (1983) Periodic features in the amino acid sequence of nematode myosin rod. *J. Mol. Biol.*, 164:605-626.
- McMahan, U.J.** (1990) The agrin hypothesis. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.*, 50:407-418.
- McMahan, U.J.** (1992) The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron*, 8:691-699.
- Mercier, P.; Ekindjian, O.G.** (1990) Collagen Type IV: major component of basement membranes. Current knowledge. *Ann. Biol. Clin.*, 48:695-711.

Miner, J.H. (1998) Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 7:13-9.

Miner, J.H. (1999) Renal basement membrane components. *Kidney Int.*, 56:2016-2024.

Miner, J.H.; Lewis, R.M.; Sanes, J.R. (1995) Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J. Biol. Chem.*, 270:28523–28526.

Miner, J.H.; Patton, B.L.; Lentz, S.I.; Gilbert, D.J.; Snider, W.D.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G.; Sanes, J.R. (1997) The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha 3 isoform. *J. Cell Biol.*, 137:685-701.

Miner, J.H.; Sanes, J.R. (1994) Collagen IV a3, a4, and a5 chains in rodent basal laminae: Sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol.*, 127:879-891.

Miner, J.H.; Sanes, J.R. (1996) Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen 3 (IV): implications for Alport syndrome. *J. Cell Biol.*, 135:1403-1413.

Milton, A.; Johnson, M. (1999) Biomonitoring of contaminated mine tailings through age accumulation of trace metals in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J. Environ. Monit.*, 1:219-225.

Miosge, N. (2001) The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol. Histopathol.*, 16:1239-1248.

Mohri H.; Katoh K.; Iwamatsu A.; Okubo T. (1996) The novel recognition site in the C-terminal heparin binding domain of fibronectin by integrin a4 b1 receptor on HL-60 cells. *Exp. Cell Res.*, 222:326-332.

molecules of basement membranes. *J. Invest. Dermatol.* 106:209-214.

Montais, R.; Maetz, J. (1965) Comparaison des échanges de sodium chez un téléostéen euryhalin (le flet) et un téléostéen sténohalin (le serran) en eau de mer.

Importance relative du tube digestif et de la branchie dans ces échanges. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 261:532-535.

Morrison, K.E.; Germino, G.G.; Reeders, S.T. (1991) Use of the polymerase chain reaction to clone and sequence a cDNA encoding the bovine alpha 3 chain of type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, 266:34-39.

Morrison, P.R.; Edsall, J.T.; Miller, S.G. (1948) Preparation and properties of serum and plasma proteins XIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, 70:3103-3108.

Mosesson, M.W.; Umfleet, R.A. (1970) The cold insoluble globulin of human plasma. I. Purification primary characterization and relationship to fibrinogen and other cold insoluble fraction components. *J. Biol. Chem.*, 245:5728-5736.

Mosher, D.F. (1993) Assembly of fibronectin into extracellular matrix. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:214-222.

Mosher, D.F.; Mckeown-Longo, P.J. (1985) Assembly of fibronectin-containing extracellular matrix: a glimpse of the machinery. *Biopolymers*, 24:199-210.

Mosher, D.F.; Sottile, J.; Wu, C.; McDonald, J.A. (1992) Assembly of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4:810-818.

Mounier, F.; Foidart, J.M.; Gubler, M.C.; Beziau, A.; Lacoste, M. (1986) Distribution of extracellular matrix glycoproteins during normal development of human kidney. *Lab. Invest.*, 54:394-401.

Moyano J.V.; Carnemolla B.; Dominguez-Jimenez C.; Garcia-Gila M.; Albar J.P.; Sanchez-Aparicio P.; Leprini A.; Querze G.; Zardi L.; Garcia-Pardo A. (1997) Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 7$ integrins. *J. Biol. Chem.*, 272:24832-24836.

Muda, A.O.; Rahimi, S.; Renieri, A.; Rizzoni, G.; Massella, L.; Faraggiana, T. (1997) Ultrastructural immunocytochemistry of collagenous and non-collagenous proteins in fast-frozen, freeze-substituted, and low-temperature-embedded renal tissue in Alport syndrome. *J. Pathol.*, 182:465-474.

- Muragaki, Y.; Timmons, S.; Griffith, C.M.; Oh, S.P.; Fadel, B.; Quertermous, T.; Olsen, B.R.** (1995) Mouse Col18a1 is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8763-8767.
- Nash, J.** (1931) The number and size of glomeruli in the kidney of fishes with observations on the morphology of the renal tubules of fishes. *Am. J. Anat.*, 47:425-445.
- Nayak, B.R.; Spiro, R.G.** (1991) Localization and structure of the asparagine-linked oligosaccharides of type IV collagen from glomerular basement membrane and lens capsule. *J. Biol. Chem.*, 266:13978-13987.
- Nicosia, R.F.; Bonanno, E.; Smith, M.; Yurchenco, P.** (1994) Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex. *Dev. Biol.*, 164:197-206.
- Nitkin, R.M.; Smith, M.A.; Magill, C.; Fallon, J.R.; Yao, Y-MM.; Wallace, B.G.; McMahan, U.J.** (1987) Identification of agrin, a synaptic organizing protein from *Torpedo* electric organ. *J. Cell Biol.*, 105:2471-2478.
- Noakes, P.G.; Miner, J.H.; Gautam, M.; Cunningham, J.M.; Sanes, J.R.; Merlie, J.P.** (1995) The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta1. *Nature Genet.*, 10: 400-406.
- Novokhatny, V.; Schwarz, F.; Atha, D.; Ingham, K.** (1992) Domain structure and domain-domain interactions in the carboxy-terminal heparin binding region of fibronectin. *J. Mol. Biol.*, 227:1182-1191.
- Obara M.; Kang M.S.; Yamada K.M.** (1988) Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell*, 53:649-657.
- Oh, E.; Pierschbacher, M.; Ruoslahti, E.** (1981) Deposition of plasma fibronectin a tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3218-3221.
- Oh, S.P.; Kamagata, Y.; Muragaki, Y.; Timmons, S.; Ooshima, A.; Olsen, B.R.** (1994) Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of

Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4229-4233.

Oh, S.P.; Warman, M.L.; Seldin, M.F.; Cheng, S.D.; Knoll, J.H.; Timmons, S.; Olsen, B.R. (1994) Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1 (XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21. *Genomics*, 19:494-499.

Olsen, B. (1999) Life without perlecan has its problems. *J. Cell Biol.*, 147:909-911.

Ooi, E.C.; Youson, J.H. (1977) Morphogenesis and growth of the definitive opisthonephros during metamorphosis of andromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 42:219-235.

Osathanondh, V.; Potter, E.L. (1966) Development of the kidney as shown by microdissection. V. Development of the vascular pattern of the glomerulus. *Arch. Pathol.*, 82:403-411.

Osawa, T. (1986) The localization of laminin, fibronectin and lectin-binding sites on the epidermal basal lamina. *J. Electron Microsc.*, 35:259-271.

Ott, U.; Odermatt, E.; Engel, J.; Furthmayr, H.; Timpl, R. (1982) Protease resistance and conformation of laminin. *Eur. J. Biochem.*, 123:63-72.

Ouaissi, M.A.; Capron, A. (1985) Fibronectins: structure and functions. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 136 C:169-185.

Owens, R.J.; Baralle, F.E. (1986) Mapping the collagen-binding site of human fibronectin by expression in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 5:2825-2830.

Pang, P.K.T.; Griffith, R.W.; Kahn, N. (1972) Electrolyte regulation in the fresh water stingrays (Potamotrygonidae). *Fed. Proc.*, 31:334.

Parry, G.; Cullen, B.; Kaetzel, C.S.; Kramer, R.; Moss, L. (1987) Regulation of differentiation and polarized secretion in mammary epithelial cells maintained in culture: extracellular matrix and membrane polarity influences. *J. Cell Biol.*, 105:2043-2051.

Patthy, L. (1991) Modular exchange principles in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1:351-361.

Paulsson, M. (1988) The role of Ca²⁺ binding in the self-aggregation of laminin-nidogen complexes. *J. Biol. Chem.*, 263:5425-5430.

Paulsson, M. (1992) Basement membrane proteins: Structure, assembly, and cellular interactions. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, 27:93-127.

Paulsson, M.; Aumailley, M.; Deutzmann, R.; Timpl, R.; Beck, K.; Engel, J. (1987) Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.*, 166:11-19.

Paulsson, M.; Deutzmann, R.; Dziadek, M.; Nowack, H.; Timpl, R.; Weber, S.; Engel, J. (1986) Purification and structural characterization of intact and fragmented nidogen obtained from a tumor basement membrane. *Eur. J. Biochem.*, 156:467-478.

Paulsson, M.; Deutzmann, R.; Timpl, R.; Dalzoppo, D.; Odermatt, E.; Engel, J. (1985) Evidence for coiled-coil alpha-helical regions in the long arm of laminin. *EMBO J.*, 4:309-316.

Paulsson, M.; Saladin, K. (1989) Mouse heart laminin. Purification of the native protein and structural comparison with Engelbreth-Holm-Swarm tumor laminin. *J. Biol. Chem.*, 264:18726-18732.

Pearlstein, E.; Waterfield, M.D. (1974) Metabolic studies on ¹²⁵I-labeled baby hamster kidney cell plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 362:1-12.

Peek, W.D.; Mcmillan, D.B. (1979) Ultrastructure of the renal corpuscle of the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Am. J. Anat.*, 155:83-102.

Pennica, D.; Holmes, W.E.; Kohr, W.J.; Harkins, R.N.; Vehar, G.A.; Ward, C.A.; Bennett, W.F.; Yelverton, E.; Seeburg, P.H.; Heyneker, H.L.; Goeddel, D.V.; Collen, D. (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, 301(5897):214-221.

Perreault, N.; Herring-Gillam, E.; Desloges, N.; Bélanger, I.; Pageot, L.P.; Beaulieu, J.F. (1998) Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248:121-126.

Petersen, T.E.; Skorstengaard, K.; Vibe-Pedersen, K. (1989) Primary structure of fibronectin. *Fibronectin*. Mosher, D.F. Ed. Academic Press Inc. San Diego, pp.1-24.

- Philajaniemi, T.** (1996) Molecular properties of the glomerular basement membrane. *Contrib. Nephrol.*, 117: 46-79.
- Pihlajaniemi, T.; Pohjolainen, E.R.; Myers, J.C.** (1990) Complete primary structure of the triple-helical region and the carboxyl-terminal domain of a new type IV collagen chain, alpha 5 (IV). *J. Biol. Chem.*, 265:13758-13766.
- Pirlot, P.** (1976) *Morfologia evolutiva de los cordados*. Ed. Omega, Barcelona.
- Plow, E.F.; Birdwell, C.R.; Ginsberg, M.H.** (1979) Identification and quantitation of platelet-associated fibronectin antigen. *J. Clin. Invest.*, 63:540-543.
- Poschl, E.; Fox, J.W.; Block, D.; Mayer, U.; Timpl, R.** (1994) Two non-contiguous regions contribute to nidogen binding to a single EGF-like motif of the laminin gamma 1 chain. *EMBO J.*, 13:3741-3747.
- Potts J.R., Campbell I.D.** (1996) Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biology*, 15:313-320.
- Potts, J.R.; Campbell, I.D.** (1994) Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:648-655.
- Potts, W.T.W.; Evans, D.H.** (1967) Sodium and chloride balance in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.*, 133:411-425.
- Proud, C.G.; Denton, R.M.** (1997) Molecular mechanisms for control of translation by insulin. *Biochem. J.*, 328:329-341.
- Quade, B.J.; McDonald, J.A.** (1988) Fibronectin's amino terminal matrix assembly site is located within the 29-kD amino-terminal domain containing five type 1 repeats. *J. Biol. Chem.*, 263:19602-19609.
- Quaroni, A.; Isselbacher, K.J.; Ruoslahti, E.** (1978) Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:5548-5552.
- Quinones, S.; Bernal, D.; Garcia-Sogo, M.; Elena, S.F.; Saus, J.** (1992) Exon/intron structure of the human alpha 3 (IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha 3 (IV) NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction. *J. Biol. Chem.*, 267:19780-19784.

Raats, C.J.I.; Bakker, M.A.H.; Hoch, W.; Tamboer, W.P.M.; Groffen, A.J.A.; van den Heuvel, L.P.W.J.; Berden, J.H.M.; van den Born, J. (1998) Differential expression of agrin in renal basement membranes as revealed by domain-specific antibodies. *J. Biol. Chem.*, 273:17832-17838.

Rambourg, A.; Leblond, C.P. (1967) Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. Cell Biol.*, 32:27-53.

Reeves, W.; Caulfield, J.P.; Farquhar, M.G. (1978) Differentiation of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab. Invest.*, 39:90-100.

Reeves, W.H.; Kanwar, Y.S.; Farquhar, M.G. (1980) Assembly of the glomerular filtration surface. Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat kidney. *J. Cell Biol.*, 85:735-753.

Rehn, M.; Hintikka, E.; Pihlajaniemi, T. (1994) Primary structure of the 1 chain of mouse type XVIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the 1 (XVIII) chain with its homologue, the 1 (XV) collagen chain. *J. Biol. Chem.*, 269:13929-13935.

Rehn, M.; Hintikka, E.; Pihlajaniemi, T. (1996) Characterization of the mouse gene for the $\alpha 1$ chain of type XVIII collagen (Col18a1) reveals that the three variant N-terminal polypeptide forms are transcribed from two widely separated promoters. *Genomics*, 32:436-446.

Rehn, M.; Pihlajaniemi, T. (1994) Alpha1 (XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4234-4238.

Rehn, M.; Pihlajaniemi, T. (1995) Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *J. Biol. Chem.*, 270:4705-4711.

Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212.

Richards, A.J.; al Imara, L.; Carter, N.P.; Lloyd, J.C.; Leversha, M.A.; Pope, F.M. (1994) Localization of the gene (LAMA4) to chromosome 6q21 and isolation of a partial cDNA encoding a variant laminin A chain. *Genomics*, 22:237-239.

Robbins, P.W.; Wickus, G.G.; Branton, P.E.; Gaffrey, B.J.; Hirschberg, C.B.; Fuchs, P.; Blumberg, P.M. (1974) The chick fibroblast cell surface following transformation by Rous sarcoma virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 1173-1180.

Roberts, D.D. (1986) Sulfatide-binding proteins. *Chem. Phys. Lipids*, 42:173-183.

Roberts, D.D.; Wewer, U.M.; Liotta, L.A.; Ginsburg, V. (1988) Laminin-dependent and laminin-independent adhesion of human melanoma cells to sulfatides. *Cancer Res.*, 48:3367-3373.

Robertson, J.D. (1954) The chemical composition of the blood of some aquatic chordates, including members of the Tunicata, Cyclostomata and Osteichthyes. *J. Exp. Biol.*, 31:424-442.

Robertson, J.D. (1974) Osmotic and ionic regulation in cyclostomes. *Florking, Scheer Chemical zoology*,. Academic Press, New York, vol. 8 pp. 149-193

Rodewald, R.; Karnovsky, M.J. (1974) Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.*, 60:423-433.

Rohrbach, D.H.; Timpl, R. (1993). Molecular and cellular aspects of basement membranes. *Cell Biology: A Series of Monographs*. Ed. Academic Press, San Diego.

Romen, W.; Schulze, B.; Hempel, K. (1976) Synthesis of the glomerular basement membrane in the rat kidney: Autoradiographic studies with the light and electron microscope. *Virchows Arch.*, 20:125-137.

Rosenzweig, L.J.; Kanwar, Y.S. (1982) Removal of sulfated (heparan sulfate) or unsulfated (hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to ¹²⁵I-bovine serum albumin. *Lab. Invest.* 47:177-184.

- Rousselle, P.; Lunstrum, G.P.; Keene, D.R.; Burgeson, R.E.** (1991) Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell. Biol.*, 114:567-576.
- Ruegg, M.A.; Tsim, K.W.; Horton, S.E.; Kroger, S.; Escher, G.; Gensch, E.M.; Ruibal, R.** (1962) The adaptative value of bladder water in the toad, *Bufo cognatus*. *Physiol. Zool.*, 35:218-223.
- Ruegg, M.A.; Tsim, K.W.; Horton, S.E.; Kroger, S.; Escher, G.; Gensch, E.M.; McMahan, U.J.** (1992) The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron*, 8:691-699.
- Ruoslahti, E.; Engvall, E.; Hayman, E.G.** (1981a) Fibronectin: current concepts of its structure and functions. *Collagen & Related Res.*, 1:95-128.
- Ruoslahti, E.; Engvall, E.; Hayman, E.G.; Spiro, R.G.** (1981b) Comparative studies on amniotic fluid and plasma fibronectins. *Biochem. J.*, 193:295-299.
- Ruoslahti, E.; Hayman, E.G.; Pierschbacher, D.** (1985) Extracellular matrices and cell adhesion. *Arteriosclerosis*, 5:581-594.
- Ruoslahti, E.; Vaheri, A.** (1974) Novel human serum protein from fibroblast plasma membranes. *Nature*, 248:789-791.
- Ruoslahti, E.; Vaheri, A.** (1975) Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibronectin and fibrin. Identity with cold-insoluble globulin of human plasma. *J. Exp. Med.*, 141:497-501.
- Ruoslahti, E.; Vaheri, A.; Kuusela, P.; Linder, E.** (1973) Fibroblast surface antigen: a new serum protein. *Biochim. Biophys. Acta.*, 322:352-358.
- Saarela, J.; Ylikarppa, R.; Rehn, M.; Purmonen, S.; Pihlajaniemi, T.** (1998) Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *Matrix Biol.*, 16:319-328.
- Sage, H.; Crouch, E.; Bornstein, P.** (1979) Collagen synthesis by bovine aortic endothelial cells in culture. *Biochemistry*, 18: 5433-5442.

- Sakai, T.; Billo, R.; Kriz, W.** (1988) The structural organization of the kidney of *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibia, Gymnophiona). *Anat. Embryol.*, 174:243-252.
- Sakai, T.; Billo, R.; Nobile, R.; Gargas, K.; Kriz, W.** (1988) Ultrastructure of the kidney of a South American caecilian, *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibia, Gymnophiona). I. Renal corpuscle, neck segment, proximal tubule and intermediate segment. *Cell Tissue Res.*, 252:589-600.
- Sanes, J.R.; Engvall, E.; Butkowski, R.; Hunter, D.D.** (1990) Molecular heterogeneity of basal laminae: Isoforms of laminin and type IV collagen at the neuromuscular junction and elsewhere. *J. Cell Biol.*, 111:1685-1699.
- Sarich, V.M.; Wilson, A.C.** (1967) Immunological time scale for hominid evolution. *Science*, 158:1200-1203.
- Sariola, H.; Timpl, R.; von der Mark, K.; Mayne, R.; Fitch, J.; Linsenmayer, T.; Ekblom, P.** (1984) Dual origin of glomerular basement membrane. *Dev. Biol.*, 101:86-96.
- Sasaki, M.; Kato, S.; Kohno, K.; Martin, G.R.; Yamada, Y.** (1987) Sequence of the cDNA encoding the laminin B1 chain reveals a multidomain protein containing cysteine-rich repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:935-939.
- Sasaki, M.; Kleinman, H.K.; Huber, H.; Deutzmann, R.; Yamada, Y.** (1988) Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.*, 263:16536-16544.
- Sasaki, M.; Yamada, Y.** (1987) The laminin B2 chain has a multidomain structure homologous to the B1 chain. *J. Biol. Chem.* 262:17111-17117.
- Satoi S.; Kitade H.; Hiramatsu Y.; Kwon A.H.; Takahashi H.; Sekiguchi K.; Uehara M.; Oda M.; Yanagimoto Y.; Miyashita K.; Sakashita E.; Kamiyama Y.** (2000) Increased extra domain-A containing fibronectin and hepatic dysfunction during septic response: an in vivo and in vitro study. *Shock*, 13:492-496.

- Saus, J.; Quinones, S.; MacKrell, A.; Blumberg, B.; Muthukumaran, G.; Pihlajaniemi, T.; Kurkinen M.** (1989) The complete primary structure of mouse alpha 2 (IV) collagen. Alignment with mouse alpha 1 (IV) collagen. *J. Biol. Chem.*, 264:6318-6324.
- Sayama, K.; Hashimoto, H.; Sasaki, A.; Oikawa, T.; Tanaka, S.; Matsuzawa, A.** (1991) Phylogenetic relationships among laboratory animals deduced from basement membrane type IV collagen antigens. *Zool. Scien.*, 8:359-369.
- Scarpino, S.; Stoppacciaro, A.; Pellegrini, C.; Marzullo, A.; Zardi, L.; Tartaglia, F.; Viale G.; Ruco L.P.** (1999) Expression of EDA/EDB isoforms of fibronectin in papillary carcinoma of the thyroid. *J. Pathol.* 188:163-167.
- Schachner, M.; Schoonmaker, G.; Hynes, R.O.** (1978) Cellular and subcellular localization of LETS protein in the nervous system. *Brain Res.*, 158:149-158.
- Schittny, J.C.; Yurchenco, P.D.** (1989) Basement membranes: molecular organization and function in development and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1:983-988.
- Schmidt-Nielsen, B.** (1952) Renal tubular excretion of urea in kangaroo rats. *Am. J. Physiol.* 170: 45-56.
- Schmidt-Nielsen, B.; O'dell, R.** (1961) Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. *Am. J. Physiol.*, 200:1119-1124.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1959) The physiology of the camel. *Sci. Amer.*, 201:140-151.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1964) *Desert animals*. Ed. Clarendon Press, Oxford.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1969) The neglected interface: the biology of water as a liquid gas sistem. *Quart. Rev. Biophys.*, 2:283-304.
- Schnaper, H.W.** (1995) Balance between matrix synthesis and degradation: A determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol.*, 9:104-111.
- Schoen, R.C.; Bentley, K.L.; Klebe, R.J.** (1982) Monoclonal antibody against human plasma fibronectin which inhibits cell attachment. *Hybridoma*, 1:99-108.

- Schulze, B.; Mann, K.; Poschl, E.; Yamada, Y.; Timpl, R.** (1996) Structural and functional analysis of the globular domain IVa of the laminin alpha 1 chain and its impact on the adjacent RGD site. *Biochem. J.*, 314:847-851.
- Schwarzbauer, J.E.** (1991) Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *J. Cell Biol.*, 113:1463-1473.
- Seiler, M.W.; Venkatachalam, M.A.; Cotran, R.S.** (1975) Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science*, 189:390-393.
- Shimomura, H.Y., Spiro, R.G.** (1987) Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. *Diabetes*, 36:374-381.
- Smith, M.** (1951) *The Brithis Amphibians and Reptiles*. Ed. Collins, London.
- Smith, P.S.; Fanning, J.C.; Aarons, I.** (1989) The structure of the normal human glomerular basement membrane. Ultrastructural localization of type IV collagen and laminin. *Pathology*, 21:254-258.
- Soininen, R.; Haka-Risku, T.; Prockop, D.J.; Tryggvason, K.** (1987) Complete primary structure of the alpha 1 chain of human basement membrane (type IV) collagen. *FEBS Lett.*, 225:188-194.
- Sonnenberg, A.; Modderman, P.W.; Hogervorst, F.** (1988) Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature*, 336:487-489.
- Sorokin, L.; Girg, W.; Gopfert, T.; Hallmann, R.; Deutzmann, R.** (1994) Expression of novel 400-kDa laminin chains by mouse and bovine endothelial cells. *Eur. J. Biochem.*, 223:603-610.
- Sorokin, L.M.; Pausch, F.; Durbeej, M.; Ekblom, P.** (1997) Differential expression of five laminin alpha (1-5) chains in developing and adult mouse kidney. *Dev. Dyn.*, 210:446-462.
- Spiro, R.G.** (1967) Studies on the renal glomerular basement membrane. Nature of the carbohydrate units and their attachment to the peptide portion. *J. Biol. Chem.*, 242:1923-1932.

- Stenman, S.; Vaheri, A.** (1978) Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin in normal human tissues. *J. Exp. Med.*, 147:1054-1064.
- Stensiò, E.A.** (1986) The cyclostomes with special references to the diphyletic origin of the Petromyzontida and Myxinoidea, *Current problems of lower vertebrate phylogeny*, Orvig, Ed. Almquist and Wiksell, Stockholm, pp. 13-17.
- Sterk, L.M.; de Melker, A.; Kramer, D.; Kuikman, I.; Chand, A.; Claessen, N.; Weening, J.J.; Sonnenberg, A.** (1998) Glomerular extracellular matrix components and integrins. *Cell Adhes. Commun.*, 5:177-192.
- Stow, J.L.; Sawada, H.; Farquhar, M.G.** (1985) Basement membrane heparan sulfate proteoglycans are concentrated in the lamina rarae and in podocytes of the rat renal glomerulus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3296-3300.
- Stow, J.L.; Soroka, C.J.; MacKay, K.; Striker, L.; Striker, G.; Faquhar, M.G.** (1989) Basement membrane heparan sulfate proteoglycan is the main proteoglycan synthesized by glomerular epithelial cells in culture. *Am. J. Pathol.*, 135:637-646.
- Striker, G.E.; Killen, P.D.; Farin, F.M.** (1980) Human glomerular cells in vitro: Isolation and characterization. *Transplant. Proc.*, 12:88-99.
- Stroobant, P.; Rice, A.P.; Gullick, W.J.; Cheng, D.J.; Kerr, I.M.; Waterfield, M.D.** (1985) Purification and characterization of vaccinia virus growth factor. *Cell*, 42:383-393.
- Sudhof, T.C.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S.; Russell, D.W.** (1985) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 228:815-822.
- Sugimoto, M.; Oohashi, T.; Yoshioka, H.; Matsuo, N.; Ninomiya, Y.** (1993) cDNA isolation and partial gene structure of the human alpha 4 (IV) collagen chain. *FEBS Lett.*, 330:122-128.
- Sung, U.; O'Rear, J.J.; Yurchenco, P.D.** (1993) Cell and heparin binding in the distal long arm of laminin: identification of active and cryptic sites with recombinant and hybrid glycoprotein *J. Cell Biol.*, 123:1255-1268.

- Sung, U.; O'Rear, J.J.; Yurchenco, P.D.** (1997) Localization of heparin binding activity in recombinant laminin G domain. *Eur. J. Biochem.*, 250:138-143.
- Suzuki, D.; Miyazaki, M.; Jinde, K.; Koji, T.; Yagame, M.; Endoh, M.; Nomoto, Y.; Sakai, H** (1997) In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 52:111-119.
- Swiergosz, R.; Zakrzewska, M.; Sawicka-Kapusta, K.; Bacia, K.; Janowska I.** (1998) Accumulation of cadmium in and its effect on bank vole tissues after chronic exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41:130-136.
- Takami, H.; Naramoto, A.; Shigematsu, H.; Ohno, S.** (1991) Ultrastructure of glomerular basement membrane by quick-freeze and deep etch methods. *Kidney Int.*, 39:659-664.
- Talts, J.F.; Andac, Z.; Gohring, W.; Brancaccio, A.; Timpl, R.** (1999) Binding of the G domains of laminin alpha 1 and alpha 2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.*, 18:863-870.
- Talts, J.F.; Sasaki, T.; Miosge, N.; Göhring, W.; Mann, K.; Mayner, R.; Timpl, R.** (2000) Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha 4 chain and its proteolytic processing in tissues. *J. Biol. Chem.*, 275:35192-35199.
- Talts, J.F.; Timpl, R.** (1999) Mutation of a basic sequence in the laminin alpha 2 LG3 module leads to a lack of proteolytic processing and has different effects on beta 1 integrin-mediated cell adhesion and alpha-dystroglycan binding. *FEBS Lett.*, 458:319-323.
- Terranova, V.P.; Rohrbach, D.H.; Martin, G.R.** (1980) Role of laminin in the attachment of PAM 212 (Epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, 22:719-726.
- Thorner, P.; Jansen, B.; Baumal, R.; Valli, V.E.; Goldberger, A.** (1987) Samoyed hereditary glomerulopathy: immunohistochemical staining of basement membranes

of kidney for laminin, collagen type IV, fibronectin, and Goodpasture antigen, and correlation with electron microscopy of glomerular capillary basement membranes. *Lab. Invest.*, 56:435-443.

Thorson, T.B.; Cowan, C.M.; Watson, D.E. (1967) *Potamotrygon* ssp.: elasmobranchs with low urea content. *Science*, 158:375-377.

Thorson, T.B.; Watson, D.E.; Cowan, C.M. (1967) The status of the freshwater shark of Lake Nicaragua. *Copeia* 1966, 3:385-402.

Timpl, R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, 180:487-502.

Timpl, R. (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8:618-624. Review

Timpl, R.; Aumailley, M. (1989) Biochemistry of basement membranes. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.*, 18:59-76.

Timpl, R.; Brown, J.C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, 18:123-132. Review.

Timpl, R.; Dziadek, M.; Fujiwara, S.; Nowack, H.; Wick, G. (1983) Nidogen: a self-aggregating basement membrane protein. *Eur. J. Biochem.*, 137:455-465.

Timpl, R.; Engel, J.; Martin, G.R. (1983) Laminin a multifunctional protein of basement membranes. *Trends Biochem. Sci.*, 8:207-209.

Timpl, R.; Rohde, H.; Robey, P.G.; Rennard, S.I.; Foidart, J.M.; Martin, G.R. (1979) Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.*, 254:9933-9937.

Timpl, R.; Wiedemann, H.; van Delden, V.; Furthmayr, H.; Kuhn, K. (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.*, 120:203-211.

Ting, K.M.; Rothaupt, D.; McCormick, T.S.; Hammerberg, C.; Chen, G.; Gilliam, A.C.; Stevens, S.; Culp, L.; Cooper, K.D. (2000) Overexpression of the oncofetal Fn variant containing the EDA splice-in segment in the dermal-epidermal junction of psoriatic uninvolved skin. *J. Invest. Dermatol.*, 114:706-11.

- Tisher, C.C.; Madsen, K.M.** (1986) Anatomy of the kidney., *The kidney*, Brenner y Rector; Ed. Saunders, Philadelphia.vol. 1, pp. 3-60.
- Tomaselli, K.J.; Hall, D.E.; Flier, L.A.; Gehlsen, K.R.; Turner, D.C.; Carbonetto, S.; Reichardt, L.F.** (1990) A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1 class integrins -alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1- that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron*, 5:651-662.
- Tooney, N.M.; Mosesson, M.W.; Amrani, D.L.; Hainfeld, J.F.; Wall, J.S.** (1983) Solution and surface effects on plasma fibronectin structure. *J. Cell Biol.*, 97:1686-1692.
- Tsen, G.; Halfter, W.; Kroger, S.; Cole, G.J.** (1995) Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, 270:3392-3399.
- Tunggal, P.; Smyth, N.; Paulsson, M.; Ott, M-C.** (2000) Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc. Res. Tech.*, 51:214-227.
- Turner, N.; Mason, P.J.; Brown, R.; Fox, M.; Povey, S.; Rees, A.; Pusey, C.D.** (1992) Molecular cloning of the human Goodpasture antigen demonstrates it to be the alpha 3 chain of type IV collagen. *J. Clin. Invest.*, 89(2):592-601.
- Tytler, P.** (1988) Morphology of the pronephros of the juvenile brown trout, *Salmo trutta*. *J. Morph.*, 195:189-204.
- Universities Federation for Animal Welfare** (1999) *The UFAW handbook of the care and management of laboratory animals*. Ed. Poole, T. B.; Blackwell Science, 7th ed. Oxford.
- Vaheri, A.; Alitalo, K.; Hedman, K.; Keski-Oja, J.; Vartio, T.** (1983) Fibronectin and epithelial cells. *Structural carbohydrates in the liver*. Eds. Popper, H.; Reutter, W; Kottgen, E. y Gudat, F. MTP Press Limited, Boston., pp. 385-398.
- Vaheri, A.; Ruoslahti, E.; Westermarck, B.; Ponten, J.** (1976) A common cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: Loss in malignant cells. *J. Exp. Med.*, 143:64-72.

- Van De Water, L. 3rd; Schroeder, S.; Crenshaw, E.B.; Hynes, R.O.** (1981) Phagocytosis of gelatin-latex particles by a murine macrophage line is dependent on fibronectin and heparin. *J. Cell Biol.*, 90:32-39.
- Vartio, T.** (1983) Fibronectin: multiple interactions assigned to structural domains. *Med. Biol.* 61, 283-295.
- Vartio, T.; Vaheri, A.** (1983) Fibronectin: chains of domains with diversified functions. *TIBS*, December: 442-444.
- Villiger, B.; Kelley, D.G.; Engleman, W.; Kuhn, C.; McDonald, J.A.** (1981) Human alveolar macrophage fibronectin-synthesis, secretion, and ultrastructural localization during gelatin-coated latex particle binding. *J. Cell Biol.*, 90:711-720.
- Vimtrup, B.** (1928) On number, shape, structure, and surface area of glomeruli in kidney of man and mammals. *Am. J. Anat.* 41:123-151.
- Virtanen, I.; Gullberg, D.; Rissanen, J.; Kivilaakso, E.; Kiviluoto, T.; Laitinen, L.A.; Lehto, V-P.; Ekblom, P.** (2000) Laminin alpha 1 chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp. Cell Res.*, 257:298-309.
- Virtanen, I.; Laitinen, L.; Korhonen, M.** (1995) Differential expression of laminin polypeptides in developing and adult human kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 43:621-628.
- Von Der Mark, K.; Kühl, V.** (1985) Laminin and its receptor. *Biochim. Biophys. Acta.*, 823:147-160.
- Voss, B.; Allah, S.; Rauterberg, J.; Ullrich, K.; Gieselmann, V.; Von Figura, K.** (1979) Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90:1348-1354.
- Vuento, M.; Wrann, M.; Ruoslahti, E.** (1977) Similarity of fibronectins isolated from human plasma and spent fibroblast culture medium. *FEBS Lett.*, 82:227-231.
- Vuolteenaho, R.; Nissinen, M.; Sainio, K.; Byers, M.; Eddy, R.; Hirvonen, H.; Shows, T.; Sariola, H.; Engvall, E.; Tryggvason, K.** (1994) Human laminin M

- chain (merosin): Complete primary structure, chromosomal assignment, and expression of the M and A chain in human fetal tissues. *J. Cell Biol.*, 124:381-394.
- Walker A., Gallagher J.T.** (1996) Structural domains of heparan sulphate for specific recognition of the C-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (HEP11). *Biochem. J.*, 317:871-877.
- Walker, F.** (1973) The origin, turnover, and removal of the glomerular basement membrane. *J. Pathol.*, 110:233-244.
- Weber, M.** (1992) Basement membrane proteins. *Kidney Int.*, 41:620-628.
- Welsch, U.; Storch, V.** (1973) Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Nephron adulter Gymnophionen (*Ichthyophis kohtaoensis*, Taylor). *Zool. Jb. Anat.*, 90:311-322.
- Wendelaar Bonga, S.E.** (1973) Morphometrical analysis with the light and electron microscope of the kidney of the andromous three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*, form *trachurus*, from fresh water and from sea water. *Z. Zellforsch.*, 137:563-588.
- Williams, M.J.; Phan, I.; Baron, M.; Driscoll, P.C.; Campbell, I.D.** (1993) Secondary structure of a pair of fibronectin type 1 modules by two dimensional NMR. *Biochemistry*, 32:7388-7395.
- Williams, M.J.; Phan, I.; Harvey, T.S.; Rostagno, A.; Gold, L.; Campbell, I.D.** (1994) Solution structure of a pair of fibronectin type 1 modules with fibrin binding activity. *J. Mol. Biol.*, 235:1302-1311.
- Wilson, V.M.; Carlson, S.S.; White, T.J.** (1977) Biochemical evolution. *Science*, 46:573-639.
- Wolf, G.; Schroeder, R.; Thaiss, F.; Ziyadeh, F.N.; Helmchen, U.; Stahl, R.A.** (1998) Glomerular expression of p27Kip1 in diabetic db/db mouse: Role of hyperglycemia. *Kidney Int.*, 53:869-879.
- Wolff, I.; Timpl, R.; Pecker, I.; Steffen, C.** (1967) A two-component system of human serum agglutinating gelatine-coated erythrocytes. *Vox Sang.*, 12:443-456.

Wlostowski, T.; Krasowska, A.; Dworakowski, W. (1996) Low ambient temperature decreases cadmium accumulation in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *BioMetals*, 9:363-369.

Wlostowski, T.; Krasowska, A.; Godlewska-Zylkiewicz, B. (2000) Dietary cadmium decreases lipid peroxidation in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 14:76-80.

Wlostowski, T.; Krasowska, A.; Laszkiewicz-Tiszczenko, B. (2000) Dietary cadmium induces histopathological changes despite a sufficient metallothionein level in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Com. Biochem. Physiol.*, 126C:21-28.

Xiaoling, J.; Xinxia, H.; Yucan, Z.; Junqing, Y.; Liqun, Y. (1998) Studies on variation of lactate dehydrogenase and superoxide dismutase for six murids. *Acta Theriol. Sinica* 18:144-149.

Yamada, K.M. (1989) Fibronectins: Structure, functions and receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1:956-963.

Yamada, K.M.; Hasegawa, T.; Hasegawa, E.; Kennedy, D.W.; Hirano, H.; Hayashi, M.; Akiyama, S.K.; Olden, K. (1984a) Fibronectin and interactions at the cell surface. *Matrices and cell differentiation*. Ed. Alan R. Liss Inc. New York, pp. 1-15.

Yamada, K.M.; Hayashi, M.; Hirano, H.; Akiyama, S.K. (1984b) Fibronectin and cell surface interactions. *The role of extracellular matrix in development*. Trelstad, R.; Ed. Alan R. Liss Inc. New York, pp. 89-121.

Yamada, K.M.; Kennedy, D.W. (1979) Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical. *J. Cell Biol.*, 80:492-498.

Yamada, K.M.; Kleinman, H.K. (1992) Functional domains of cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4:819-823.

Yamada, K.M.; Olden, K. (1978) Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275:179-184.

- Yamada, K.M.; Schlesinger, D.H.; Kennedy, D.H.; Pastan, I.** (1977) Characterization of a major fibroblast cell surface glycoprotein. *Biochemistry*, 16:5552-5559.
- Yamada, K.M.; Weston, J.A.** (1974) Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3492-3496.
- Yamada, K.M.; Yamada, S.S.; Pastan, I.** (1976) Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1217-1221.
- Yang, C.W.; Hattori, M.; Vlassara, H.; Carome, M.A.; Yamato, E.; Elliot, S.; Striker, G.E.; Striker, L.J.** (1995) Overexpression of transforming growth factor beta 1 is associated with upregulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 5:1610-1617.
- Youson, J.H.** (1981) The kidney, *The biology of lampreys*, Hardisty y Potter, Ed. Academic Press, New York. pp. 191-261.
- Youson, J.H.; Mcmillan, D.B.** (1970) The opisthonephric kidney of the sea lamprey of the Great Lakes, *Petromyzon marinus* L. I. The renal corpuscle. *Am. J. Anat.*, 127:207-232.
- Youson, J.H.; Ooi, E.C.** (1979) Development of the renal corpuscle during metamorphosis in the lamprey. *Am. J. Anat.*, 155:201-222.
- Yurchenco, P.D.; Cheng, Y.S.** (1993) Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J. Biol. Chem.* 268:17286-17299.
- Yurchenco, P.D.; Cheng, Y.S.; Schittny, J.C.** (1990) Heparin modulation of laminin polymerization. *J. Biol. Chem.*, 265:3981-3991.
- Yurchenco, P.D.; O'Rear, J.J.** (1993) Supramolecular organization of basement membranes. *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Academic Press, San Diego, pp. 19-47.
- Yurchenco, P.D.; O'Rear, J.J.** (1994) Basal lamina assembly. *Current Opin. Cell Biol.*, 6:674-681.

Yurchenco, P.D.; Tsilibary, E.C.; Charonis, A.S.; Furthmayr, H. (1985) Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J. Biol. Chem.*, 260:7636-7644.

Zhang, Y.Z.; Lee, H.S. (1997) Quantitative changes in the glomerular basement membrane components in human membranous nephropathy. *J. Pathol.*, 183: 8-15.

Zhou, J.; Hertz, J.M.; Leinonen, A.; Tryggvason, K. (1992) Complete amino acid sequence of the human alpha 5 (IV) collagen chain and identification of a single-base mutation in exon 23 converting glycine 521 in the collagenous domain to cysteine in an Alport syndrome patient. *J. Biol. Chem.*, 267:12475-12481.

Zhou, J.; Mochizuki, T.; Smeets, H.; Antignac, C.; Laurila, P.; de Paepe, A.; Tryggvason, K.; Reeders, S.T. (1993) Deletion of the paired alpha 5 (IV) and alpha 6 (IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science*, 261:1167-1169.

Zimmermann, K.W. (1933) Über den Bau des Glomerulus der Säugerniere, *Weitere Mitteilungen. Ztschr. f. mikr.-anat. Forsch.* 32: 176-278.

Zuasti, A.; Agulleiro, B.; Hernandez, F. (1983) Ultrastructure of the kidney of the marine teleost *Sparus auratus*; the renal corpuscle and the tubular nephron. *Cell Tissues Res.*, 228:99-106.

Zucker, M.B.; Mosesson, M.W.; Broekman, M.J.; Kaplan, K.L. (1979) Release of platelet fibronectin (cold-insoluble globulin) from alpha granules induced by thrombin or collagen; lack of requirement for plasma fibronectin in ADP-induced platelet aggregation. *Blood*, 54:8-12.