

APLICACIÓN DE FLUOROCROMOS IN VIVO PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL, TRAS HIDRONEFROSIS EXPERIMENTAL EN RATAS

In vivo utilization of fluorochromes for the study of renal function after experimental hydronephrosis in rats

Núñez, M.; Núñez, J.; Soler, C.; Cruz, M. S. y Núñez, A.

Unitad de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Animal, Biologia Cel.lular i Parasitologia. Universitat de València.

Recibido: 21 febrero 1989
Aceptado: 22 Septiembre 1989

RESUMEN

Se presenta un nuevo procedimiento para la visualización de la estructura renal, basado en la aplicación "in vivo" de tres fluorocromos: Rodamina 6G0, Fosfina 3R y Tioflavina S, de los que los dos primeros se inyectan por vía yugular con 10 minutos de intervalo entre ambos y el último por vía transureteral en sentido antidrómico. La técnica propuesta permite distinguir, por observación directa mediante microscopía de epifluorescencia, la disposición y situación de los diversos elementos renales, pudiendo distinguir partes vasculares y tubulares, sacando conclusiones sobre el funcionalismo renal en lo referente a estasis venoso, continuidad funcional tubular, posibilidad de paso a través de capilares glomerulares y discriminación de nefronas funcionales, semifuncionales y afuncionales, después de ser inducida (de forma experimental en ratas) una hidronefrosis monolateral por oclusión ureteral de diverso plazo.

Palabras clave: Fluorocromos, Rodamina 6G0, Fosfina 3R, Tioflavina S, Hidronefrosis, Glomérulo, Riñón.

SUMMARY

A new technique for visualizing the renal structure based on the use "in vivo" of three fluorochromes is developed. Two fluorochromes (Rhodamine 6G0 and Phosphine 3R) are injected through yugular pathway

with 10 minutes interval between them, and the third one (Tioflavine S) is injected in the kidney via transureteral. This technique allows to observe directly through epifluorescent microscopy the assay and localization of renal elements, and to obtain conclusions about renal physiology in relation to venous "estasis", tubular functional continuity, flux ability through glomerular capillaries, as well as the discrimination between functional, half-functional or non-functional nephrones after ureteral occlusion experimentally induced of monolateral hydronephrose in rats during increasing periods of time.

Key words: Fluorochromes, Rhodamine 6G0, Phosfine 3R, Tioflavine S, Hydronephrosis, Glomeruli, Kidney.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista morfológico-funcional, la hidronefrosis ha sido estudiada con interés desde hace mucho tiempo, habiéndose realizado ensayos en animales sometidos a un estado de hidronefrosis artificial transitoria o permanente por medio de ligadura ureteral. (Wachi y Alteman, 1970, Wilson, 1975; Craven et al. 1972; Schwartz et al., 1977; Núñez, 1986; Moyano et al., 1987).

Las investigaciones sobre la actividad funcional y la morfología estructural renal se han

venido desarrollando por estudios clínicos y técnicas histológicas clásicas. No obstante, también se han desarrollado técnicas fisiológicas de cierta complicación, aplicadas a cada caso en particular, entre las que cabe destacar las microesferas radioactivas para estudios de cambios hemodinámicos e, indirectamente, para recuento glomerular (Chevalier, 1983). Un nuevo método para visualizar vasos aferentes, eferentes y capilares glomerulares *in vivo*, es el basado en la producción de hidronefrosis post-isquémica a fin de provocar la destrucción del sistema vascular renal preservando porciones

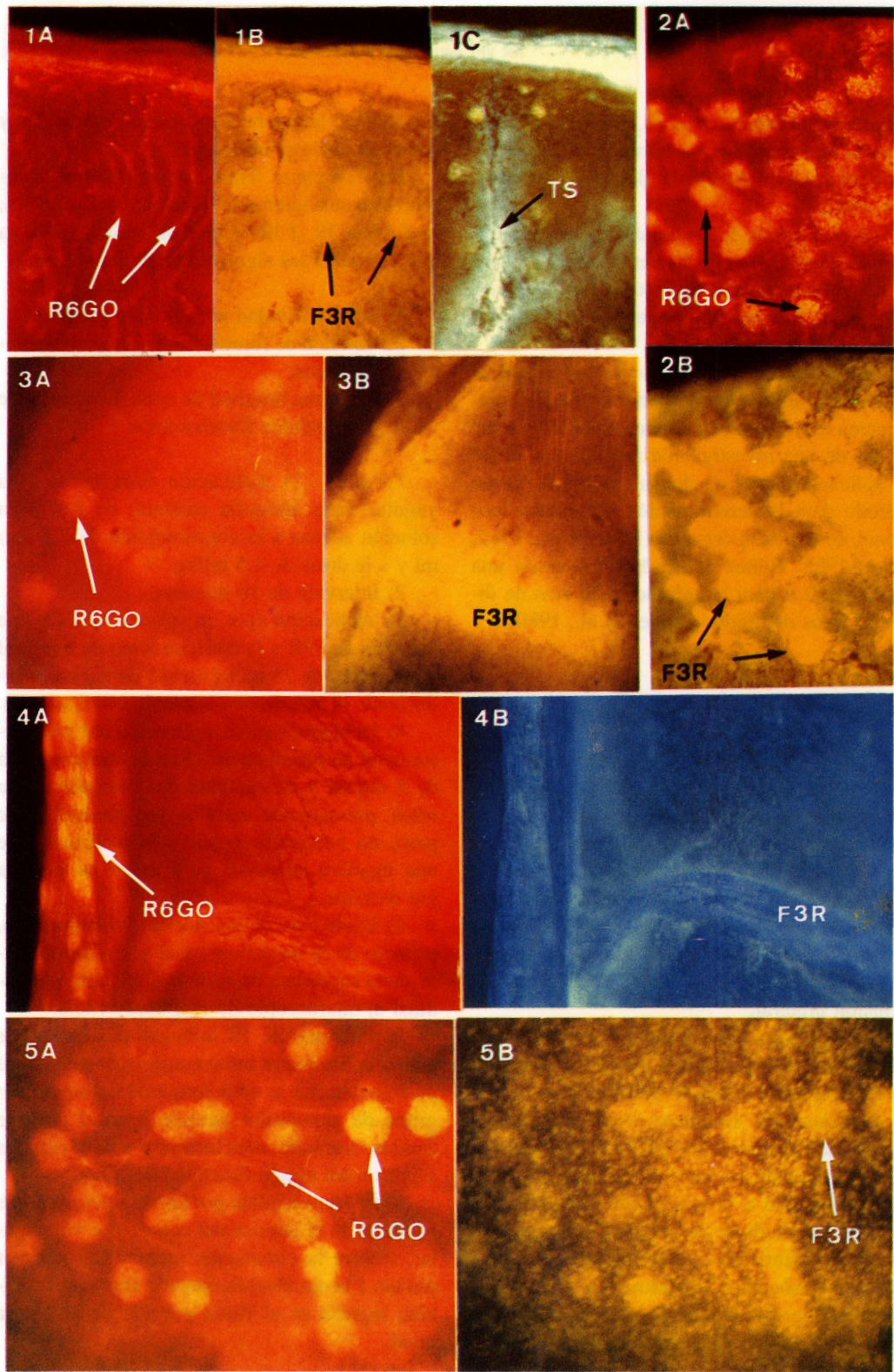
FIGURA 1. Tres imágenes pertenecientes al mismo campo de la superficie de corte de un riñón de un animal control. 1A) Luz de excitación verde, fluorescencia anaranjada de R6G0 en túbulos contorneados distales y asas de Henle. 1B) Luz de excitación azul, fluorescencia verde brillante de F3R en glomérulos y arteriolas aferentes. 1C) Luz de excitación violeta, fluorescencia azul pálido de TS en tubo colector. x150.

FIGURA 2. Superficie de corte de riñón hidronefrótico de 6 días de oclusión ureteral. Semifuncionalidad de primer orden. 2A) R6G0 en glomérulos, al iluminar con luz verde. 2B) F3R en los mismos glomérulos que la imagen anterior, al iluminar con luz azul. x150.

FIGURA 3. Superficie de corte de riñón hidronefrótico de 12 días de oclusión ureteral. Semifuncionalidad de segundo orden. 3A) Luz de excitación verde, R6G0 presente en glomérulos. 3B) Luz de excitación azul, no se observa la fluorescencia correspondiente a la F3R. x150.

FIGURA 4. Superficie de corte de riñón hidronefrótico de 18 días de oclusión ureteral. 4A) La R6G0 está presente en glomérulos semifuncionales de segundo orden al iluminar el campo con luz verde. Parénquima renal reducido a una pequeña franja vertical. 4B) Iluminación con luz violeta, no observándose estructuras glomerulares ni tubulares. x150.

FIGURA 5. Superficie externa de riñón hidronefrótico de 24 días de oclusión ureteral. 5A) Iluminación con luz verde, la R6G0 aparece en glomérulos semifuncionales de primer y segundo orden y en arteriolas aferentes que se entrecruzan debido a la expansión hidronefrótica. 5B) Iluminación con luz azul, F3R en glomérulos semifuncionales de primer orden. x150.



del córtex (Steinhausen et al., 1983) y la inyección de tina china *in vivo* también ha sido utilizada para la numeración de glomérulos (Chevalier, 1982).

De esta forma, el estudio del comportamiento individual *in vivo* de las nefronas no requiere técnicas complicadas o costosas que, además, consumen mucho tiempo en su realización (Poujeol et al., 1975).

En el presente trabajo se ha estudiado el funiconalismo renal en roedores tras la interrupción experimental monolateral del flujo renal dentro de una investigación más general sobre la aplicación *in vivo* de fluorocromos como método para la determinación del estado funcional de diversos órganos (Soler et al., 1982; Soler, 1985; Núñez et al., 1988) y como una nueva técnica para la coloración *in vivo* de diversos tipos de tejidos (Núñez et al., 1980).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se han utilizado 50 ratas macho (raza Wistar), cuyo peso oscilaba entre 200 y 400 g. que se mantuvieron en condiciones de fotoperiodicidad natural, recibiendo una dieta estándar de laboratorio y agua *ad libitum*. De las 50 ratas, 10 fueron destinadas a controles y al resto se les practicó una hidronefrosis experimental, distribuyéndose en 4 grupos de 10 animales cada uno, durante 6, 12, 18 y 24 días de oclusión ureteral.

Tanto los animales controles como experimentales fueron pesados a diario (desde la intervención hasta el día de sacrificio).

Ligadura del conducto ureteral. Una vez anestesiado el animal por inhalación de vapores de éter y situado en posición de decúbito supino, se procedió a la exposición del riñón tras incisión longitudinal de la parte abdominal. El uréter se identificó cuidadosamente bajo un estereomicroscopio, ligándose en su porción distal del tercio superior. A continuación se procedió a colocar en su sitio las vísceras abdo-

minales y a la sutura de las capas musculares y dérmicas correspondientes.

Fluorocromos. Tras ensayar diversos fluorocromos se eligieron la Rodamina 6G0 (R6G0), la Fosfina 3R (F3R) y la Tioflavina S (TS), ya que cumplían las siguientes características:

1. buena afinidad por el tejido renal;
2. emisión de fluorescencia detectable a dosis bajas;
3. diferente longitud de onda de emisión de los distintos fluorocromos.

Técnica. 1) Aplicación intravenosa (vía yugular, bajo anestesia etcétera) de R6G0 en solución acuosa a la concentración de 2,5 mg/ml y a la dosis de 1,5 ml/kg.

2) Intervalo de 10 minutos.

3) Aplicación (por la misma vía) de una solución de F3R a la concentración de 5 mg/ml y a la dosis de 25 ml/kg (o sea en exceso, produciendo la muerte casi instantánea del animal).

4) En algunos casos, aplicación por vía transureteral antidrómica de TS, a la concentración de 5 mg/ml y en cantidad que reemplace a la orina, previamente extraída por punción. Este paso, no necesario, requiere la realización de una ligadura adicional para evitar su pérdida por derrame.

5) Extracción de los riñones y observación, primero de la superficie renal y, posteriormente, de la superficie de corte tras sección longitudinal al microscopio de epifluorescencia.

El intervalo de 10 minutos existente entre ambas aplicaciones intravenosas sucesivas, hace posible detectar si un determinado glomérulo o grupo de glomérulos permite o no el paso de fluidos, sacando conclusiones sobre algunos aspectos del estado funcional del riñón.

El trayecto seguido por los fluorocromos que penetran en el interior del cuerpo por vía yugular, recorre la circulación menor y, tras haber pasado a la circulación mayor a través del corazón, ingresa en el riñón por vía de la arteria renal.

RESULTADOS

Peso. A lo largo de toda la experiencia, el peso de los animales no sufre variaciones estadísticamente significativas con respecto a los valores de los animales de control.

Riñón normal. La Rodamina 6G0, tras circular por el riñón durante 10 minutos aparece acumulada en las asas de Henle y los túbulos contorneados distales (Figura 1A). La Fosfina 3R se encuentra en las arteriolas aferentes y glomérulos ya que al morir el animal el fluorocromo queda detenido en las zonas más próximas de su entrada (Figura 1B). Por su parte, la Tioflavina S se observa difusamente en los tubos colectores, directamente relacionados con la pelvis renal (Figura 1C).

Riñón hidronefrótico de 6 días. Se observa la presencia de glomérulos que afloran a la superficie renal como signo de desplazamiento de las estructuras corticales como consecuencia de la presión central ejercida por la dilatación a nivel de la pelvis renal (Figuras 2A y 2B).

La cantidad de glomérulos que muestran la presencia de Fosfina 3R (Figura 2B) está reducida en comparación con los que muestran la Rodamina 6G0 (Figura 2A). El hecho de que ante una presión mecánica se obliteren más fácilmente los vasos venosos que los arteriales explica que la Rodamina 6G0 no haya podido pasar del área glomerular. En algunos glomérulos coexiste la fluorescencia de la Rodamina 6G0 y la de la Fosfina 3R, lo que parece significar que en esos glomérulos se encuentra retrasada la circulación sin estar totalmente suprimida. Una hidronefrosis de este grado (6 días) hace compatible los dos efectos observados: el desplazamiento de los elementos estructurales corticales del riñón y su obliteración de diverso grado. En este estado de hidronefrosis se puede hablar de una *semifuncionalidad de primer orden* de las nefronas.

Riñón hidronefrótico de 12 días. En este grado de hidronefrosis, el volumen renal se encuentra bastante aumentado en algunas zo-

nas. La figura 3A y 3B muestran el aspecto que presenta la superficie de corte de un riñón en la zona más ancha del parénquima. El volumen de líquido que se almacena en el interior del riñón hace que la función renal esté disminuida, ya que la hidronefrosis afecta a la totalidad de las nefronas. Al iluminar con luz verde se visualizan glomérulos de tono amarillo-anaranjado como consecuencia de la presencia de Rodamina 6G0 (Figura 3A), circunstancia que no ocurriría en los controles. Al iluminar con luz azul no se detecta en los glomérulos la fluorescencia verde brillante correspondiente a la Fosfina 3R (Figura 3B), como ocurre en los controles. De estos hechos, se deduce que el segundo fluorocromo no ha penetrado en el glomérulo constituyendo por lo tanto un estado más avanzado de semifuncionalidad, que denominamos *semifuncionalidad de 2.º orden*.

Riñón hidronefrótico de 18 días. Se observa en la superficie de corte longitudinal una considerable disminución del grosor de la corteza renal. Prácticamente todas las nefronas son semifuncionales de primer o segundo orden y la pérdida de funcionalismo es más acusada cuanto más superficialmente haya sido desplazada la estructura de las nefronas (Figuras 4A y 4B). En este período resulta difícil diferenciar las asas de Henle y el parénquima renal está considerablemente reducido.

Riñón hidronefrótico de 24 días. Resulta muy difícil estudiar la superficie de corte del riñón para observar los glomérulos, dado el avanzado estado de alteración renal, haciéndose necesario su estudio en superficie. Por transparencia, se pueden observar glomérulos semifuncionales de primer y segundo orden en casi toda la superficie estudiada, siendo frecuente el entrecruzamiento de las arteriolas aferentes, debido a la expansión hidronefrótica (Figuras 5A y 5B).

DISCUSIÓN

La técnica que proponemos pretende apor-

tar una nueva técnica para la interpretación de lesiones renales conocidas, simplificando la metodología y añadiendo datos que, en este caso, colaboran al enjuiciamiento de la "funcionalidad" de las nefronas de una forma más directa a cada corpúsculo renal en particular, lo que permite sacar conclusiones sobre el grado de alteración funcional de las nefronas y sobre la localización de las áreas lesionadas. Además, con el método propuesto, no se hace precisa la manipulación histológica de las muestras, permitiendo el estudio dinámico de la función renal, ya que es factible seguir el discurrir de los fluorocromos por las vías renales.

Otros autores, como Chevalier en 1982, utilizan la inyección de tinta china in vivo para el recuento glomerular, indicando que hay nefronas hipoperfundidas en animales recién nacidos, pero totalmente perfundidas en adultos. Nosotros estamos totalmente de acuerdo con los resultados de Chevalier, aunque debemos resaltar que su técnica, aunque muy efectiva, puede enmascarar algunas estructuras o glomérulos, lo que se obvia con nuestra técnica, ya que los glomérulos aparecen iluminados, destacando claramente sobre el parénquima renal, que aparece como un fondo oscuro.

Por otro lado este mismo autor, en el año 1983 utilizó microesferas radioactivas para el recuento glomerular en una técnica no exenta de complicaciones, pero que rinde abundante información. Con nuestra técnica se evita el emplear material radioactivo y todo el proceso de revelado, ya que, en sólo 10 minutos y con la aplicación de dos inyecciones intravenosas de fluorocromos, se puede poner de manifiesto el estado funcional del riñón.

En nuestros ensayos hemos realizado sistemáticamente la ligadura en el uréter izquierdo para normalizar las experiencias y porque la hidronefrosis espontánea es más común en el lado izquierdo que en el derecho (Johnston et al., 1977).

Las alteraciones renales aparecidas tras la ligadura del uréter, coinciden, en líneas genera-

les, con lo descrito por otros autores (Olsen, et al., 1976; Johnston et al., 1977; Robert, 1977; Schwartz et al., 1977; Kira, 1978; Luyulko et al., 1981; Balahiev, 1982; Chevalier, 1983), lo que confirma la validez del método propuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- BALAHIEV, M. A. 1982. The juxtaglomerular apparatus and interstitial cells of the medulla of the kidney in hydronephrosis and chronic pyelonephritis. *Arkh. Patol.* 44: 12-19.
- CRAVEN, J. D.; HODSON, C. J.; LECKY, J. W. 1972. An atypical response of the kidney to a period of ureteric obstruction. *Radiology* 105: 39-42.
- CHEVALIER, R. L. 1982. Glomerular number and perfusion during normal and compensatory renal growth in the guinea pig. *Pediatr. Res.* 16: 436-440.
- CHEVALIER, R. L. 1983. Hemodynamic adaptation to reduced renal mass in early postnatal development. *Pediatr. Res.* 17: 620-624.
- JOHNSTON, J. H.; EVANS, J. P.; GLASSBERG, K. I.; SHAPIRO, S. R. 1977. Pelvic hydronephrosis in children: A review of 219 personal cases. *J. Urol.* 117: 97-101.
- KIRA, M. 1978. A scanning electron microscopic study in normal and diseased kidney. *Jikeikai Med. J.* 25: 233-248.
- LUYULKO, A. V.; VOLKAVA, L. M.; USTINENKO, A. F. 1981. Congenital ureteral obstruction in children. *Urol. Nefrol.* 5: 18-23.
- MOYANO, M. C.; REDONDO, E.; RONCERO, V.; DURÁN, E. 1987. Estudio estructural y morfo-métrico del riñón contralateral en caso de nefrectomía, hidronefrosis unilateral y nefrectomía post-hidronefrosis. *An. Vet. (Murcia)* 3: 3-10.
- NÚÑEZ, M. 1986. Contribución al estudio, mediante fluorocromos, del riñón de rata albina en condiciones fisiológicas o experimentalmente modificadas. Tesis Doctoral. Universitat de València. España.
- NÚÑEZ, M.; NÚÑEZ, J.; SOLER, C.; NÚÑEZ, A. 1988. Nephrotoxicity of gentamicin and metilmycin in rat. Quatification and qualification of glomeruli. *Rev. Esp. Fisiol.* 44: 41-44.

- NÚÑEZ, M.; TORREGROSA, G.; SOLER, C.; NÚÑEZ, A. 1980. Algunos aspectos del funcionamiento renal en roedores, estudiados por aplicación de fluorocromos *in vivo*. *Pharmacia Mediter.* 13: 862-867.
- OLSEN, L.; BACKLUND, L.; GORANSON, M. 1976. Renal function in experimental chronic hydronephrosis: II. Backflow studies with radionucleotides. *Scand. J. Urol. Nephron.* 9: 2610-268.
- POUJEOL, P.; CHABARDES, D.; BONVALET, J. P., DE ROUFFIGNAC, C. 1975. Glomerular filtration rate and microspheres distributions in single nephron of rat kidney. *Pfluegers. Arch. Eur. J. Physiol.* 357: 291-302.
- ROBERT, H. 1977. Hydronephrosis. *Am. Coll. Surg. Engl.* 5: 388-392.
- SCHWARTZ, M. M. VENKATACKALAM, M.; COTRAN, R. S. 1977. Reversible inner medullary vascular obstruction in acute experimental hydronephrosis. *Am. J. Pathol.* 86: 425-436.
- SOLER, C. 1985. Estudios morfológicos de la zona-F del epidídimo de roedores y de su significado fisiológico mediante técnicas de ablación quirúrgica aprecial. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- SOLER, C.; NÚÑEZ, J.; NÚÑEZ, M.; NÚÑEZ, A. 1982. Changes produced in albino mouse by application of Rhodamine 6G0. *Rev. Esp. Fisiol.* 38: 383-392.
- STEINHAUSEN, M.; SNOEL, H.; PAREKH, N.; BAKER, R.; JOHNSON, P. C. 1983. Hydronephrosis: A new method to visualize vas afferens, efferentes and glomerular network. *Kidney. Int.* 23: 794-805.
- THANOS, S.; VIDAL-SANZ, M.; AGUAYO, A. J. 1987. The use of rhodamine-B isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.* 406: 317-321.
- WATCHI, J. M.; ALTEMAN, J. 1970. Unilateral cortical necrosis of the kidney. Experimental production in rabbits after ureteral ligation. *Arch. Pathol.* 90: 125-128.
- WILSON, D. R. 1975. Mechanisms of post-obstructive diuresis in the solitary hydronephrotic kidney of the rat. *Clin. Sci. Mol. Med.* 48: 167-176.