

Técnicas para el estudio de la excreción renal de agua libre en ratas normales y con cirrosis hepática experimental

J. Camps *, J. Solá, V. Arroyo, A. Rimola, R. M. Pérez-Ayuso, J. Gaya, F. Rivera y J. Rodés

Unidad de Hepatología y Laboratorio Hormonal
Hospital Clínico y Provincial de Barcelona
08036 Barcelona

(Recibido el 3 de marzo de 1985)

J. CAMPS, J. SOLA, V. ARROYO, A. RIMOLA, R. M. PEREZ-AYUSO, J. GAYA, F. RIVERA and J. RODES. *Techniques to Study Renal Ability to Excrete Free Water in Normal Rats and Those with Experimental Cirrhosis*. Rev. esp. Fisiol., 42, 117-122. 1986.

Different techniques to measure free water excretion in rats, administered an oral water overload and with measurement of its ability to excrete it into the urine have been studied. When 30 or 50 ml/kg b.wt. were administered and the urine excreted in 3 h was collected, a decrease on the urinary osmolality (U_{osm}) was observed with respect to the baseline U_{osm} , which was similar in both overloads, although the percentage of the overload excreted was significantly greater with 50 ml/kg. However, the U_{osm} obtained was hypertonic as compared to plasma osmolality (P_{osm}) indicating that this determination was not useful to study free water excretion. In a further study it was investigated if there was any period of time in which all the animals excreted hypotonic urine. However, results indicated that the period for excreting a maximally diluted urine was very variable in time. The best technique to study free water excretion in these animals was the collection of each spontaneously voided urine independently, to measure the minimal U_{osm} . When a 50 ml/kg water load was administered and the minimal U_{osm} was determined it was observed to be lower than P_{osm} in all the animals indicating that this technique was useful to study this derangement in these animals.

Key words: Cirrhosis, Experimental models, Free water.

Los enfermos cirróticos con ascitis desarrollan con frecuencia un trastorno de la capacidad renal de excretar agua libre (3, 16). En ocasiones, este trastorno es muy intenso, de modo que estos pa-

cientes no son capaces de elaborar un aclaramiento de agua libre positivo después de una sobrecarga acuosa, presentando hiponatremia dilucional e hiposmolalidad plasmática (2). La fisiopatología de este trastorno está bajo discusión (4, 6, 14, 15, 17) no pudiendo ser suficientemente aclarada mediante estudios clínicos. El desarrollo de un modelo de

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

cirrosis hepática en animales de experimentación (10, 12) permitiría investigar con mayor profundidad la patogenia de este trastorno. Estos modelos son particularmente útiles para el estudio secuencial de las distintas alteraciones funcionales de la cirrosis hepática y las modificaciones de los sistemas hormonales que intervienen en su regulación.

Sin embargo, la valoración de la capacidad renal de excretar agua libre de solutos en el animal de experimentación no es una técnica suficientemente estandarizada. Esta determinación se basa en la administración a los animales de una sobrecarga acuosa oral seguida de la observación de su capacidad de excretarla en la orina durante un tiempo determinado (11). En el presente trabajo se estudia la eficacia de varias de estas técnicas, difiriendo en la dosis de agua administrada y el modo de recolectar la orina emitida. Además se valora la capacidad de excretar agua libre en un grupo de ratas con cirrosis hepática con ascitis por intoxicación con tetracloruro de carbono, con el objeto de comprobar si estas técnicas son capaces de discriminar la presencia de este trastorno en estos animales.

Material y Métodos

Técnicas para la medición de la capacidad renal de excretar agua libre en la rata normal. Los estudios se realizaron en 34 ratas Sprague-Dawley, macho, de 250 a 300 g de peso. Los animales se instalaron en jaulas metabólicas individuales, siendo alimentados con una dieta estándar que contenía 117 mEq de Na por kg de comida; el agua fue administrada *ad libitum*. Tras una semana de adaptación a las jaulas, los animales presentaron ingestas de comida y bebida normales ($16,1 \pm 0,7$ g y 47 ± 4 ml, respectivamente). En un primer estudio se comparó la respuesta de los animales a

la administración de dos dosis diferentes de agua. Para ello, en 17 animales se recogió la orina emitida durante 24 horas en condiciones basales, para la determinación de la osmolalidad urinaria y la excreción urinaria de creatinina. A continuación, se les extrajeron 500 μ l de sangre por medio de una punción cardíaca con el objeto de determinar la concentración plasmática de creatinina y la osmolalidad plasmática, inyectándoles después 2 ml de suero fisiológico por vía s.c. para compensar la pérdida de volumen plasmático ocasionada. Dos días después, 8 animales recibieron una sobrecarga oral de agua de 30 ml/kg de peso corporal y 9 una sobrecarga de 50 ml/kg. En todos los casos el agua se administró a 37 °C y dos horas después de haberles retirado la comida y la bebida, y se realizó mediante un tubo gástrico y con el animal ligeramente anestesiado con éter etílico, con el objeto de poderle introducir con facilidad el tubo gástrico e inducir el vaciamiento de la vejiga. Después de administrar la sobrecarga acuosa los animales se introdujeron de nuevo en sus jaulas metabólicas, recogiendo la orina en una probeta. Al cabo de 3 horas, se les hizo vaciar de nuevo la vejiga, usualmente levantando la rata de modo que sus patas no estuvieran en contacto con el suelo de la jaula (5) o por inducción con éter etílico (13). A continuación fueron sacrificados por decapitación para obtener la sangre troncal, determinándose el porcentaje de la sobrecarga excretado en 3 horas, así como la osmolalidad plasmática y urinaria y la excreción urinaria de creatinina.

En un segundo ensayo se investigó la capacidad renal de generar agua libre en función del tiempo transcurrido después de la administración de la sobrecarga acuosa. Para ello, se estudiaron 9 animales en estado basal, recogiendo la orina de 24 h para la determinación de la osmolalidad urinaria. Después se les administró la sobrecarga acuosa de

50 ml/kg, recogiendo la orina emitida a los 30 min y a las 1, 2 y 3 h.

La capacidad renal de generar agua libre a través de la determinación de la mínima osmolalidad urinaria (11) se estudió en 8 animales, como se indica más arriba, en estado basal y después de administrarles la sobrecarga de agua. Se recogió la orina durante 3 h, micción por micción, determinando la mínima osmolalidad urinaria como un índice para la medición de la máxima capacidad dilutora renal.

Capacidad renal de excretar agua libre en la cirrosis experimental. A otras 11 ratas de 150 g se indujo cirrosis hepática mediante un tratamiento combinado de inhalación de Cl_4C y administración oral de fenobarbital (0,3 g/l) en el agua de bebida (12). Como controles se estudió otro grupo de 10 animales que fueron tratados únicamente con fenobarbital. Los animales fueron sometidos a una dieta *ad libitum* idéntica a la descrita en el apartado anterior. En la undécima semana de tratamiento, los animales cirróticos y los controles fueron introducidos en jaulas metabólicas individuales y a la decimotercera semana, cuando las ratas cirróticas presentaban abundante ascitis, se sometió a todos los animales a

una sobrecarga acuosa, determinándose en cada uno la mínima osmolalidad urinaria.

Técnicas analíticas. La osmolalidad plasmática y urinaria se determinó por descenso del punto de congelación (Osmómetro Advanced Instruments, 3W, Needham Heights, Ma., USA) y la concentración plasmática y urinaria de creatinina, mediante un método colorimétrico manual (8).

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la *t* de Student-Fisher para datos independientes y apareados. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.

Resultados

La administración de dos dosis distintas de agua produjeron una disminución similar de la osmolalidad urinaria (entre 4 y 5 veces), aunque el porcentaje de la sobrecarga acuosa excretado fue significativamente superior en el segundo caso (tabla I). El filtrado glomerular, medido a través del aclaramiento de creatinina, aumentó de modo similar en ambos estudios. No obstante, estas pruebas no permitieron valorar de modo adecuado la capacidad renal de excretar agua libre

Tabla I. Efecto de la administración de dos dosis distintas de agua sobre la osmolalidad plasmática (P_{osm}), osmolalidad urinaria (U_{osm}), porcentaje de la sobrecarga excretado (PSE) y aclaramiento de creatinina.

Los resultados se expresan como media $\pm$ S.E.M. ($n = 17$).

	Basal	Sobrecarga (30 ml/kg)	Basal	Sobrecarga (60 ml/kg)
P_{osm} (mOsm/kg)	291,0 $\pm$ 4,0	290,0 $\pm$ 2,0	292,0 $\pm$ 5,0	290,0 $\pm$ 4,0
U_{osm} (mOsm/kg)	1485,0 $\pm$ 102,0	393,0 $\pm$ 73,0*	1557,0 $\pm$ 65,0	314,0 $\pm$ 55,0*
PSE	—	68,0 $\pm$ 4,0	—	81,0 $\pm$ 6,0*
Aclaramiento creatinina (ml/min)	0,8 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2*	0,9 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 1,5*

* $p < 0,001$ respecto a los valores basales, excepto a) que se expresa respecto a la dosis menor y es $p < 0,05$.

Tabla II. Osmolalidad urinaria (U_{osm}) y porcentaje de la sobrecarga excretado (PSE) cuando se administró una sobrecarga acuosa oral de 50 ml/kg y la orina se recogió a distintos intervalos de tiempo.

U_{osm}	Media $\pm$ S.E.M. (n = 9)
Basal	1206 $\pm$ 120
Sobrecarga	
30 min	287 $\pm$ 61
1 h	147 $\pm$ 39
2 h	233 $\pm$ 64
3 h	476 $\pm$ 110
PSE	93 $\pm$ 5

en estos animales, ya que la osmolalidad urinaria obtenida tras la administración de la sobrecarga acuosa fue hipertónica con respecto a la del plasma.

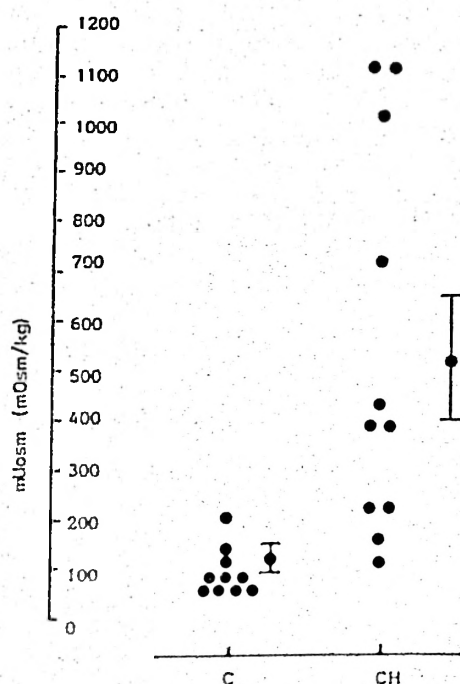


Fig. 1. Valores de mínima osmolalidad urinaria (mUosm) en ratas control (C) y ratas con cirrosis hepática experimental y ascitis (CH).

La tabla II indica la respuesta a la administración de 50 ml/kg de agua, cuando la orina se recogió a distintos intervalos de tiempo para valorar la osmolalidad. Al cabo de 30 minutos de administrar la sobrecarga acuosa, algunos animales aún no habían excretado orina. Los distintos individuos no eliminaron orina hipotónica al mismo tiempo, sino que la orina más diluida se excretó a tiempos distintos; en general, la osmolalidad urinaria inferior fue la correspondiente a 1 hora, pero en tres casos, se obtuvo a las 2 horas de la administración del agua.

Al recoger la orina micción por micción después de administrar una sobrecarga acuosa oral, la mínima osmolalidad urinaria se registró como índice de la capacidad renal de generar orina hipotónica, lo que permitió valorar más convenientemente la capacidad renal de excretar agua libre, ya que este índice fue en todos los casos inferior a su correspondiente osmolalidad plasmática (tabla III).

La mínima osmolalidad urinaria fue un buen índice para cuantificar el trastorno de la capacidad renal de excretar agua libre en ratas con cirrosis experimental (fig. 1). Este parámetro estuvo significativamente aumentado en el grupo de animales cirróticos con ascitis estudiado (505 ± 126 mOsm/kg vs 94 ± 16 mOsm/kg, $p < 0,01$); 7 de 11 animales presentaron una mínima osmolalidad uri-

Tabla III. Osmolalidad urinaria (U_{osm}), plasmática (P_{osm}), mínima osmolalidad urinaria (mUosm) y porcentaje de la sobrecarga acuosa excretado (PSE) cuando se recogió la orina micción por micción.

	Media $\pm$ S.E.M. (n = 8)
P_{osm} basal	288 $\pm$ 3
U_{osm} basal	1584 $\pm$ 295
PSE	84 $\pm$ 3
mUosm	161 $\pm$ 16

naria hipertónica indicando una incapacidad renal en estos animales de generar agua libre de solutos.

Discusión

Se han descrito diversas técnicas para valorar la capacidad renal de excretar agua libre en el hombre y en el animal de experimentación. El método más exacto es, sin duda, la medición del aclaramiento de agua libre, definido como la diferencia entre el volumen urinario y el aclaramiento osmolal (15). Esta técnica, sin embargo, es de difícil aplicación en el pequeño animal de experimentación, ya que requiere la infusión endovenosa de importantes cantidades de líquido (11). Un método alternativo es la administración de una sobrecarga oral de agua seguida de la valoración de la capacidad renal de excretar orina hipotónica con respecto al plasma. Existen varias técnicas de esta clase, que difieren en la dosis de agua administrada, en la manera de administrarla y en el modo de recolección de la orina (1, 7, 9). En nuestro estudio se han valorado aquellas técnicas que implicaban un menor grado de manipulación de los animales. La administración de 30 o 50 ml/kg produjo efectos similares; en ambos casos la osmolalidad plasmática no se modificó y el filtrado glomerular, medido por el aclaramiento de creatinina, aumentó de modo semejante. La osmolalidad urinaria también disminuyó hasta niveles similares, aunque el porcentaje de la sobrecarga excretado en 3 horas fue significativamente superior cuando se utilizó la dosis mayor. Sin embargo, la determinación de la osmolalidad en la orina de 3 horas no fue adecuada para el estudio de la capacidad renal de generar orina hipotónica, ya que la orina excretada durante este período, medida en su conjunto, es hipertónica con respecto al plasma. En el estudio que se muestra en la tabla II se

investigó si había algún período de tiempo en el que todos los animales excretasen orina hipotónica, pero los resultados obtenidos indican que el período de máxima eliminación de agua libre es muy variable con respecto al tiempo.

La recogida de la orina en micciones independientes para la determinación de la mínima osmolalidad urinaria fue la técnica más útil para la valoración de la capacidad renal de excretar agua libre. Este método fue también adecuado para el estudio de la alteración del metabolismo hídrico en la cirrosis hepática experimental. Los animales cirróticos con ascitis presentaron unos niveles de mínima osmolalidad urinaria comparables, en 4 casos, a la osmolalidad urinaria basal normal en la rata; otros 3 animales presentaron mínimas osmolalidades urinarias algo inferiores, pero hipertónicas con respecto al plasma normal.

En conclusión, la administración de una sobrecarga oral de 50 ml/kg de peso corporal seguida de la determinación de la mínima osmolalidad urinaria es un método útil para la determinación de la capacidad renal de excretar agua libre en ratas normales y ratas con cirrosis experimental.

Agradecimientos

Durante la realización del presente trabajo, J. Camps fue becado por la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (1214/82)» y J. Solá, por la «Fundació Catalana per l'Estudi de les Malalties del Fetge».

Resumen

Se estudian en rata distintas técnicas para la medición de la capacidad renal de excretar agua libre, por administración de una sobrecarga acuosa oral. Cuando se administran sobrecargas de 30 ó 50 ml/kg de peso y se recoge la orina excretada durante las 3 h siguientes, se observa un descenso en la osmolalidad urinaria (U_{osm}) similar en ambos casos, con respecto a la U_{osm} basal, aunque el porcentaje

de la sobrecarga excretado es significativamente superior con 50 ml/kg. Sin embargo, la U_{OSM} obtenida es hipertónica con respecto a la osmolalidad plasmática (P_{OSM}), por lo que esta determinación no fue útil para el estudio de la excreción de agua libre. En un estudio posterior se investiga si existe algún período de tiempo en el que todos los animales excretasen orina hipotónica, pero los resultados indicaron que el período de máxima eliminación de agua libre era muy variable con respecto al tiempo. La recogida de la orina emitida durante 3 h en micciones independientes para la determinación de la mínima U_{OSM} es la técnica más adecuada para la valoración de la capacidad renal de excretar agua libre. Cuando se administra una sobrecarga acuosa de 50 ml/kg y se determina después la mínima U_{OSM} este parámetro es en todos los casos inferior a la P_{OSM} . Con esta técnica se estudia el trastorno de la capacidad renal de excretar agua libre en ratas con cirrosis experimental y ascitis, observando que estos animales presentan una mínima U_{OSM} significativamente aumentada con respecto al grupo control lo que confirma la validez de estas técnicas.

Bibliografía

1. Adolph, E. F. y Northop, J. P.: *Am. J. Physiol.*, 168, 320-325, 1952.
2. Arroyo, V. y Rodés, J.: *Postgrad. Med. J.*, 51, 558-562, 1975.
3. ARROYO, V., RODÉS, J., GUTIÉRREZ-LIZÁRAGA, M. A. y Revert, L.: *Am. J. Digest. Dis.*, 21, 240-256, 1976.
4. Bichet, D., Szatalowicz, V., Cheimovitz, C. y Schrier, R. W.: *Ann. Intern. Med.*, 96, 413-417, 1982.
5. Cocchetto, D. M. y Bjornsson, T. D.: *J. Pharmac. Sci.*, 72, 465-492, 1983.
6. Epstein, M.: *Gastroenterology*, 76, 622-635, 1979.
7. Falk, G.: *Am. J. Physiol.*, 181, 157-160, 1955.
8. Hyde, T. A., Mellor, L. D. y Raphael, S. S.: En «Medical Laboratory Technology» (Raphael, S. S., ed.), W. B. Saunders Co., Filadelfia, 1976, Vol. 1, pp. 144-177.
9. Jeffers, W. A., Livezey, M. M. y Austin, J. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 50, 184-188, 1942.
10. Jiménez, W., Martínez Pardo, A., Arroyo, V., Bruix, J., Rimola, A., Gaya, J., Rivera, J. y Rodés, J.: *Hepatology*, 5, 245-250, 1985.
11. Linas, S. L., Anderson, R. J., Buggenheim, S. J., Robertson, G. L. y Berl, T.: *Kidney Intern.*, 20, 173-180, 1981.
12. López Novoa, J. M., Rengel, M. A., Rodicio, J. L. y Hernando, L.: *Am. J. Physiol.*, 232, F315-F318, 1977.
13. Nelson, E., Hanano, M. y Levy, G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 153, 159-162, 1966.
14. Pérez-Ayuso, R. M.: Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, 1984.
15. Pérez-Ayuso, R. M., Arroyo, V., Camps, J., Rimola, A., Gaya, J., Costa, J., Rivera, F. y Rodés, J.: *Kidney Intern.*, 26, 72-80, 1984.
16. Shear, L., Hall, W. W. y Gabuzde, G. J.: *Am. J. Med.*, 39, 199-209, 1965.
17. Shedl, H. P. y Bartter, F. C.: *J. Clin. Invest.*, 32, 248-261, 1960.