

FORMACION CONTINUADA

Biología molecular de los mecanismos de acidificación urinaria: implicaciones para el diagnóstico de la acidosis tubular renal

G. Flores y D. Battle

Northwestern University Medical School. Chicago, Illinois, USA.

PANORAMA GENERAL DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ACIDOSIS TUBULAR RENAL (ATR)

La clasificación inicial de los defectos tubulares de la acidificación urinaria dividía a la ATR en dos grupos: aquella que afectaba a la nefrona distal (ATRD o ATR tipo I) y la que involucraba al túbulo proximal (ATRP o ATR tipo II)¹⁻⁴. Esta última se caracteriza por bicarbonaturia marcada o generalmente se acompaña de otras alteraciones características del síndrome de Fanconi, reflejando una disfunción generalizada de la función tubular proximal. Algunos sujetos presentan únicamente bicarbonaturia sin que exista evidencia de alguna otra alteración de la función del túbulo proximal⁵. La ATR tipo III fue descrita en niños con bicarbonaturia pero que además eran incapaces de reducir el pH urinario en presencia de acidemia (una característica de la forma clásica de ATR o ATR tipo I)². El término ATR tipo IV se introdujo para referirse a pacientes en los cuales la diferencia de aldosterona es la causa aparente de hiperpotasemia y acidosis tubular renal⁶. Los sujetos con deficiencia de aldosterona mantienen la capacidad de reducir el pH urinario y no presentan bicarbonaturia⁶⁻¹¹. En consecuencia, la alteración tubular asociada con la deficiencia de aldosterona puede distinguirse claramente de aquella asociada con disfunción tubular proximal o distal.

El término ATR tipo IV parecía adecuado en los términos de una clasificación tipológica de los síndromes de ATR basada primordialmente en las ca-

racterísticas clínicas de los pacientes. Sin embargo, más tarde se identificó que algunos pacientes con acidosis tubular hiperpotasémica con características clínicas similares a las de los sujetos con deficiencia de aldosterona (o ATR tipo IV) no eran capaces de disminuir el pH urinario en respuesta a la acidosis sistémica o a la infusión de Na₂SO₄⁷⁻⁹. Estos estudios demostraron que el mecanismo causal de los síndromes de ATR no puede inferirse tomando en cuenta únicamente las características clínicas⁷⁻¹⁴. Más aún, existen implicaciones terapéuticas que surgen a partir de una identificación más precisa del defecto causal. Los pacientes con deficiencia de aldosterona responden frecuentemente al tratamiento con mineralocorticoides (aunque a menudo se requieren dosis elevadas para corregir la acidosis y la hiperpotasemia)⁶. En pacientes con ATR hiperpotasémica, la acidificación urinaria no responde adecuadamente al tratamiento con mineralocorticoides. Esto resalta la diferencia fundamental en el mecanismo renal causante de una alteración que desde el punto de vista clínico se manifiesta con un cuadro prácticamente idéntico.

Todo lo anterior destaca que la clasificación tipológica de los síndromes de RTA no puede diferenciar la compleja diversidad de síndromes que se presentan como resultado de alteraciones específicas de la acidificación urinaria. En ocasiones tales alteraciones pueden involucrar a uno o más segmentos de la nefrona o bien a una o más alteraciones en los mecanismos de acidificación urinaria. Por ejemplo, algunos pacientes con ATR hiperpotasémica tienen tanto deficiencia de aldosterona como un defecto tubular que impide la secreción de protones, ya sea como resultado de una alteración en la reabsorción distal de sodio o por la disfunción de la ATPasa de H⁺¹⁴⁻¹⁷. Más aún, las características clínicas pueden ser similares o se pueden sobreponer una a la otra. Por otro lado, algu-

Correspondencia: Daniel Battle, MD.
Profesor and Chief.
Division of Nephrology and Hypertension.
Northwestern University Medical School.
303 East Chicago. Searle 10-475.
Chicago IL, 60611. USA

nos sujetos tienen alteraciones leves en el mecanismo de acidificación urinaria y no desarrollan acidosis metabólica hiperclorémica de forma espontánea, las llamadas formas incompletas de ATR distal (ATRD)^{18, 19}.

Sólo el estudio detallado de los mecanismos de acidificación urinaria permite la identificación de las alteraciones responsables, y aun así existen limitaciones inherentes a este tipo de estudios clínico-fisiológicos¹⁷. A pesar de estas limitaciones, el abordaje mecanístico permite una mejor identificación de los diversos tipos de ATRD. Los posibles mecanismos que pueden causar trastornos de la acidificación distal incluyen: a) un defecto primario de la ATPasa de H⁺ o de la ATPasa de H⁺/K⁺ (defectos secretorios); b) deficiencia de anhidrasa carbónica en el citoplasma de las células; c) reflujo de protones de la luz tubular del túbulo colector a la célula tubular; d) cualquier otra alteración que disminuya la secreción de H⁺ en presencia de una ATPasa de H⁺ intacta (defecto en la tasa de secreción de protones)¹⁷ (ver ref. 17 para una revisión detallada de estos defectos).

En los últimos años, el progreso en el conocimiento de los mecanismos de secreción de ácido por las células de los túbulos colectores y los transportadores responsables ha sido notable. En el presente artículo destacaremos aspectos básicos de la biología celular y molecular de las células de los túbulos colectores y sus transportadores. Por último, discutiremos avances recientes relacionados con las posibles implicaciones del diagnóstico molecular en los síndromes de ATRD.

BIOLOGIA DE LA SECRECIÓN DE H⁺ POR LAS CELULAS DEL TUBULO DISTAL Y TUBULO COLECTOR

Tipos de células

Los segmentos de la nefrona distal, incluyendo los túbulos conector y colector, tienen epitelios heterogéneos. En estos segmentos se encuentran las células del túbulo conector, células principales y células intercaladas²⁰⁻²⁵. Las células intercaladas se distinguen de las células principales y de las células del túbulo conector por tener menor voltaje en la membrana basolateral, mayor resistencia fraccional de la membrana apical y menor conductancia de la membrana basolateral para K⁺. Las células principales intervienen en el transporte de Na⁺, reabsorción de H₂O y secreción de K⁺, en tanto que las células intercaladas intervienen en la regulación renal del equilibrio ácido-base.

Células intercaladas

Estudios morfológicos han demostrado que las células intercaladas tienen microvellosidades abundantes en la superficie apical y gran cantidad de mitocondrias citoplásmicas.

Estas células se encuentran tanto en el túbulo conector como en los túbulos colectores corticales y medulares. Constituyen el 40% de las células en la nefrona distal y existen en dos formas: una secreta H⁺ (células intercaladas α) y la otra HCO₃⁻ (células β) (fig. 1). Las células intercaladas α son abundantes en el túbulo colector medular superficial, aunque también están presentes en el túbulo colector cortical. Este tipo de células tienen una ATPasa de H⁺ en la membrana apical y un transportador Cl/HCO₃⁻ en la membrana basolateral²⁵⁻²⁸. Las células intercaladas β se encuentran únicamente en el túbulo colector cortical y su polaridad se encuentra invertida, ya que tienen una ATPasa de H⁺ en la membrana basolateral y un transportador Cl/HCO₃⁻ en la membrana apical²⁵⁻²⁷.

Una característica importante de estas células es la expresión específica de la isoforma de 56'kd de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática²⁶⁻²⁸. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, la ATPasa de H⁺ se encuentra localizada en sitios opuestos en los dos tipos de células intercaladas²⁷. En la rata, un grupo de células localizadas en el túbulo colector y el túbulo colector medular exhiben tinción inmunohistoquímica apical para la ATPasa vacuolar de H⁺ (células intercaladas α), en tanto que otro grupo de células exhiben tinción basolateral (células intercaladas β)²⁸.

Estudios funcionales utilizando N-etilmaleimide (NEM), un inhibidor de la ATPasa de H⁺, coinciden con la localización inmunohistoquímica de esta enzima. NEM inhibe la secreción de H⁺ que es independiente de Na⁺ en la membrana apical de las células intercaladas α pero no en la membrana basolateral. Por el contrario, NEM inhibe la secreción de H⁺ independiente de Na⁺ en la membrana basolateral de las células intercaladas β ²⁹⁻³¹. Desafortunadamente NEM no sólo inhibe a la ATPasa vacuolar de H⁺, sino que también inhibe a otras ATPasas de la clase E1-E2, dentro de las cuales se encuentra la ATPasa de H⁺/K⁺. En consecuencia, es difícil interpretar los resultados de los estudios que utilizan NEM. La bafilomicina A1, un inhibidor específico de las ATPasas de H⁺, disminuye la secreción de H⁺ de las células del túbulo colector externo de rata en cultivo primario (estas células son probablemente células intercaladas α)³².

Aunque los resultados de los estudios con inhibidores de los transportadores son sugestivos, queda

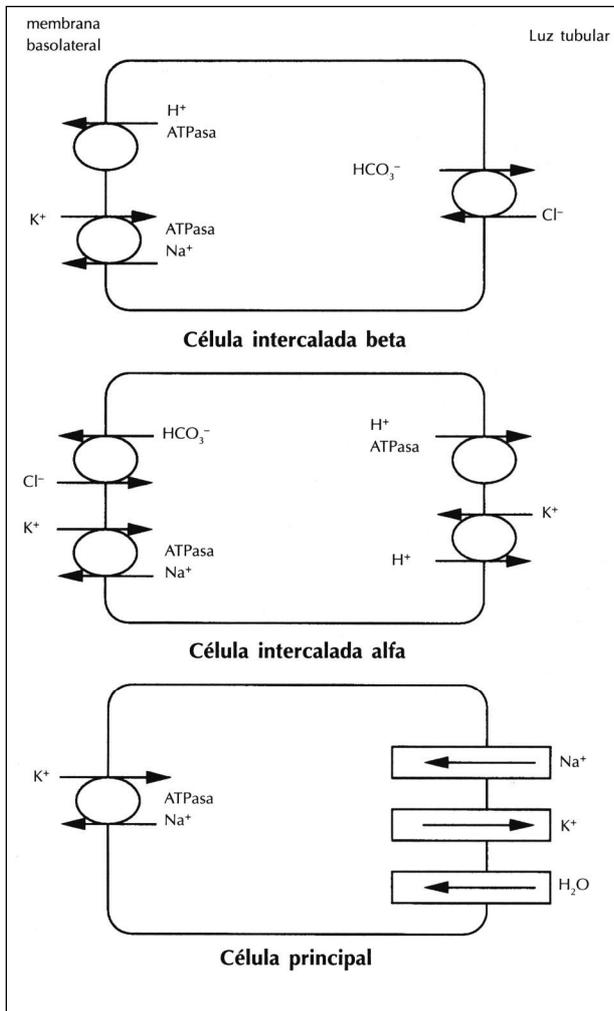


Fig.1.—Esquema de los transportadores ácido-base en los dos tipos de células intercaladas en el túbulo colector. Las células intercaladas α tienen una ATPasa vacuolar en la membrana apical y transportador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en la membrana basolateral. En las células β , la polaridad está invertida: la membrana apical tiene un transportador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y la membrana basolateral tiene la ATPasa vacuolar H^+ . Las células principales reabsorben Na^+ y secretan K^+ a través de canales específicos localizados en la membrana apical.

por demostrar que la ATPasa vacuolar de H^+ localizada por inmunohistoquímica en la membrana basolateral de las células intercaladas β sea el factor limitante para la secreción de HCO_3^- por las células de los túbulos colectores corticales. Por otro lado, se ha demostrado que cuando se alimenta a ratas con una dieta rica en ácido, las células β se transforman en células α . Este proceso se conoce como plasticidad en la polaridad de los epitelios y parece ser que este proceso adaptativo involucra exclusiva o preferencialmente a las células intercaladas β ³³.

Células principales

Constituyen el 60% de las células en el túbulo distal y el túbulo colector y su función principal es la reabsorción de Na^+ y la secreción de K^+ ^{21, 22}. Indirectamente, facilitan la secreción de H^+ por las células intercaladas. La entrada de Na^+ luminal a las células se realiza a favor de un gradiente de concentración a través de canales de Na^+ específicos en la membrana apical (fig. 1). A diferencia de los mecanismos de transporte eléctricamente neutros presentes en el túbulo proximal y asa ascendente de Henle, el movimiento de Na^+ a través de los canales es electrogénico ya que crea una diferencia de potencial negativa en la luz tubular. La diferencia de potencial generada por la reabsorción de Na^+ promueve la reabsorción pasiva de Cl^- a través de la vía paracelular o la secreción de K^+ a través de canales de K^+ presentes en la membrana apical. Este proceso también favorece la secreción de H^+ por las células intercaladas (tipo α) vecinas.

BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

ATPasa de H^+

El epitelio renal enfrenta la difícil tarea de regular la secreción de H^+ y dicha función es realizada por las ATPasas vacuolares (V-ATPasas) de la membrana plasmática³⁴. En el túbulo colector, las V-ATPasas electrogénicas que translocan protones son las responsables de la mayor parte de la secreción de protones que se lleva a cabo en este segmento. Las V-ATPasas son abundantes en las células intercaladas de los túbulos colectores; alcanzan concentraciones promedio de 14.000 bombas/ m^2 ³⁴. Las V-ATPasas son proteínas grandes de varias subunidades relacionadas estructuralmente a las ATPasas de $\text{H}^+ \text{F}_0 \text{F}_1$, las cuales están formadas de 9 polipéptidos diferentes^{34, 35}. Tienen un dominio catalítico (V1), formado de proteínas de membrana, y un dominio transmembrana (VO)³⁴. Se piensa que el dominio V1 contiene una «cabeza» catalítica formada de 3 pares de subunidades A (70 kDa) y B (56kDa) colocadas en una estructura hexagonal que rodea a la subunidad central D (33 kDa)^{35, 56}.

La subunidad A contiene el sitio de hidrólisis de ATP en tanto que la subunidad B tiene función reguladora³⁵⁻³⁷. Existen dos isoformas de la subunidad B (B1 y B2), codificadas por genes diferentes, las cuales tienen secuencias amino y carboxilo terminales particulares y se expresan en diferentes células epiteliales tubulares³⁴. La isoforma B1 está localizada en las células intercaladas, pero no está pre-

sente en las células del túbulo proximal. La isoforma B2 es abundante en el túbulo proximal, pero no se detecta en las células intercaladas³⁴. Estos hallazgos indican que las diferencias intrínsecas en las V-ATPasas, manifestadas por diferencias estructurales, distribución en la nefrona y propiedades enzimáticas, aportan especificidad al control del transporte de protones.

En el túbulo colector renal, la distribución de las V-ATPasas provee un mecanismo de control en la secreción de H⁺³⁸⁻⁴¹. Como se mencionó previamente, las V-ATPasas pueden estar polarizadas a la membrana plasmática luminal, produciendo una célula secretora α , o bien polarizadas a la membrana basolateral produciendo una célula secretora β (figura 1). La tasa de transporte de H⁺ o HCO₃⁻ puede variar en forma independiente en los dos tipos de células intercaladas, lo cual permite a las células del túbulo cortical secretar bicarbonato durante alcalosis metabólica y reabsorber bicarbonato durante acidosis metabólica. Por el contrario, en el túbulo colector medular externo, las V-ATPasas de las células intercaladas están localizadas únicamente en el polo luminal⁴⁰, lo cual es compatible con la evidencia fisiológica de que en este segmento no existe secreción de bicarbonato.

ATPasa H⁺/K⁺

Los reportes iniciales de Doucet y Marsy⁴² y Garg y Narang⁴³ revelaron la presencia en los túbulos conectores y colectores de una ATP de K que no requería Na⁺ para ser activado, no era sensible a ouabaina y era inhibida por omeprazole y SCH 28080, dos inhibidores específicos de la ATPasa H⁺/K⁺ gástrica. Estos estudios sugirieron que la ATPasa renal de K⁺ podría originarse de una ATPasa H⁺/K⁺ similar a la enzima gástrica. Se sabe también que la actividad de la ATPasa de K⁺ aumenta durante la restricción de potasio y disminuye con la administración crónica de potasio⁴²⁻⁴⁴. Wingo y cols.⁴⁵ reportaron que tanto omeprazol como el SCH 28080 suprimían la reabsorción de K⁺ y HCO₃⁻ en el túbulo colector medular externo de conejos depletados de K⁺ sin alterar el voltaje transepitelial^{45, 46}. En base a estos resultados se llegó a inferir que la ATPasa de K⁺ era en realidad una ATPasa de H⁺/K⁺, la cual está localizada en la membrana apical de las células del túbulo colector (fig. 1). Asimismo, resultados de estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos en contra de la ATPasa gástrica de H⁺/K⁺ mostraron que este transportador estaba localizado en sólo algunas células del túbulo colector (células intercaladas α). Sin embargo, otros investigadores no han po-

dido reproducir estos resultados mediante análisis de Western blot (véase ref. 47).

La diversidad de ATPasas de H⁺/K⁺ ha sido demostrada a nivel molecular. Dos grupos de investigadores, utilizando intestino grueso de rata, clonaron el DNA complementario (cDNA) que supuestamente codificaba la subunidad catalítica α de la ATPasa de H⁺/K⁺^{47, 48}. Las tres isoformas de la subunidad de la ATPasa de Na⁺/K⁺, la subunidad de la ATPasa de H⁺/K⁺ y la de la ATPasa de Na⁺/K⁺ colónica tienen una homología en sus secuencias de aminoácidos del 50%⁴⁸. En el colon distal, la actividad de la ATPasa de K⁺ se sobrepone a las propiedades de la ATPasa gástrica y a la bomba de Na⁺. La ATPasa H⁺/K⁺ colónica puede ser sensible a ouabaina, ya que la actividad de la ATPasa colónica estimulada por K⁺ es inhibida por ouabaina, pero su actividad no se modifica por omeprazol o SCH 28080⁴⁹. Younes-Ibrahim y cols.⁵⁰ confirmaron la presencia de una ATPasa de K⁺ insensible a ouabaina en el túbulo colector cortical y túbulo colector medular externo de la rata, y revelaron la presencia de una forma de ATPasa sensible a ouabaina en el túbulo contorneado proximal y en las porciones medular y cortical de la asa ascendente de Henle. Asimismo, la actividad de la ATPasa de K⁺ se encontraba suprimida en el túbulo proximal y rama ascendente gruesa de ratas depletadas de K, en tanto que su actividad aumentaba a lo largo del túbulo colector⁵⁰.

De lo anterior se dedujo que la ATPasa de H⁺/K⁺ podría jugar un papel importante en la acidificación urinaria y reabsorción de K⁺ especialmente en condiciones de privación dietética de K⁺. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la administración crónica de vanadato, un inhibidor de la ATPasa de H⁺/K⁺, a ratas alimentadas con dieta baja en potasio no causó alteraciones detectables en el balance de potasio o en el equilibrio ácido-base⁴⁴.

Es importante mencionar que no se conoce con certeza si la ATPasa de H⁺/K⁺ renal es diferente de las enzimas presentes en el colon y en la cavidad gástrica. La carencia de anticuerpos específicos contra la isoforma «renal» es un obstáculo importante para dilucidar el papel potencial de la deficiencia de esta enzima en los tipos de acidosis tubular que se acompañan de hipocaliemia.

Canales de sodio

Los epitelios que reabsorben sodio, tales como los del túbulo colector, el colon distal y los conductos sudoríparos, juegan un papel de gran importancia

no sólo en la función de cada órgano en forma individual, sino que están involucrados en la homeostasis del sodio y líquidos corporales de todo el organismo^{51, 52}. El transporte transepitelial de Na⁺ se realiza a través de canales selectivos de Na⁺ presentes en la membrana apical. Este proceso requiere también la presencia de una ATPasa de Na⁺/K⁺ en la membrana basolateral. La permeabilidad de los canales de sodio está regulada por diversas hormonas y fármacos, entre los que se encuentran la amilorida y sus análogos^{51, 52}. La evidencia farmacológica y electrofisiológica sugiere que no existe una clase única de canales de Na⁺ sensibles a amilorida, sino que existen diversas familias de canales con diferentes características biofísicas, distribución y sensibilidad a amilorida^{51, 52}.

La permeabilidad de los canales en epitelios análogos a las células principales del túbulo colector es regulada por hormonas tales como la vasopresina, la aldosterona, la insulina y el factor natriurético auricular⁵¹⁻⁵⁹. Asimismo, otros factores, tales como la distensión del tejido, la tonicidad basolateral, las alteraciones en la concentración apical de Na⁺, la concentración intracelular de Ca²⁺ y el pH intracelular, pueden modificar la permeabilidad de los canales de Na⁺.

IMPLICACIONES EN EL DIAGNOSTICO MOLECULAR

Gran parte del conocimiento de los diferentes mecanismos responsables de la ATRD se generó en estudios experimentales en modelos animales y en modelos *in vitro* utilizando análogos estructurales de las células epiteliales de los túbulos colectores. En base a los resultados de los estudios previamente mencionados, los modelos fisiológicos aplicados a la clínica han sugerido la existencia de defectos específicos en los transportes de membrana en las células intercaladas (ATPasa de H⁺) (véase ref. 17).

La evidencia directa que apoye estos y otros posibles defectos emergerá conforme las herramientas de la biología molecular y biología celular se apliquen al estudio de las células procedentes de los pacientes con ATRD.

Es altamente probable que se logren establecer correlaciones estructurales y funcionales cuando en los pacientes en los que se hayan llevado a cabo estudios fisiológicos detallados se realicen estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos anti-ATPasa de H⁺ y de la ATPasa de H⁺/K⁺ (cuando se cuente con ellos).

El estudio inmunocitoquímico del tejido renal de dos pacientes con síndrome de Sjögren y ATRD de-

mostró inmunorreactividad negativa o ausente utilizando anticuerpos específicos tales como el anticuerpo anti-31-kD y el anticuerpo policlonal anti-56-kd en contra de la ATPasa de H⁺ de las células de los túbulos colectores⁶⁰ (fig. 2). La presencia en la microscopia electrónica de células con las características ultraestructurales típicas de las células intercaladas sugiere que el defecto o alteración de la acidificación urinaria se debe a la ausencia de la ATPasa de H⁺ en células polarizadas intactas y no a la pérdida selectiva de las células intercaladas alfa. Asimismo, el tejido renal no reaccionó con el antisero en contra de la proteína anti-banda-3, lo cual sugiere anomalía en la expresión tanto de la ATPasa de H⁺ como del transportador de aniones en las células intercaladas⁶⁰.

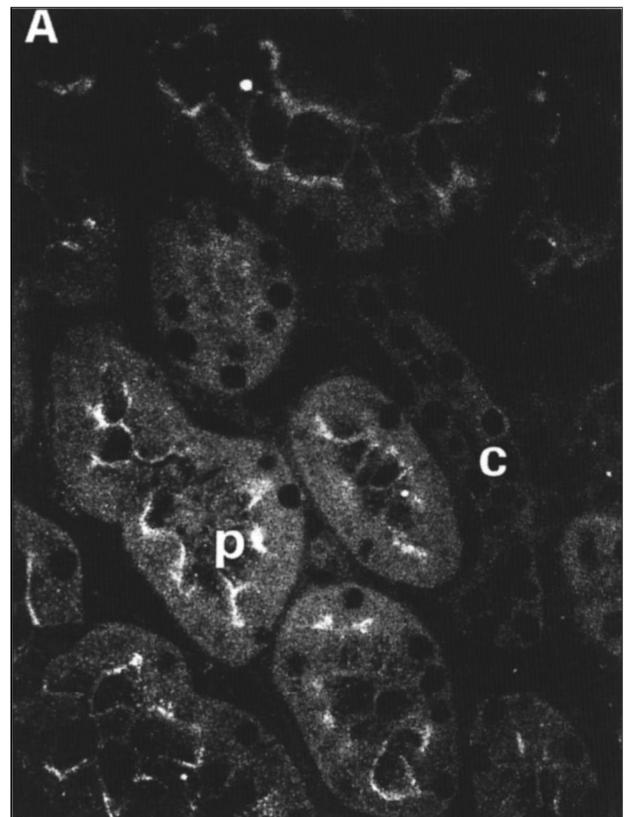


Fig.2.—Tinción por inmunofluorescencia del tejido renal de un paciente con ATRD y síndrome de Sjögren utilizando un anticuerpo monoclonal anti-subunidad 31 kDa de la ATPasa de H⁺. En el panel se observan varios túbulos proximales (p) con tinción apical positiva. Se observa también un túbulo colector (c) que no muestra tinción en ninguna de las células. (En el tejido renal normal la tinción de las células de los túbulos colectores es intensa [imagen no mostrada]).

La ATRD se asocia frecuentemente a enfermedades inmunes, tales como la nefritis por lupus eritematoso

sistémico y el síndrome de Sjögren. En el suero de un paciente con hipertiroidismo por enfermedad de Graves que desarrolló ATRD se aislaron anticuerpos que reaccionaban en contra de las células de los túbulos colectores renales⁶¹. El suero del mismo paciente reaccionaba de manera similar con las células tubulares de individuos sanos y con las células de tejido real de conejo. La afección de las células renales se extendía desde la corteza a la médula renal superficial⁶¹. No hubo ninguna respuesta cuando las células renales humanas o de conejo se expusieron al suero de individuos sanos. En consecuencia, es posible que el desarrollo de anticuerpos en contra de las células tubulares (células intercaladas) sea la causa de la alteración de la acidificación tubular en sujetos con ATRD.

Nosotros demostramos recientemente que los linfocitos de rata poseen una ATPasa vacuolar en la membrana plasmática⁶². La demostración de que los linfocitos expresan la isoforma B1 de la ATPasa vacuolar de H⁺, la cual corresponde a la isoforma presente en las células intercaladas de los túbulos colectores renales, plantea la posibilidad de utilizar linfocitos circulantes como un método accesible para obtener información referente a la expresión renal de la ATPasa de H⁺. Debido al papel crucial que tiene la isoforma B1 en el transporte vectorial de H⁺ en los túbulos colectores, este hallazgo sugiere que el análisis inmunocitoquímico de los linfocitos en sangre periférica puede aportar información relevante al contenido de la ATPasa de H⁺ en las células intercaladas renales. Este método quizá pueda constituir una forma no invasiva de evaluar a los pacientes con ATRD en relación a la presencia de defectos en este transportador a nivel de las células intercaladas renales.

La disponibilidad de las mediciones urinarias de la actividad de las diversas isoenzimas de la anhidrasa carbónica (AC) también será de gran utilidad. Sato y cols.⁶³ informaron que la actividad de la AC podía detectarse por métodos enzimáticos e inmunológicos en las membranas de las células tubulares en la orina de los pacientes con ATR. La actividad de ambas enzimas, tanto AC II como AC IV, puede medirse por métodos enzimáticos en dichas membranas. La isoenzima de AC IV puede distinguirse de la AC II, ya que es resistente al tratamiento con dodesilsulfato de sodio al 0,2%⁶³. La membrana de las células de los pacientes con deficiencia de AC II contiene cantidades normales de AC IV, pero cantidades indetectables de AC II, tanto por métodos enzimáticos como inmunológicos⁶⁴. La ausencia de AC II en la membrana de las células aporta evidencia directa en favor de que la deficiencia de AC en los eritrocitos de los pacientes con deficiencia congénita de AC demostrada previamente también afecta a las células renales de los pacientes con esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Rodríguez Soriano J, Boichis H, Stark H, Edelmann CM Jr: Proximal renal tubular acidosis. A defect in bicarbonate reabsorption with normal urinary acidification. *Pediatr Res* 1: 81-98, 1967.
- McSherry E, Sebastian A, Morris RC Jr: Renal tubular acidosis in infants: the several kinds, including bicarbonate-wasting, classic renal tubular acidosis. *J Clin Invest* 51: 499-514, 1972.
- Sebastian A, Morris RC Jr: Renal tubular acidosis. *Clin Nephrol* 7: 216-30, 1977.
- McSherry E, Morris RC Jr: Attainment and maintenance of normal stature with alkali therapy in infants and children with classic renal tubular acidosis. *J Clin Invest* 61: 509-527, 1978.
- Brenes LG, Brenes JN, Hernández MM: Familial proximal renal tubular acidosis. A distinct clinical entity. *Am J Med* 63: 244-52, 1977.
- Sebastian A, Schambelan M, Lindenfeld S, Morris RC Jr: Amelioration of metabolic acidosis with fludrocortisone therapy in hyporeninemic hypoaldosteronism. *N Engl J Med* 297: 576-83, 1977.
- Battle DC, Arruda JA, Kurtzman NA: Hyperkalemic distal renal tubular acidosis associated with obstructive uropathy. *N Engl J Med* 304: 373-380, 1981.
- Battle D, Itsarayoungyuen K, Arruda JA, Kurtzman NA: Hyperkalemic hyperchloremic metabolic acidosis in sickle cell hemoglobinopathies. *Am J Med* 72: 188-92, 1982.
- Battle DC: Hyperkalemic hyperchloremic metabolic acidosis associated with selective aldosterone deficiency and distal renal tubular acidosis. *Semin Nephrol* 1: 260-273, 1981.
- Arruda JAL, Battle DC, Sehy JT, Roseman MK, Baranowsky R, Kurtzman NA: Hyperkalemia in renal insufficiency: role of aldosterone deficiency and renal tubular unresponsiveness. *Am J Nephrol* 1: 160-167, 1981.
- Battle D, Kurtzman NA: Distal renal tubular acidosis: pathogenesis and classification. *Am J Kidney Dis* 1: 328-44, 1982.
- Battle D: Renal tubular acidosis. *Med Clin North Am* 67: 859-878, 1983.
- Kurtzman NA: Renal tubular acidosis: a constellation of syndromes. *Hosp Pract* 22: 173-8, 181, 1987.
- Battle DC: Segmental characterization of defects in collecting tubule acidification. *Kidney Int* 30: 546-54, 1986.
- Battle DC: Sodium-dependent urinary acidification in patients with aldosterone deficiency and in adrenalectomized rats: effect of furosemide. *Metabolism: Clinical & Experimental* 35: 852-60, 1986.
- Schlueter W, Kelani T, Hizon M, Kaplan B, Battle DC: On the mechanism of impaired distal acidification in hyperkalemic renal tubular acidosis: evaluation with amiloride and bumetanide. *J Am Soc Nephrol* 3: 953-64, 1992.
- Battle D, Flores G: Underlying defects in distal renal tubular acidosis: new understandings. *Am J Kid Dis* 27: (en prensa). 1996.
- Tannen RL, Falls WF Jr, Brackett NC Jr: Incomplete renal tubular acidosis: some clinical and physiological features. *Nephron* 15: 111-23, 1975.
- Battle D, Grupp M, Gaviria M, Kurtzman NA: Distal renal tubular acidosis with intact capacity to lower urinary pH. *Am J Med* 72: 751-8, 1982.
- Stone DK, Seldin DW, Kokko JP, Jacobson HR: Mineralocorticoid modulation of rabbit medullary collecting duct acidification. A sodium-independent effect. *J Clin Invest* 72: 77-83, 1983.
- Koeppen BM: Electrophysiological identification of principal and intercalated cells in the rabbit outer medullary collecting duct. *Eur J Physiol* 409: 138-41, 1987.

22. Muto S, Giebisch G, Sansom S: Effects of adrenalectomy on CCD: evidence for differential response of two cell types. *Am J Physiol* 253: F742-52, 1987.
23. Muto S, Yasoshima K, Yoshitomi K, Imai M, Asano Y: Electrophysiological identification of alpha- and beta-intercalated cells and their distribution along the rabbit distal nephron segments. *J Clin Invest* 86: 1829-39, 1990.
24. Al-Awqati Q, Takito J, Hikita C: Plasticity in the epithelial polarity of H⁺ and HCO₃⁻ transporting proteins. En: Santo NGd, Capasso G, eds. *Acid-Base and Electrolyte Imbalance. Molecular, Cellular and Clinical Aspects*. Naples: Istituto Italiano per gli Studi Filosofici 55-61, 1995.
25. Schuster VL: Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Ann Rev Physiol* 55: 267-88, 1993.
26. Nelson RD, Guo XL, Masood K, Brown D, Kalbrenner M, Gluck S: Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H⁺-ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3541-5, 1992.
27. Brown D, Hirsch S, Bluck S: An H⁺-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature* 331: 622-4, 1988.
28. Gluck SL, Nelson RD, Lee BS, Wang ZQ, Guo XL, Fu JY, Zhang K: Biochemistry of the renal V-ATPase. *J Exp Biol* 172: 219-29, 1992.
29. Alper S, Natole T, Gluck S, Lodich HF, Brown D: Subtypes of intercalated cells in rat kidney duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5429-5433, 1989.
30. Hays SR, Alpern RJ: Apical and basolateral membrane H⁺ extrusion mechanisms in inner stripe of rabbit outer medullary collecting duct. *Am J Physiol* 259: F628-35, 1990.
31. Furuya H, Breyer MD, Jacobson HR: Functional characterization of alpha- and beta-intercalated cell types in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* 261: F377-85, 1991.
32. Schwartz JH, Masino SA, Nichols RD, Alexander EA: Intracellular modulation of acid secretion in rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* 266: F94-F101, 1994.
33. Schwartz GJ, Barasch J, Al-Awqati Q: Plasticity of functional epithelial polarity. *Nature* 318: 368-71, 1985.
34. Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, Holliday LS, Kostrominova T, Lee BS: Biochemical regulation of proton secretion by the vacuolar H⁺-ATPase of renal epithelial cells. In: Santo NGd, Capasso G, eds. *Acid-Base and Electrolyte Imbalance. Molecular, Cellular and Clinical Aspects*. Naples: Istituto Italiano per gli Studi Filosofici 30-42, 1995.
35. Nelson H, Nelson N: The progenitor of ATP synthase was closely related to the current vacuolar H⁺-ATPase. *FEBS Lett* 247: 147-53, 1989.
36. Forgac M: Structure and properties of the coated vesicle (H⁺)-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24: 341-50, 1992.
37. Arai H, Berne M, Terres G, Terres H, Puopolo K, Forgac M: Subunit composition and ATP site labeling of the coated vesicle proton-translocating adenosinetriphosphatase. *Biochem* 26: 6632-8, 1987.
38. Arai H, Terres G, Pink S, Forgac M: Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem* 263: 8796-802, 1988.
39. Wang ZQ, Gluck S: Isolation and properties of bovine kidney brush border vacuolar H⁺-ATPase. A proton pump with enzymatic and structural differences from kidney microsomal H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 265: 21957-65, 1990.
40. Brown D, Hirsch S, Gluck S: Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest* 82: 2114-26, 1988.
41. Satlin LM, Schwartz GJ: Cellular remodeling of HCO₃⁻-secreting cells in rabbit renal collecting duct in response to an acidic environment. *J Cell Biol* 109: 1279-88, 1989.
42. Doucet A, Marsy S: Characterization of K-ATPase activity in distal nephron: stimulation by potassium depletion. *Am J Physiol* 253: F418-23, 1987.
43. Garg LC, Narang N: Ouabain-insensitive K-adenosine triphosphatase in distal nephron segments of the rabbit. *J Clin Invest* 81: 1204-8, 1988.
44. Mujais SK, Chen Y, Battle D: Profile Of H⁺/K⁺ ATPase along the collecting duct. Effect of K deprivation. *Clin Res* 39, 1991.
45. Wingo CS: Active proton secretion and potassium absorption in the rabbit outer medullary collecting duct. Functional evidence for proton-potassium-activated adenosine triphosphatase. *J Clin Invest* 84: 361-5, 1989.
46. Wingo CS, Armitage FE: Rubidium absorption and proton secretion by rabbit outer medullary collecting duct via H-K-ATPase. *Am J Physiol* 363: F849-57, 1992.
47. Growson MS, Shull GE: Isolation and characterization of a cDNA encoding the putative distal colon H⁺, K⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase and mRNA expression in distal colon, kidney, and uterus. *J Biol Chem* 267: 13740-8, 1992.
48. Jaisser F, Coutry N, Farman N, Binder JH, Rossier BC: A putative H⁺-K⁺-ATPase in selectively expressed in surface epithelial cells of rat distal colon. *Am J Physiol* 265: C1080-1089, 1993.
49. Del Castillo JR, Rajendran VM, Binder HJ: Apical membrane localization of ouabain-sensitive K⁺-activated ATPase activities in rat distal colon. *Am J Physiol* 261: G1005-11, 1991.
50. Younes-Ibrahim M, Buffin-Meyer B, Cheval L, Masry S, Barlet-Bas C, Doucet A: Renal H, K-ATPase. En: Santo NGd, ed. *Acid-Base and Electrolyte Imbalance. Molecular, Cellular and Clinical aspects*. Naples: Istituto Italiano per gli Studi Filosofici, 1995.
51. Benos DJ, Awayda MS, Ismailov II, Johnson JP: Structure and function of amiloride-sensitive Na⁺ channels. *J Membrane Biol* 143: 1-8, 1995.
52. Garty H, Benos DJ: Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev* 68: 309-73, 1988.
53. Mohrmann NM, Cantiello HF, Ausiello DA: Inhibition of epithelial Na⁺ transport by atriopeptin, protein kinase c, and pertussis toxin. *Am J Physiol* 253: F372-6, 1987.
54. Garty H: Mechanisms of aldosterone action in tight epithelia. *J Membrane Biol* 90: 193-205, 1994.
55. Garty H, Edelman IS, Lindemann B: Metabolic regulation of apical sodium permeability in toad urinary bladder in the presence and absence of aldosterone. *J Membr Biol* 74: 15-24, 1983.
56. Kleyman TR, Smith PR, Benos DJ: Characterization and localization of epithelial Na⁺ channels in toad urinary bladder. *Am J Physiol* 266: C1105-11, 1994.
57. Lewis SA, De Moura JL: Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature* 297: 685-8, 1982.
58. Marunaka Y, Eaton DC: Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels. *Am J Physiol* 260: C1071-84, 1991.
59. Garty H: Molecular properties of epithelial, amiloride blockable Na⁺ channels. *FASEB J* 8: 522-528, 1994.
60. Bastani B, Harragsim L, Gluck S, Siamopoulos KC: Lack of H-ATPase in distal nephron causing hypokalemic distal RTA in a patient with Sjögren's syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 10: 908-913, 1995.
61. Konishi K, Hayashi M, Saruta T: Renal tubular acidosis with autoantibody directed to renal collecting-duct cells [letter]. *N Engl J Med* 331: 1593-4, 1994.
62. Wallner E, Sankaran K, Kanwar Y, Battle DC: Functional and immunocytochemical evidence for a vacuolar plasma membrane H⁺-ATPase in rat thymocytes. *Clin Res (AFCR Meeting)* 40: P181A, 1992.

63. Sato S, Zhu XL, Sly WS: Carbonic anhydrase isozymes IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6073-6, 1990.
64. Cummings WA, Ohlsson A: Intracranial calcification in children with osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Radiology* 157: 325-327, 1985.