

MODELOS EXPERIMENTALES EN NEFROLOGÍA. MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

Laura Trumper¹, Liliana A. Monasterolo²

Resumen

El modelo de riñón aislado y perfundido brinda la posibilidad de analizar la función renal bajo condiciones definidas y sin la intervención de factores sistémicos. Este modelo consiste en aislar al riñón de la vasculatura sistémica, y perfundirlo a través de la arteria renal con un medio de perfusión con características similares al plasma o a la sangre, conservando las características anatómicas, bioquímicas y funcionales del riñón intacto. Esto posibilita circunscribir factores extrarrenales que pueden complicar la interpretación de la información obtenida con experimentos realizados *in vivo*. Además, la utilización del órgano aislado permite el estudio de la función renal bajo condiciones en las que el operador puede modificar las variables a analizar de manera controlada. En el presente artículo se revisa la técnica de preparación, los criterios de viabilidad, las principales características hemodinámicas y tubulares, y las aplicaciones del modelo.

Abstract

The isolated perfused kidney model provides the ability to analyze the renal function under defined conditions without the intervention of systemic factors. In this model, the kidney is isolated from the systemic vasculature, and infused through the renal artery with a perfusion medium with the plasma or blood characteristics. The anatomical, biochemical and functional characteristics of the intact kidney is preserved. This allows to circumscribe extrarenal factors that can complicate the interpretation of the *in vivo* experiments. Moreover, the use of the isolated organ allows the study of renal function under conditions in which the operator can modify the analyzed variables in a controlled manner.

In this article, the technique of preparation, viability criteria; and the main hemodynamic and tubular features and applications of the model are reviewed.

NEFROLOGÍA ARGENTINA 2015;13(2):97-100

La posibilidad de analizar la función renal bajo condiciones definidas y sin la intervención de factores sistémicos, llevó a los investigadores al uso de preparaciones conocidas como el modelo de riñón aislado y perfundido. Básicamente, este modelo consiste en aislar al riñón de la vasculatura sistémica, con las alternativas de removerlo o no del animal, y perfundirlo a través de la arteria renal con un medio de perfusión con características similares al plasma o a la sangre. A lo largo de los años se han ido introduciendo variaciones a esta técnica con el fin de lograr una mejor viabilidad de las preparaciones.

En este modelo, el órgano preserva importantes características anatómicas, bioquímicas y funcionales del riñón intacto (Maack, 1986). Se logra, además circunscribir factores extrarrenales que pueden complicar la interpretación de la información obtenida con los experimentos realizados *in vivo*. Por lo tanto, las respuestas observadas serán específicas del riñón y la interpretación de los datos resultará más precisa (Bekersky, 1983). Además, la utilización del órgano aislado permite el estudio de la función renal bajo condiciones en las que el operador puede modificar las variables a analizar (v.g. composición de la solución nutritiva, flujo o presión de perfusión) de manera controlada (Maack, 1986). Los primeros reportes de este modelo se remontan al año 1876 cuando Bunge y Schmiedeberg utilizan riñones aislados y perfundidos de perro para estudiar la capacidad biosintética del órgano (Chang et al., 2013). Los primeros experimentos se realizaron en animales grandes, dada la necesidad de contar con mate-

rial suficiente para la realización de los estudios. Se han realizado experimentos de riñón aislado en diversas especies de mamíferos, como el perro (Nizet, 1981), conejo (Li et al., 1992), cobayo (Barac-Nieto et al., 1991) y cerdo (Moore et al., 1992). Sin embargo, la mayoría de los estudios fueron hechos en preparaciones de riñón aislado y perfundido de rata. La selección de este animal de investigación se justifica, principalmente, por su tamaño adecuado, que permite el logro del complejo procedimiento quirúrgico; y por su costo relativamente conveniente y disponibilidad en el laboratorio. Uno de los primeros trabajos se realizó en el año 1959. En ese año, los autores, introducen el uso del riñón aislado y perfundido de rata para el estudio de la regulación del flujo renal (Weiss et al., 1959). A partir de esa fecha, el modelo se ha usado satisfactoriamente para una variedad de estudios bioquímicos, fisiológicos y farmacológicos. En los últimos años, este modelo se ha implementado también en ratones (Jeansson et al., 2006). Se trata de una técnica relativamente sencilla, pero que requiere cierta experiencia por parte del investigador ya que la manipulación excesiva puede llevar a vasoconstricción, hipoxia y en general a una pobre función renal.

La preparación del riñón aislado y perfundido consta del órgano completo aislado de la circulación sistémica. Luego de la anestesia, se inserta un catéter en la vena femoral, a través del cual se administra una solución que contiene manitol para aumentar la diuresis y así facilitar la posterior cateterización del uréter. Se realiza una incisión para exponer la cavidad abdominal. Se coloca una cánula en la vena cava inferior, que es la que servirá para permitir el drenaje del efuyente venoso a un reservorio. La mayoría de los investigadores trabajan con el riñón derecho, dada la disposición anatómica de la arteria mesentérica, que permite la cateterización de la arteria renal derecha desde la arteria mesentérica sin interrupción del flujo al riñón (Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1967). Apenas se coloca el catéter en la arteria mesentérica, se comienza con la perfusión y luego se avanza hacia la arteria renal.

1. Carrera de Investigador de CONICET.

2. CONICET.

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

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

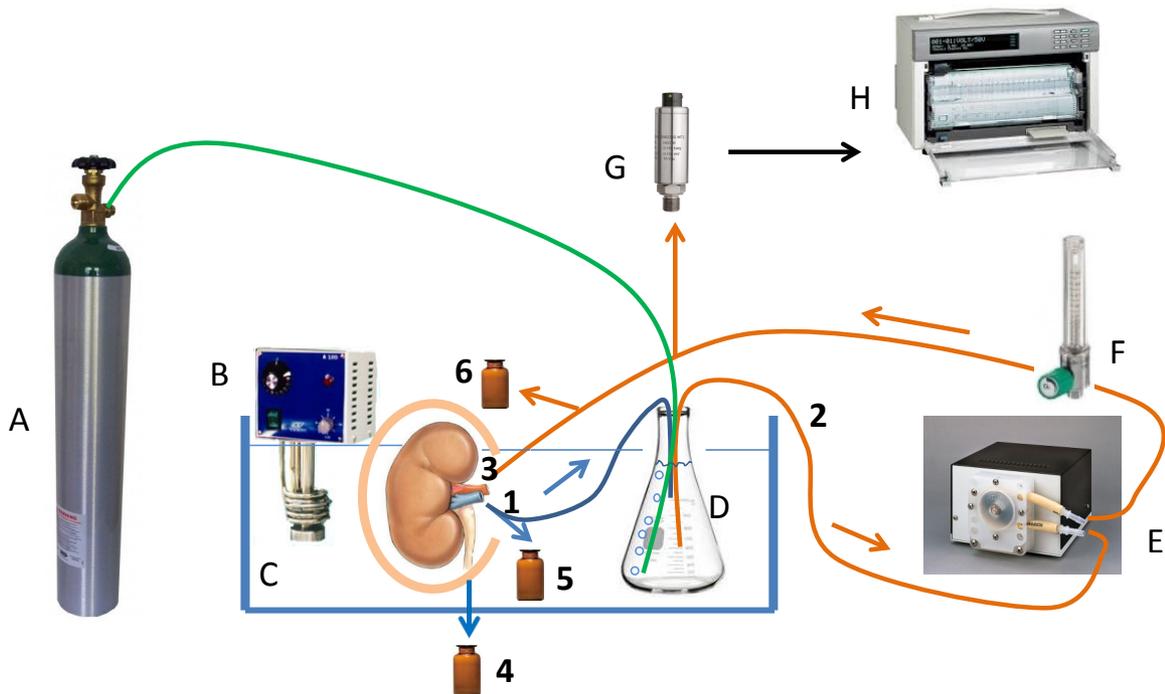


Figura 1: Esquema de experimento de riñón aislado y perfundido:

I. Instrumental: A: tubo de carbógeno. B: cabezal termostático. C: baño termostático. D: reservorio de medio de perfusión. E: bomba peristáltica. F: flujímetro. G: sensor de presión. H: registrador.

II. Sistema de perfusión y recolección de muestras: 1: efluente venoso que drena en el reservorio. 2: tubuladura de succión que lleva medio de perfusión hacia la bomba peristáltica. 3: entrada del medio al órgano por vía arterial. 4: recolección de muestra de orina. 5: recolección de muestra venosa. 6: recolección de muestra arterial.

Usualmente, el riñón con los vasos y uréter cateterizados es removido del animal y colocado en una cámara de contención que permanece en un sistema termostático. De allí, que esta técnica forme parte de los llamados experimentos *ex vivo*.

En la **Figura 1** se presenta un esquema de este modelo. La perfusión se lleva a cabo mediante una bomba peristáltica, manteniendo un flujo constante que es medido por un flujímetro dispuesto en la vía arterial. El mantenimiento del flujo de perfusión puede realizarse manualmente o mediante control computarizado, según el equipamiento disponible. La presión de perfusión se evalúa con un transductor de presión y es registrada continuamente. Se permite el drenaje del efluente venoso en el reservorio del medio de perfusión, lográndose así un sistema de circulación cerrado. En el caso de que el diseño así lo requiera, se realiza una circulación abierta o técnica *single-pass*, con lo que se garantiza la estabilidad de la composición del medio de perfusión, independientemente del metabolismo y de la excreción renal. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la circulación abierta consume grandes cantidades de perfusato, y puede resultar muy costoso si se trabaja con coloides como la albúmina.

Para evaluar la factibilidad de un diseño experimental con este modelo, es necesario determinar la viabilidad de la preparación en las condiciones y durante el tiempo seleccionados. Se puede recurrir a distintos criterios para testear la viabilidad del riñón aislado. Los indicadores que se consideran con mayor fre-

cuencia son cambios en parámetros funcionales como: presión de perfusión, flujo de perfusión, velocidad de filtración glomerular, reabsorción de glucosa y electrolitos, consumo de oxígeno y capacidad de concentración de la orina (Epstein et al., 1982; Bekersky, 1983). Se considera que el experimento es viable si los parámetros se encuentran dentro de valores aceptables, por ejemplo: presión de perfusión por debajo de 120 mmHg, flujo de perfusión por encima de 20 ml/min, y reabsorción de glucosa por encima del 93% (Cox et al., 1991). Estos valores de referencia pueden variar según el grupo de investigación, basándose fundamentalmente en los objetivos para los cuales se diseñará el experimento.

El riñón aislado se perfunde, generalmente, con una solución Ringer-Krebs, burbujeada con una mezcla O₂-CO₂ (19:1, carbógeno), a la que se adiciona albúmina bovina como agente oncótico, aunque algunos autores han reportado el uso del polímero sintético dextrans con esta finalidad (Bekersky, 1983). El agregado de un agente oncótico es sumamente importante, ya que es el que crea la presión coloidosmótica para una adecuada filtración glomerular y la reabsorción tubular de agua y electrolitos. También se agrega una mezcla de aminoácidos como cisteína, glutámico y glicina al medio de perfusión para mejorar la estabilidad de la preparación (Epstein et al., 1982). En la **Tabla 1** se presentan los parámetros funcionales de preparaciones controles perfundidas con albúmina 5%.

Tabla 1. Parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido de rata

Presión de perfusión (mmHg)	92±8
Flujo de perfusión (ml.min ⁻¹)	32 ±6
Velocidad de filtración glomerular (μl.min ⁻¹)	567±89
Flujo de orina (μl.min ⁻¹)	610±210
Excreción fraccional de sodio (%)	8.6±2.6
Reabsorción fraccional de glucosa (%)	94.8±2,5 (Epstein et al., 1982)

Estos valores representan la media±error estándar de 110 determinaciones para cada parámetro (10 riñones aislados, 11 determinaciones por riñón). Tomado de Bekersky, 1983 [referencia #3].

CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS

Para que la preparación sea viable, los flujos de perfusión deben ser altos. Esto se debe a la baja viscosidad del perfusato respecto de la sangre, y a la necesidad de mantener una oxigenación adecuada del órgano. Sin embargo, debe considerarse que en estas condiciones se somete al órgano a un importante lavado medular, lo que disminuye su capacidad para concentrar la orina (Maack, 1980). El alto flujo de perfusión, asociado a una velocidad de filtración glomerular disminuida respecto a la del animal intacto, resulta en una fracción de filtración excesivamente baja, que no permite el adecuado aumento de la presión oncótica peritubular, con la consecuente disminución en la capacidad reabsortiva del nefrón proximal. Algunos investigadores salvaron esta dificultad aumentando la presión oncótica del medio de perfusión, mediante el incremento de la concentración de albúmina (Maack, 1986). Las variaciones en la concentración de albúmina utilizada resultan en variaciones en la velocidad de filtración glomerular. Con concentraciones de albúmina elevadas, se logrará una velocidad de filtración baja, pero esto resultará en una adecuada reabsorción tubular de sodio. Las disminuciones en la concentración de albúmina llevan a la obtención de velocidades de filtración glomerular semejantes a las observadas en el animal intacto, pero el preparado muestra una marcada natriuresis y una gran inestabilidad. El investigador debe optar entre un preparado inestable, natriurético pero con valores normales de filtrado glomerular o un preparado estable con una buena reabsorción de sodio, pero con una baja velocidad de filtración glomerular. Para la mayoría de los propósitos esta última opción es la más adecuada (Maack, 1986). Debe considerarse, además, que la baja velocidad de filtración en este modelo puede deberse, en parte, a la ausencia de sustancias presentes en la circulación sistémica con actividad sobre la dinámica glomerular.

Otro de los factores que determinan la velocidad de filtración glomerular es el tono de las arteriolas aferente y eferente. La falta de innervación y/o de los factores vasoconstrictores circulantes contribuye al elevado flujo de perfusión y la relativamente baja velocidad de filtración glomerular. Sin embargo las preparaciones de riñón aislado y perfundido pueden mantener cierto tono vascular. Agentes vasodilatadores clásicos como acetilcolina o bradiquinina son capaces de disminuir la resistencia vascular de la preparación (Maack, 1986). Por otro lado, el factor natriurético auricular puede aumentar el tono de las arteriolas eferentes con el consecuente aumento de la velocidad de filtración glomerular (Camargo et al., 1984).

CARACTERÍSTICAS TUBULARES

En el riñón aislado y perfundido, la reabsorción de glucosa es prácticamente completa, lo que explica la utilidad de este modelo en los estudios de reabsorción y captación de solutos orgánicos. La presión intratubular proximal se encuentra dentro de los límites normales, pero la presión tubular distal está significativamente elevada. Este fenómeno se debe, probablemente, a una disminución en la capacidad reabsortiva del asa de Henle (Maack, 1986). Alcorn et al. reportaron que la principal anomalía morfológica del riñón aislado reside en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, con signos claros de anoxia y degeneración celular (Alcorn et al., 1981). A pesar de estas anomalías, el transporte activo de NaCl en la rama ascendente gruesa no está completamente inhibido, ya que los diuréticos del asa son capaces de provocar una respuesta natriurética en esta preparación (Maack, 1986; Nowicki et al., 1995). Además, la depleción de los niveles de glutatión durante la perfusión podría contribuir a las anomalías morfológicas y funcionales del asa de Henle (Alcorn et al., 1981; Brezis et al., 1984). En este sentido, se ha reportado que el agregado de aminoácidos precursores de la síntesis de glutatión al medio de perfusión estabiliza la función del riñón aislado (Epstein et al., 1982). El túbulo distal es capaz de compensar, al menos en parte, la reabsorción deficiente del asa de Henle; y conserva la capacidad de secretar potasio.

APLICACIONES DEL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

Como hemos señalado, el modelo de riñón aislado y perfundido brinda la ventaja de poder estudiar acciones directas de distintos compuestos, obviando la influencia de la innervación y de la circulación sistémica. Un ejemplo lo constituye el estudio de los efectos de liposacárido como modelo de endotoxemia, en el modelo de riñón aislado. En estos experimentos, lipopolisacárido no provoca efectos directos sobre el órgano aislado, aun cuando se perfunde al riñón a una concentración que provoca disminución de la velocidad de filtración, de la reabsorción de sodio y del contenido renal de potasio *in vivo*. Por lo tanto, se requeriría de la liberación extrarrenal de mediadores para inducir los cambios en la función renal observados durante la endotoxemia *in vivo* (Cohen et al., 1990).

En nuestro laboratorio, hemos utilizado este modelo para demostrar efectos directos de dosis tóxicas de paracetamol sobre las funciones tubulares y hemodinámicas. Las alteraciones tubulares se pusieron de manifiesto aún cuando se previnieron las alteraciones hemodinámicas con diversas herramientas farmacológicas (Trumper et al., 1995).

El uso de este modelo permite alcanzar concentraciones tóxicas mayores que las toleradas *in vivo*, tal es el caso de los estudios donde se expone al riñón a altas concentraciones de cadmio evitando los efectos cardiovasculares y la toxicidad en otros órganos que causan estas altas dosis (Diamond et al., 1986). El hecho de

aislar al riñón de la circulación general facilita la identificación de los metabolitos renales de xenobióticos. El modelo de riñón aislado y perfundido ha sido seleccionado por muchos autores para evaluar la contribución de este órgano en el metabolismo de distintas drogas y compuestos. En estos experimentos, el metabolismo de la droga se determina en base a la concentración del/los metabolito/s en orina, en muestra arterial del perfusato y en el tejido en función del tiempo transcurrido luego del agregado al medio de dicha droga (Bekersky et al., 1980).

Este modelo resulta particularmente útil para acceder a un conocimiento, al menos inicial, acerca de los sitios y mecanismos globales de acción de agentes vasoactivos. La simplicidad con que puede manipularse experimentalmente el tono vascular renal inicial permite la evaluación de efectos vasculares de drogas en condiciones de vasodilatación o vasoconstricción extre-

ma (Maack, 1986; Frolich y Yoshizawa, 1987; Schic y Malik, 1990). En nuestro laboratorio, hemos observado la capacidad de las benzodiazepinas, diazepam y clonazepam de relajar la vasculatura renal precontraída con altas concentraciones de noradrenalina (Monasterolo et al., 1995); y que dicha vasodilatación es inhibible por el antagonista flumazenil (Monasterolo et al., 2002).

El modelo de riñón aislado y perfundido sigue siendo de utilidad en la actualidad (Jia et al., 2013; Jeansson et al., 2009). Es un modelo útil tanto para estudiar las funciones del riñón como para ser utilizado como modelo de procesos patológicos, para el estudio de productos farmacéuticos (Raj et al., 2012) y para analizar problemas relacionados con la viabilidad del órgano en distintas soluciones de preservación en situaciones de trasplante (Lindell et al., 2011).

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcorn D, Emslie KR, Ross BD, Ryan GB and Tange JD (1981) Selective distal nephron damage during isolated kidney perfusion. *Kidney Int* 19:638-647.
2. Barac-Nieto M, Dowd TL, Gupta RK and Spitzer A (1991) Changes in NMR-visible kidney cell phosphate with age and diet: relationship to phosphate transport. *Am J Physiol* 261:F153-162.
3. Bekersky I (1983) Use of the isolated perfused kidney as a tool in drug disposition studies. *Drug Metab Rev* 14:931-960.
4. Bekersky I, Fishman L, Kaplan SA and Colburn WA (1980) Renal clearance of salicylic acid and salicylic acid in the rat and in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 212:309-314.
5. Brezis M, Rosen S, Silva P and Epstein FH (1984) Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney Int* 25:65-72.
6. Camargo MJ, Kleinert HD, Atlas SA, Sealey JE, Laragh JH and Maack T (1984) Ca-dependent hemodynamic and natriuretic effects of atrial extract in isolated rat kidney. *Am J Physiol* 246:F447-456.
7. Cohen JJ, Black AJ and Wertheim SJ (1990) Direct effects of endotoxin on the function of the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int* 37:1219-1226.
8. Cox PG, Moons WM, Russel FG and van Ginneken CA (1991) Renal handling and effects of S(+)-ibuprofen and R(-)-ibuprofen in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 103:1542-1546.
9. Chang HH, Choong B, Phillips A and Loomes KM (2013) Isolated perfused rat kidney: a technical update. *Exp Anim* 62:19-23.
10. Diamond GL, Cohen JJ and Weinstein SL (1986) Renal handling of cadmium in perfused rat kidney and effects on renal function and tissue composition. *Am J Physiol* 251:F784-794.
11. Epstein FH, Brosnan JT, Tange JD and Ross BD (1982) Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. *Am J Physiol* 243:F284-292.
12. Frolich JC and Yoshizawa M (1987) Renal vascular effects of leukotriene C4 in the isolated perfused kidney of the rat. *Br J Pharmacol* 92:311-318.
13. Jeansson M, Björck K, Tenstad O and Haraldsson B (2009) Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 20:114-122.
14. Jeansson M, Granqvist AB, Nystrom JS and Haraldsson B (2006) Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice. *Diabetologia* 49:2200-2209.
15. Jia L, Li X, Shao C, Wei L, Li M, Guo Z, Liu Z and Gao Y (2013) Using an isolated rat kidney model to identify kidney origin proteins in urine. *PLoS One* 8:e66911.
16. Li T, Croce K and Winquist RJ (1992) Vasoconstrictor and vasodilator effects of serotonin in the isolated rabbit kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 263:928-932.
17. Lindell SL, Williams N, Brusilovsky I and Mangino MJ (2011) Mouse IPK: A Powerful Tool to Partially Characterize Renal Reperfusion and Preservation Injury. *Open Transplant J* 5:15-22.
18. Maack T (1980) Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 238:F71-78.
19. Maack T (1986) Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int* 30:142-151.
20. Monasterolo LA, Ochoa JE, Trumper L and Elias MM (1995) Vascular and tubular actions of diazepam in isolated and perfused rat kidney. *Eur J Pharmacol* 276:201-205.
21. Monasterolo LA, Trumper L and Elias MM (2002) Reversal of benzodiazepine-induced renal vasculature relaxation with flumazenil. *Eur J Pharmacol* 449:155-158.
22. Moore KP, Taylor GW, Gove C, Wood J, Tan KC, Eason J and Williams R (1992) Synthesis and metabolism of cysteinyl leukotrienes by the isolated pig kidney. *Kidney Int* 41:1543-1548.
23. Nishiitsutsuji-Uwo JM, Ross BD and Krebs HA (1967) Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J* 103:852-862.
24. Nizet A (1981) Influence of uranyl nitrate upon tubular reabsorption and glomerular filtration in blood perfused isolated dog kidneys. *Pflugers Arch* 391:296-300.
25. Nowicki S, Ochoa EJ, Levin G and Elias MM (1995) Intrarenal dopamine participation in frusemide diuretic and natriuretic responses to frusemide. *J Auton Pharmacol* 15:159-168.
26. Raj CD, Shabi MM, Jipnomon J, Dhevi R, Gayathri K, Subashini U and Rajamanickam GV (2012) Terminalia arjuna's antioxidant effect in isolated perfused kidney. *Res Pharm Sci* 7:181-188.
27. Schic E and Malik KU (1990) Effect of protein kinase C inhibitors on the actions of phorbol esters on vascular tone and adrenergic transmission in the isolated rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 253:497-507.
28. Trumper L, Monasterolo LA, Ochoa E and Elias MM (1995) Tubular effects of acetaminophen in the isolated perfused rat kidney. *Arch Toxicol* 69:248-252.
29. Weiss C, Passow H and Rothstein A (1959) Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol* 196:1115-1118.