

MODELOS EXPERIMENTALES EN NEFROLOGÍA

LO QUE EL NEFRÓLOGO DEBERÍA CONOCER (1ª entrega)



Liliana A. Monasterolo¹, Laura Trumper²

*Las ciencias aplicadas no existen,
sólo las aplicaciones de la ciencia.*

Louis Pasteur

El médico dedicado a la clínica enfrenta situaciones problemáticas, agudas o crónicas, que debe resolver en base a conocimientos previos derivados de la investigación científica, tanto básica como clínica. Este acontecer práctico de los hechos induce a asumir una separación cronológica, ambiental y profesional "claramente" delimitada entre la práctica clínica y la investigación científica: primero el investigador evalúa una hipótesis en el laboratorio y luego el médico aplica ese conocimiento para resolver una situación en el hospital. Obviamente, no se aplicará ningún método en la clínica sin su previa investigación y validación. Sin embargo, en ese ir y venir entre la mesada y el paciente, ese límite entre lo básico y lo clínico se va desdibujando, o al menos sería conveniente que así ocurriera. El abordaje y estudio de un problema inherente a un tipo de paciente puede surgir por parte del investigador o el médico, en el laboratorio o en el hospital. La interacción entre los profesionales de la investigación básica y de la clínica, en los distintos ámbitos, ofrece una posibilidad única de optimización de recursos. De esta manera, se abre paso a la metodología de la investigación científica, en un marco de creatividad, planteo de necesidades y búsqueda del bienestar del ser humano y de la sociedad.

Toda ciencia comprende el estudio de un área determinada del conocimiento. Este conocimiento se nutre de la observación de hechos, interrogantes, explicaciones que el intelecto humano formula y plantea para aproximarse a la comprensión del universo que lo rodea. Estos planteos son asintóticos a la realidad, es decir, que el estudio de una ciencia debe abordarse desde una perspectiva de transformación constante que surge del flujo bidireccional producto-proceso.

El objetivo principal de la investigación científica es lograr el entendimiento y, de ser necesario y posible, el control de cierta

parte del universo, que es lo que se asume como sistema real. Para alcanzar esta meta se recurre a una abstracción, una operación intelectual mediante la que se logra la representación de las relaciones entre algunas cantidades o cualidades del sistema real. Esta representación es lo que entendemos como modelo (Jeffers, 1982).

La investigación en ciencias básicas es crucial para el conocimiento de la patogenia de las enfermedades y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El disparador de la realización de un experimento es la formulación de una pregunta. El valor de los hallazgos que surjan a partir de un experimento dependerá de las características de esta pregunta y de la posibilidad de su reformulación a partir de las observaciones e interpretación de resultados que se vayan obteniendo durante la fase experimental. El planteo puede basarse en un cuestionamiento acerca del paciente, o el esclarecimiento de aspectos fisiológicos básicos. El avance en este terreno puede llevar a nuevas propuestas inherentes a la terapéutica.

En ambos casos el objetivo final debería poder llevarnos nuevamente al paciente con la descripción de su enfermedad, el mejoramiento en su cuidado y la propuesta de opciones terapéuticas para reducir la morbimortalidad. Es decir que, idealmente, el proceso debería comenzar y terminar en el paciente, pero la representación necesaria para responder a los interrogantes que surgen del proceso de investigación requiere la utilización de modelos experimentales.

En esta primera entrega, abordaremos la utilización de los modelos "in vivo" en los estudios de función renal.

MODELOS "IN VIVO" DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

Su utilidad en el abordaje de la fisiología y la patología renal

"In vivo" (del latín, dentro de lo vivo)

El uso de modelos "in vivo" hace referencia a experimentos que se realizan dentro de un organismo vivo e intacto. Los esfuerzos que se han realizado para entender la fisiología humana se han apoyado extensamente en estos modelos. Los mamíferos, por su fisiología parecida a los humanos, y específicamente los roedores, han tenido un lugar de supremacía, por más de un siglo, como modelo de enfermedades humanas.

1. Investigadora CONICET-UNR.

2. Investigadora CIC-UNR.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Santa Fe, Rep. Argentina.

Correspondencia: Laura Trumper ltrumper@fbioyf.unr.edu.ar
Liliana A. Monasterolo lmonaste@fbioyf.unr.edu.ar

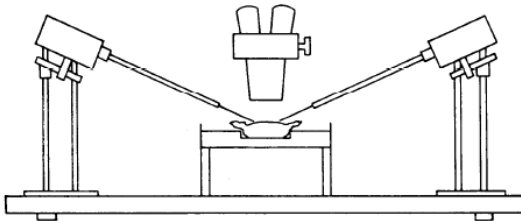


Figura 1. Esquema del montaje de la rata para estudios de micropunción y microperfusión. (Tomado de Shipp et al., 1958).

Como modelo experimental, la rata presenta similitudes con el humano. Además, su tamaño pequeño, y rápido ciclo de reproducción, hacen que su cría sea relativamente sencilla y económica. El extenso uso de modelos en roedores surge a partir de un trabajo pionero en el instituto Wistar en el año 1906, donde se establece a la rata como un modelo definido para el estudio de diversos aspectos de la fisiología. El uso de ratas como modelo experimental ha permitido el avance en la investigación médica en múltiples áreas que incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y trasplante, entre muchas otras. Las ratas son también utilizadas en el desarrollo de drogas, para demostrar su eficacia terapéutica y estudiar sus efectos tóxicos antes de la implementación de los ensayos clínicos (Russell, 2003).

El uso de ratones como animal de experimentación surge algo después y se vio estimulado a partir de la década de los '80 por la facilidad de la manipulación genética de las células madre embrionarias. Esta manipulación genética permitió la creación de los ratones transgénicos. La aplicación de estas técnicas en ratas no ha resultado tan satisfactoria como en ratones.

Un tipo de ratón transgénico que se utiliza frecuentemente es el ratón *knock-out*. En estos animales se produce la delección de un determinado gen de interés y en caso que esta delección no resulte letal, se analiza el fenotipo del animal resultante. Estos modelos tienen la limitación de que los animales *knock-out* pueden desarrollar mecanismos compensatorios que enmascaren la falta de la proteína en estudio (Lien et al., 2003). Un ejemplo del uso de estos modelos lo constituye el aporte al conocimiento de las funciones fisiológicas de las aquaporinas renales a través del estudio de animales *knock-out* para distintas aquaporinas (Verkman, 2008).

En años recientes se han desarrollado lo que se conoce como ratones *knock-in*. En estos lo que se hace es introducir un gen que codifica para una proteína que resulta de interés. Algunos estudios, utilizando este modelo, han aportado al

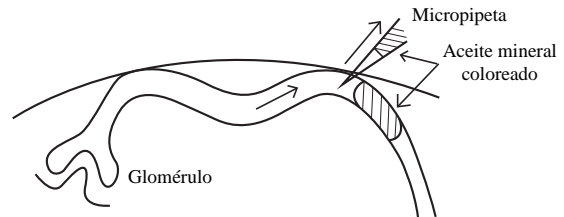


Figura 2. Técnica de micropunción con recolección en flujo libre. (Tomado de Malnic and Marcondes, 1979).

conocimiento, por ejemplo, de los factores renales que contribuyen al desarrollo de hipertensión (Iwamoto and Kita, 2006).

Hay una serie de experimentos *in vivo* que han sido esenciales para el conocimiento de la fisiología y la patología renal. Este es el caso de los experimentos de micropunción. En general, los conceptos actuales sobre filtración glomerular derivan de los trabajos de Brenner (Brenner et al., 1971). Estos trabajos se vieron favorecidos y estimulados por el descubrimiento en Munich de una cepa mutante de ratas Wistar que poseen glomérulos en la superficie del riñón que resultan muy accesibles a la micropunción. Estas ratas son las que se conocen con el nombre de Wistar-Munich.

Tanto las técnicas de micropunción como el desarrollo de métodos para medir presiones hidrostáticas en pequeños compartimientos resultaron ser de importancia fundamental en los estudios de filtración glomerular, ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas (Malnic and Marcondes, 1979).

Brevemente, mediante las técnicas de micropunción, es posible realizar estudios sobre nefrones individuales. Estos estudios derivan del trabajo precursor de Richards y sus colaboradores en el año 1924 (Gottschalk et al., 1987). Básicamente, lo que se hace es exponer un riñón, inmovilizarlo y observarlo directamente con un microscopio estereoscópico con aumentos que pueden ir de los 100x a los 250x. Estos estudios se realizaron originalmente en anfibios, ya que poseen glomérulos y túbulos relativamente grandes (Shipp et al., 1958). Fue justamente en esta especie que se logró recolectar el fluido del interior de la cápsula de Bowman y se demostró que su contenido es idéntico al del plasma, excepto por la concentración de proteínas que resultó prácticamente igual a cero. Esto dio origen al concepto de ultrafiltrado del plasma (Malnic and Marcondes, 1979).

En la década del '40 se comienzan a usar mamíferos, fundamentalmente ratas. La micropunción y microperfusión de glomérulos y túbulos se logra mediante pipetas de vidrio con puntas afiladas en bisel, de apenas 5 a 10 μ de diámetro. Se realiza con ratas anestesi-

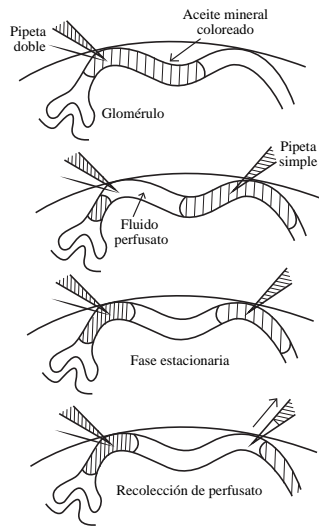


Figura 3. Técnica de microperfusión en estado estacionario. (Tomado de Malnic and Marcondes, 1979).

siadas que se colocan sobre una manta termoregulada a 37°C. Se expone el riñón a través de una incisión lateral. Se lo ilumina con una luz fría, a través de una fibra óptica, y mediante un microscopio estereoscópico es posible visualizar túbulos y glomérulos de la corteza renal (Figura 1). Se trabaja con pipetas para inyección y otras para recolección de muestras. Estas pipetas van montadas sobre micromanipuladores que le permiten al experimentador la guía y el movimiento fino de las mismas. La punta de la pipeta se rellena con aceite mineral teñido con un colorante, como Sudan black, para su mejor identificación. Siguiendo esta metodología, se pueden realizar varios tipos de experimentos, que se describen a continuación (Malnic and Marcondes, 1979):

- **Técnica de micropunción con recolección en flujo libre.** En este caso se inyecta en un túbulo una pequeña cantidad de aceite mineral teñido con *Sudan black*, como se muestra en la Figura 2. Se aspira el fluido tubular con la pipeta de modo de mantener la columna de aceite en su sitio. Para que la columna de fluido tubular no desplace la columna de aceite, la velocidad de aspiración debe ser igual al ritmo de flujo. De esta manera, puede determinarse la velocidad de flujo a tiempo real.
- **Técnica de microperfusión.** La microperfusión es utilizada para estudiar las propiedades del epitelio tubular independientemente de la llegada de fluido por ultrafiltración. Dentro de esta metodología se encuentran las técnicas de flujo libre o estacionario. Esta última metodología es también conocida como técnica de "stop flow". Como se esquematiza en la Figura 3, se inyecta una columna de aceite con el colorante en un túbulo, y luego, por dentro de esta columna se inyecta un perfusato que se deja un tiempo en contacto con las paredes del túbulo, luego del cual se lo aspira y se lo analiza.

El advenimiento de estas técnicas permite la medición de la presión dentro de un túbulo proximal. Mediante una pipeta se intro-

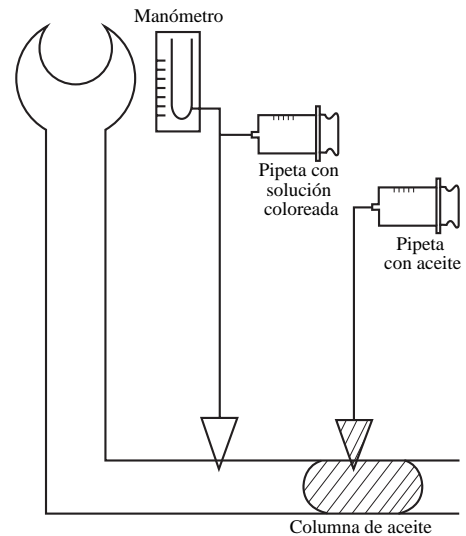


Figura 4. Esquema de la medición de la presión intratubular. (Tomado de Malnic and Marcondes, 1979).

duce en un asa de un túbulo contorneado proximal una columna de aceite viscoso teñido con *Sudan black*, visible al microscopio (Figura 4). Esa columna de aceite debe ser lo suficientemente extensa como para que la presión de filtración de ese nefrón no pueda moverla. Es decir, que la presión de ultrafiltración no debe vencer la viscosidad del aceite. Se introduce luego una segunda pipeta, conectada a una jeringa, que a su vez está conectada a un manómetro. Esta jeringa contiene una solución coloreada, para facilitar su visualización. El experimentador no debe permitir que esa solución entre al túbulo o que el fluido tubular entre a la pipeta. Se registra entonces, con el manómetro la presión que se debe ejercer para que la columna de líquido coloreado permanezca inmóvil. Esta será la presión hidrostática del túbulo. Con este valor y la medición de la presión oncótica sistémica se puede calcular la presión efectiva de filtración (PEF) mediante la fórmula: $PEF = \Delta P - \Delta \pi$, donde ΔP es el gradiente de presión hidrostática transcápilar y $\Delta \pi$ es el gradiente de presión coloidosmótica transcápilar.

Estas técnicas han sido de gran utilidad, por ejemplo, para esclarecer aspectos de la secuencia de eventos que llevan a la disminución de la velocidad de filtración glomerular en la insuficiencia renal aguda (IRA). Tomemos como ejemplo un trabajo (Tanner et al., 1973) donde se combinan varias técnicas "in vivo" para estudiar los efectos de la oclusión de la arteria renal sobre la función renal. Estos autores trabajaron con ratas a las que se les provocó la isquemia y luego reperfusión por la colocación y posterior retiro de un clamp en la arteria renal. A todas las ratas se les introdujo un catéter en la arteria femoral, otro en la vena femoral, y un catéter en cada uréter. Luego de preparar a los animales y exponer el riñón izquierdo para las técnicas de micropunción y microperfusión, se realizaron varios tipos de experimentos. Por un lado se midió la velocidad de filtración glomerular en un nefrón único. Para esto se inyectó ^{14}C -inulina por la vena femoral y mediante micropunción se recolectó el fluido de un túbulo proximal.

Se calculó la velocidad de filtración de cada nefrón estudiado teniendo en cuenta la relación entre la concentración de inulina en el fluido tubular y la concentración plasmática de inulina. Por otro lado, se midió la velocidad de filtración glomerular total mediante técnicas convencionales de *clearance*. Determinaron el *clearance* de creatinina y el de ^{14}C -inulina. Los autores encontraron una discrepancia entre el descenso del filtrado medido en el riñón entero y el medido en nefrones únicos. Aunque existen controversias alrededor del valor de la medición de la filtración en nefrón único (Wright and Giebisch, 1972), a partir de sus resultados le asignan un rol a los factores tubulares como el escape retrógrado y la obstrucción tubular en el descenso del filtrado glomerular en la IRA. Para corroborar el fenómeno del escape retrógrado realizaron experimentos de microinyección de ^{14}C -inulina en túbulo proximal y detectaron la aparición de ^{14}C -inulina en la orina recogida a través de los catéteres insertos en los uréteres provenientes de ambos riñones. La aparición de ^{14}C -inulina en el uréter del riñón que no es sometido a microinyección indica el escape retrógrado de inulina a través de un epitelio dañado. La obstrucción tubular y el escape retrógrado como factores

que contribuyen al descenso del filtrado en IRA fue comprobado por numerosos estudios *"in vivo"* realizados con posterioridad (Arendshorst et al., 1975; Donohoe et al., 1978).

Una de las grandes ventajas del uso de modelos *"in vivo"* es que permiten estudiar simultáneamente diversos componentes que contribuyen a la instalación y desarrollo de un cuadro patológico. Un ejemplo de esto es el caso de la IRA de origen isquémico o tóxico, donde los modelos *"in vivo"* han permitido evaluar los componentes tubulares, vasculares e inflamatorios en forma simultánea.

En resumen, los modelos *"in vivo"* que utilizan animal intacto, por su complejidad, resultan los que más adecuadamente representan la respuesta global del paciente para la evaluación de mecanismos fisiológicos y factores involucrados en diversas patologías. El desarrollo de modelos de enfermedades, como ratones transgénicos, clampeo y liberación de arteria renal como modelo de IRA, administración de estreptozotocina como modelo de diabetes, etc., permite la constante investigación de mecanismos y posibles estrategias terapéuticas. Los estudios subsecuentes de la investigación básica definen la factibilidad de evaluar esas estrategias propuestas en ensayos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arendshorst WJ, Finn WF and Gottschalk CW (1975) Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circ Res* 37:558-568.
2. Brenner BM, Troy JL and Daugharty TM (1971) The dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. *J Clin Invest* 50:1776-1780.
3. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB and Levinsky NG (1978) Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations. *Kidney Int* 13:208-222.
4. Gottschalk, Carl W.;Giebisch, Gerhard H.;Berliner, Robert W.(1987) .Renal Physiology: people and ideas. American Physiological Society. Micropuncture and microperfusion pp 100-129
5. Iwamoto T and Kita S (2006) Hypertension, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, and Na^+ , K^+ -ATPase. *Kidney Int* 69:2148-2154.
6. Jeffers, John NR (1982) Modelling. Eds. G. Dunnet y C. Gimmingham. Chapman and Hall Ltd, USA
7. Lien YH, Lai LW and Silva AL (2003) Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci* 74:543-552.
8. Malnic G and Marcondes M (1979) Fisiología renal. Sao Paulo Editora Pedagógica e Universitaria. 2da Edición
9. Russell JC (2003) Of mice and men, rats and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 59:810-811.
10. Shipp JC, Hanenson IB, Windhager EE, Schatzmann HJ, Whitembury G, Yoshimura H and Solomon AK (1958) Single proximal tubules of the Necturus kidney; methods for micropuncture and microperfusion. *Am J Physiol* 195:563-569.
11. Tanner GA, Sloan KL and Sophasan S (1973) Effects of renal artery occlusion on kidney function in the rat. *Kidney Int* 4:377-389.
12. Verkman AS (2008) Dissecting the roles of aquaporins in renal pathophysiology using transgenic mice. *Semin Nephrol* 28:217-226.
13. Wright FS and Giebisch G (1972) Glomerular filtration in single nephrons. *Kidney Int* 1:201-209.