



Los estudios que condujeron a establecer los conceptos de filtración glomerular y reabsorción tubular: del siglo XVII al siglo XX. La sabiduría del riñón

José Carlos Peña Rodríguez¹

Resumen

En este primer artículo se resume la historia de los estudios que precisaron que la función del riñón era determinada por una mezcla de filtración por el glomérulo y reabsorción por los túbulos. Estas trascendentes observaciones fueron iniciadas en el siglo XVII por el gran anatomista Marcelo Malpighi, que describió los glomérulos y aventuró una hipótesis sobre su posible función. Después, ya en el siglo XIX, los estudios de William Bowman, en Inglaterra, y Carl Ludwig y Rudolf Heidenhain, en Alemania, plantearon la controversia de si la hipótesis de la filtración-reabsorción era la más importante o, por el contrario, la secreción tubular era la función fundamental. Esta controversia fue finalmente resuelta en el siglo XX por los estudios de micropunción de túbulos renales en batracios y ratas por AN Richards y JA Wearn, en 1923, en la Universidad de Pensilvania, en los EUA. Estos trabajos marcaron el inicio de la fisiología moderna del riñón.

Palabras clave: Malpighi, Bowman, Ludwig, Richards, glomérulo, anatomía, fisiología.

Summary

This first article on "The wisdom of the kidney" describes the history of the observations and investigations that established that the main function of the kidney was glomerular filtration, followed by tubular reabsorption. These studies began in the 17th century, when Marcello Malpighi, a brilliant anatomist, described the glomeruli and advanced a hypothesis of the function of these small corpuscles. Almost 200 years later, in the 19th century, William Bowman in England extended and enriched Malpighi's observations, along with the studies of Carl Ludwig and Rudolf Heidenhain both in Germany. All these researchers postulated the great controversy: What was more important: the filtration-reabsorption hypothesis or the tubular secretion? It was not until the 20th century, in 1923, that the micropuncture studies of the glomeruli in frogs, performed by JA Wearn and AN Richards in Pennsylvania, solved the problem. These authors demonstrated that the glomerular fluid was an ultrafiltrate of the blood and the tubules reabsorbed part of this fluid to form the final urine. This transcendent contribution marked the birth of modern renal physiology.

Key words: Malpighi, Bowman, Ludwig, Richards, glomerulus, anatomy, physiology.

INTRODUCCIÓN

En forma simplista, se puede definir al riñón como un órgano que forma orina, pero en un sentido más lato, los "riñones son capaces de elaborar la materia misma de la filosofía" (Homer W Smith).¹ Desde un punto de vista más fisiológico, la sabiduría de sus unidades funcionales o nefronas es tal que regula en principio nuestro medio interno y nos permite sobrevivir a condiciones extremas. Heredamos este mar interior del mar original donde se forjó la vida. Ese mar de agua, rico en sales, lo transformamos en nuestro medio interno, que nos permitió convertirnos en animales terrestres. Sin él, nuestra vida no sería libre; lo

¹ Director Médico. Centro de Diagnóstico Ángeles.

Correspondencia:

Dr. José Carlos Peña

Correo electrónico: josecarlos.pena@saludangeles.com

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/actamedica>

extraordinario es que el órgano que mantiene este medio interno constante es el riñón, con sus miles y hasta millones de pequeñas unidades o nefronas y sus múltiples funciones, que nos permiten eliminar lo superfluo, retener lo necesario y mantener el organismo en balance químico perfecto. El conocimiento del riñón fue primero anatómico, y basados en la premisa de que el órgano hace a la función, estos primeros anatomistas-fisiólogos intentaron en el siglo decimonónico una definición de la o las funciones del riñón. Midiéron la urea en la orina y la sangre; basados en esta información, concluyeron que para eliminar esta urea, el riñón debía remover urea de decenas de litros de sangre. ¿Cómo hacía para realizar esta tarea hercúlea? Además, no se conformaba con esa labor de eliminar productos tóxicos, su función de regulador del medio interno era todavía más trascendente.¹

ORÍGENES

Marcelo Malpighi (1628-1694)² fue el primero en utilizar el microscopio descrito por Anton Leeuwenhoek en Holanda y lo aplicó a la biología. Es importante señalar que en 1660 describió los capilares en el pulmón de la rana, y con ello, identificó la red de conexiones entre arterias y venas para completar el circuito de la circulación que faltaba después de la notable descripción de William Harvey³ de la circulación de la sangre, unos años antes. Además, describió la anatomía macroscópica de los riñones en diferentes especies de animales, incluido el hombre. Posteriormente, con la ayuda de un microscopio con un aumento modesto de 25-30 veces, examinó cortes de riñón. En la búsqueda de conexiones procedió a inyectar en la arteria renal una mezcla de vino y una tintura negra; concluyó que la corteza renal, en vez de contener tejido fibroso, “estaba poblada por ‘glándulas’ pegadas a las arterias ‘como manzanas’... en la forma de un bello árbol” (*Figura 1*). Notó que las venas se originaban en el punto donde terminaban las arterias. Aun cuando no observó las uniones, concluyó que debía ser una red capilar semejante a la del pulmón. Postuló, además, que en esas glándulas la sangre se separaba de la orina.⁴

Malpighi comentó: “Me maravillé de esto, debido a las diversas sustancias que son separadas a través de estas glándulas por el proceso de Natura, ya que agua con sal, sulfuro y partículas similares pasan por ellas [...] Y cuando son de un mayor tamaño o de forma diferente, no entran en estos pequeños poros y en los diminutos espacios de este cuerpo excretor, y no son excretadas.”⁴

Esto permitió conocer que la sangre impulsada por el corazón llegaba a los tejidos (Harvey), y Malpighi describió que estos tejidos estaban constituidos por redes de pequeños vasos (capilares) y el modo como la sangre circulaba por ellos. Esto permitió investigaciones para conocer cómo la

sangre actúa en los tejidos y los tejidos en la sangre (Foster, mencionado por Homer W Smith).¹

Tuvieron que transcurrir 182 años para que alguien más realizara otro avance sustancial en el conocimiento del riñón.

William Bowman (1816-1892)

Bowman,⁵ en la Inglaterra de 1842, publicó un trabajo que iba a ser un parteaguas en las ciencias médicas.

Bowman, a la sazón de 26 años, era un preparador de anatomía en el *King's College* de Londres y asistente de cirujano en el hospital del mismo colegio.

Su curiosidad por el corpúsculo de Malpighi⁵ lo hizo estudiarlo por los siguientes dos años. Su método era desmadejar el riñón con una aguja para obtener muestras del tejido (fragmentos de glomérulos y túbulos) y observarlas bajo un microscopio 10 veces más poderoso que el empleado por Malpighi; es decir, con un aumento de 200 a 300 veces.

Lo que descubrió fue que los tubillos uriníferos poseían “una túnica externa de tejido homogéneo transparente (que he denominado membrana basal) alineado por epitelio. Los cuerpos de Malpighi, observé que eran masas esféricas de vasos diminutos investidos por una [...] cápsula de la misma membrana de la de los tubos”.⁵

Bowman concluyó que la cápsula era simplemente la membrana basal de los tubos expandida sobre los vasos del



Figura 1: Reproducción del experimento de Malpighi. Un líquido coloreado se inyectó en la arteria renal. En la porción terminal se visualizaron vasos diminutos y pequeñas glándulas redondas o “cuerpos granulares” que mostraban una conexión entre los vasos y estos corpúsculos.

ovillo glomerular, pero no fue hasta que inyectó bicromato de potasio y acetato de plomo en la arteria renal que fue capaz de demostrarlo. Con este método era claro que la cápsula se continuaba con la membrana basal de los túbulos. Además, concluyó: “el material inyectado, en muchos casos, pasó a través del ovillo y se extravasó hacia el tubo. Después de ésta, he realizado numerosas inyecciones en el riñón humano y en muchos otros animales, y en todos sin excepción me he encontrado con la misma disposición [...]

Tengo especímenes que mostraron esta misma continuidad en mamíferos, aves, reptiles y peces” (Figura 2).⁵

Bowman demostró que el ovillo glomerular cuelga dentro de la cápsula esférica, con una arteria que ingresa y se divide en el ovillo para después emerger en arteriola eferente, que forma una red que envuelve los tubos, y una arteriola que configura una red de vasos pequeños que irriga los tubulillos y se comunica de manera directa con las venas. El sistema porta arterial del glomérulo estaba estable-

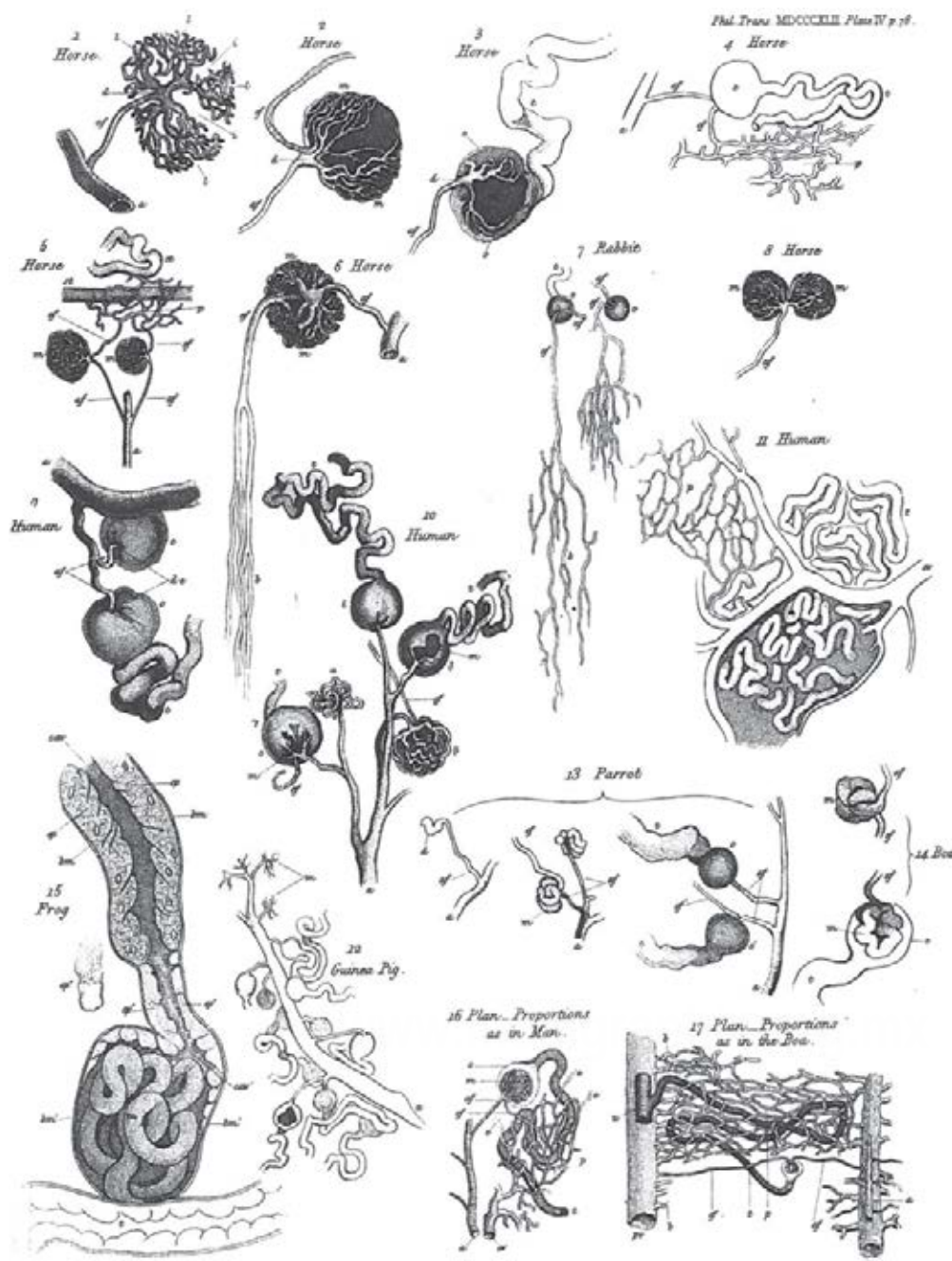


Figura 2:

Dibujos de Bowman de sus disecciones de los ovillos de Malpighi de riñones de diferentes especies animales. 1-6: Caballo. 7: Conejo. 8: Caballo. 9-11: Humano. 12: Cobayo. 13: Perico. 14: Boa. 15: Rana. 16: Plan de proporciones como en el hombre. 17: Plan de proporciones como en la boa.

cido por esta descripción magistral, así como la cápsula de Bowman, que envolvía el glomérulo y se continuaba hacia la luz tubular. Esta cápsula estaba herméticamente cerrada hacia el polo vascular, donde penetraban las arteriolas; por lo tanto, el líquido que trasudaba del ovillo glomerular sólo tenía un camino y era vaciarse hacia los túbulos. Precisó que los túbulos estaban conformados por una capa de células epiteliales que descansaban sobre la membrana basal y que cada túbulo estaba unido a un solo glomérulo y vertía su contenido de forma progresiva hacia tubos más grandes o colectores. Con inyecciones de colorantes en la arteria renal, Bowman demostró que la arteriola eferente que emergía de los glomérulos se encargaba de irrigar las paredes de los túbulos (*Figura 3*). Sus especulaciones funcionales no fueron tan afortunadas, ya que concluyó —sin ninguna evidencia experimental— que sólo era agua lo que pasaba a través de los capilares del ovillo glomerular y que su fin era arrastrar, al hacerlas entrar en solución, las sustancias secretadas por el epitelio de los túbulos, como urea, ácido úrico, sales y otros solutos.⁵

A pesar de que sus hipótesis funcionales fueron fallidas, su descripción anatómica fue tan perfecta que su contribución al progreso del conocimiento del riñón no puede soslayarse, ya que fue exacta, notable y trascendente.

Carl Friedrich Wilhelm Ludwig (1816-1895)

De manera simultánea, en Alemania, Carl Ludwig,⁶ un inquisitivo investigador independiente, estudió también la anatomía del riñón y sus conclusiones fueron en todo semejantes a las de Bowman. De sus investigaciones fisiológicas sobre el efecto que cambios en la presión arterial ejercían sobre el flujo urinario, elaboró una teoría física sobre la formación de la orina verdaderamente notable por su precisión. Ludwig concluyó que la fuerza responsable del filtrado glomerular era la presión hidrostática producida por la contracción del corazón; además, el filtrado que se formara debería contener todos los solutos encontrados en la orina. El volumen filtrado, especuló, debería reducirse de manera progresiva por reabsorción a lo largo de los túbulos, y los productos excretados, concentrarse en la orina final.

Ludwig sostenía que los capilares glomerulares eran semipermeables, dejaban pasar libremente el agua y los solutos de pequeñas dimensiones, pero detenían los coloides y los elementos figurados de la sangre. Su hipótesis sobre la ultrafiltración glomerular es aceptable aún hoy día. Además, suponía que la reabsorción tubular era por endósmosis, determinada por un aumento en la concentración de las proteínas peritubulares; este incremento era secundario al ultrafiltrado glomerular. A esto se unía un descenso de la presión arterial en los capilares peritubulares condicionado por la resistencia que ofrecía a la sangre su paso por el ovillo

16 Plan—Proportions as in Man.

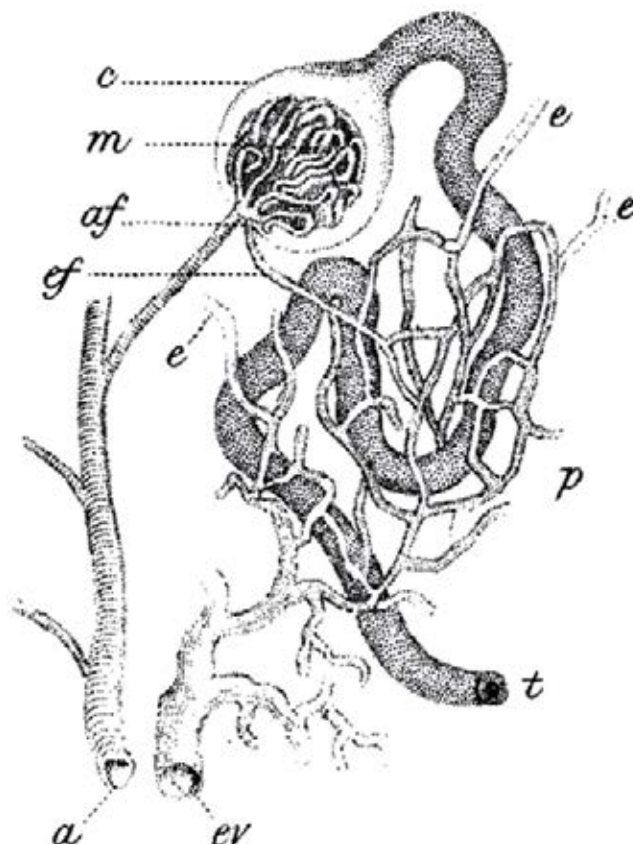


Figura 3: Ovillo de Malpighi humano (tomado de *Figura 2*). La arteria, **a**, da lugar a una rama terminal, arteriola aferente, **af**, hacia el glomérulo de Malpighi, **m**; de él emerge el vaso eferente, **ef**. Se puede ver otros vasos eferentes, **e**, **e**, **e**. Éstos entran al plexo de capilares, **p**, que rodean al tubo urinífero, **t**. De este plexo emerge la vena renal. [Texto adaptado del original].

glomerular. En la actualidad sabemos que la reabsorción tubular esta determinada, además de factores físicos, por mecanismos de transporte transcelular activos y pasivos. Pero las fuerza físicas peritubulares, determinadas por la caída de la presión hidrostática y aumento de la presión coloido-osmótica, conservan una importancia fundamental en la reabsorción de sodio y agua; de este modo, el concepto “ludwigiano” ha resistido los embates del tiempo.^{7,8} Ludwig, por otra parte, nunca aceptó la secreción tubular como un mecanismo agregado en la formación de la orina.

En esa época, la teoría reinante era la del vitalismo, que sostenía que un poder (no físico o químico) era activo en

organismos vivos y que esta fuerza vital era una condición necesaria para las funciones fisiológicas; sin embargo, había grupos que la impugnaban. Ludwig estaba entre los líderes del grupo antivitalista, que mantenía que “todos los fenómenos fisiológicos se podían explicar por las leyes de la física y la química inorgánica”.

En 1842, Ludwig fue nombrado *Privat-Dozent* en Marburgo. En esa ocasión, expuso dos pláticas inaugurales en latín que fueron traducidas y publicadas en 1843.^{7,8} Homer Smith¹ menciona que hay evidencias suficientes para demostrar que Ludwig desconocía en ese momento los trabajos de Bowman.

En la primera conferencia, Ludwig describió los estudios de la anatomía del riñón en el perro, conejo, cerdo, caballo y humano. Las observaciones incluyeron inyecciones de albúmina, tinturas, cera, cromato de plomo, índigo, tinta y una suspensión de sulfato de mercurio. Su interpretación de la ruta seguida por la sangre circulante en el riñón fue en todo similar a la de Bowman. En su segunda disertación, Ludwig comparó la composición química de la sangre con la de la orina e hizo hincapié en que la concentración urinaria de urea, sulfato y fosfato estaba mucho más elevada que en la sangre.

Basado en sus estudios de microdissección y químicos y a la luz de las leyes de la termodinámica y los principios fisicoquímicos, Ludwig propuso una teoría de la filtración glomerular y la reabsorción, como ya se describió, que es cardinal hasta el día de hoy. Postuló que los capilares glomerulares, igual que otros lechos capilares, son permeables al paso de todos los elementos de la sangre, con excepción de las proteínas y los lípidos. El líquido con el resto de los solutos difundía a través de la pared capilar impulsado por la presión hidrostática de la circulación determinada por la contracción del corazón. La separación de este filtrado es un proceso que no involucra a la secreción tubular.

Si no hay secreción, ¿cómo se explicaría la gran cantidad de sustancias encontradas en la orina? Ludwig especuló que el filtrado debía ser de la suficiente cuantía para contener todos esos solutos. Finalmente, concluyó que el volumen de orina excretado era menor al volumen filtrado; por lo tanto, los túbulos debían reabsorber esta diferencia.^{7,8}

Los estudios en el laboratorio de Ludwig y sus colaboradores apoyaban su hipótesis de la filtración-reabsorción sin asomo de vitalismo. En sus experimentos *in vitro* con membranas semipermeables entre sangre y orina, los componentes de la sangre pasaban a través de las membranas sin proteínas. Ludwig interpretó estos hallazgos como que, sometido a presión, el líquido filtrado lo hacía a través de poros pequeños en la membrana que no modificaban los constituyentes químicos del suero; esto es, se trataba de un ultrafiltrado. Para interpretar sus observaciones aplicó las nuevas leyes de la hidrodinámica. Además, estimó el

perfil de la presión hidrostática y su caída progresiva de la arteriola aferente, el glomérulo, la arteriola eferente y, de ahí, a los capilares peritubulares (Figura 4). La dilatación de los capilares del glomérulo se seguía de un estrechamiento de estos vasos, que causaba una reducción del flujo sanguíneo y un incremento en la presión del ovillo glomerular. La similitud entre los componentes de la orina y la sangre lo convenció de que los solutos excretados en la primera provenían primariamente de la segunda.

La gran percepción de Ludwig, que la separación de la orina de la sangre se iniciaba con una filtración impulsada por una fuerza física de presión, a través de la pared capilar de un fluido libre de proteínas, discrepaba en forma total de la hipótesis de la secreción de Bowman. La hipótesis de Ludwig requería que la cantidad de filtrado fuera suficiente

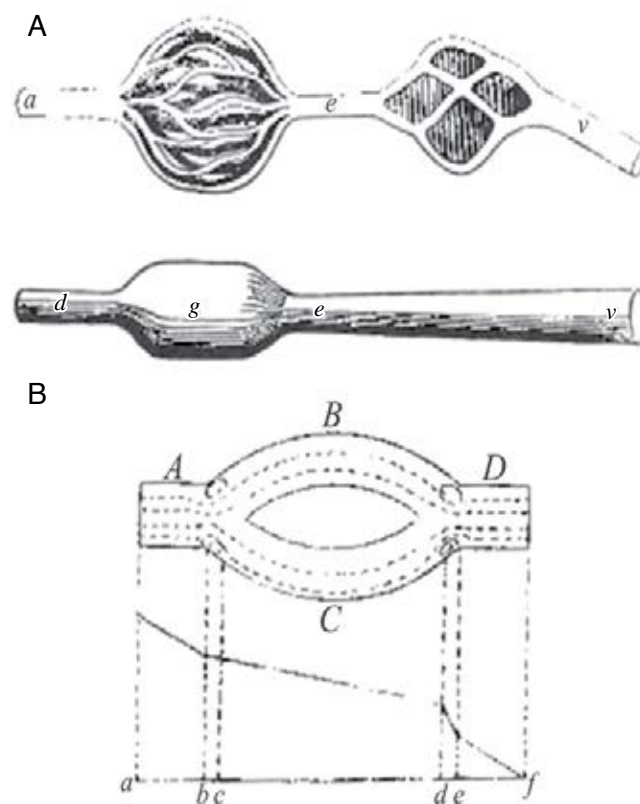


Figura 4: Ilustraciones por Ludwig. **A:** Capilares glomerulares y la red capilar peritubular (arriba) a áreas relativas de los vasos capilares y el glomérulo (abajo). **a**, Arteriola aferente; **g**, ovillo glomerular; **e**, arteriola eferente; **v**, vénula. **B:** Perfil de presiones a lo largo del lecho capilar; las letras inferiores corresponden a su localización en el lecho vascular. **A**, **a**, arteriola aferente; **b**, **c**, origen de dos capilares glomerulares (**B** y **C**); **d**, **e**, la unión de de los capilares para formar **D**, la arteriola eferente y el principio del capilar peritubular; **f**, el final de la red capilar peritubular. La línea continua ilustra la caída progresiva de la presión.

para contener todos los componentes de la sangre encontrados en la orina y que el exceso de filtrado se reabsorbiera en los túbulos para explicar el volumen de orina final. En esa era científica, el concepto ludwigiano⁷ representaba un *tour de force* intelectual y una gran valentía. La diferencia descansaba en los principios hidrodinámicos y la ausencia total de vitalismo de su postura.

Además, la teoría de Ludwig explicaba muchas observaciones. Entre ellas, el efecto de la deshidratación y la ingestión excesiva de agua sobre la diuresis, así como la presencia de glucosa y ácido úrico en la orina cuando su concentración estaba elevada en la sangre. Realizó observaciones tales como que elevar o bajar la presión modificaba la diuresis, que se conseguía con la elevación del uretero, que aumentaba la presión intrarrenal a más de 40 mmHg y reducía progresivamente el flujo de la orina. La sección de los nervios espláncnicos de un lado que se creía que aumentaba el flujo sanguíneo renal incrementaba el volumen de la orina de ese lado.

En fin, sus observaciones y las conclusiones derivadas de ellas son válidas hasta nuestros días.

Rudolf Peter Heinrich Heidenhain (1834-1897)

Heidenhain,^{8,9} otro gran fisiólogo alemán, tres décadas después, revivió la teoría de la secreción tubular. Profesor de fisiología en Breslau, Alemania, se graduó como médico en la Universidad de Berlín. Realizó su trabajo como estudiante graduado en el laboratorio de Berlín, dirigido por Johannes Müller. Heidenhain estudió la actividad muscular y desarrolló la bolsa Heidenhain-Pavlov (su estudiante), pero por lo que es realmente conocido es por sus investigaciones histológicas de los tejidos glandulares, que consistían en células que secretaban distintos fluidos. Se interesó, además, en la formación de la orina, y sus conclusiones al respecto se basaron en experimentos en el laboratorio y en cálculos matemáticos.

En conejos hipotensos y anúricos que de acuerdo con la hipótesis de Ludwig eran incapaces de tener filtrado glomerular, Heidenhain⁹ inyectó índigo carmín, y sus riñones fueron resecaados 15 minutos después; encontró que las células tubulares estaban teñidas intensamente de rojo, y una hora más tarde, la tintura estaba presente en la luz tubular. Concluyó que la orina se formaba por secreción que provenía de las células tubulares, por su actividad "vitalística". Heidenhain estimó que un adulto con dieta normal excreta alrededor de 35 g de urea en 24 horas, con una concentración de urea en sangre de 25 mg%. Heidenhain razonó que si se filtraban 50 mg de urea por minuto, se necesitarían no menos de 70 litros de filtrado glomerular en 24 horas para explicar la cantidad de urea excretada cada día. Si se toma en cuenta que el volumen de orina

es de dos litros al día, los túbulos tenían que reabsorber al menos 68 litros; Heidenhain consideró inconcebible este valor.¹⁰ Para él, la hipótesis de la ultrafiltración y la reabsorción era inaceptable. Con esas dos hipótesis en pugna terminó el siglo XIX.

Arthur Robertson Cushny (1866-1926)¹¹

Cushny era considerado el líder en farmacología de la Gran Bretaña. Obtuvo el grado de médico de la Universidad de Aberdeen. Llevó a cabo su trabajo de postgrado en la nueva especialidad de farmacología con Hugo Kronecker, asociado de Ludwig, en Berna, Suiza, y con Oswald Schmiedeberg en Estrasburgo. Temprano en su carrera escribió el libro *Farmacología y terapéutica*, el primero en su tipo publicado en inglés. Se interesó grandemente en la formación de la orina. Estimulado por Ernest H Sterling, editor de una serie de ensayos sobre avances en fisiología, Cushny escribió una monografía, que se publicó en 1917 con el título de *The secretion of the urine*,¹¹ un trabajo monumental para su tiempo, con más de 400 fichas bibliográficas, 15 capítulos y 250 páginas, y que tuvo un impacto decisivo en el conocimiento y estudio del riñón. Sin aportar ninguna evidencia experimental personal, elaboró lo que él denominó: "la teoría moderna de la formación de la orina".

En el capítulo cuatro de esa obra¹¹, replanteó la controversia Bowman-Heidenhain contra Ludwig. Aun cuando no eliminó del todo el vitalismo y reiteró el concepto de Ludwig de que los glomerulos son ultrafiltros, consideró que para que los túbulos reabsorbieran todo este enorme filtrado glomerular tenían que echar mano de mecanismos de reabsorción muy activos y eficientes; además, algunos de ellos debían ser muy selectivos para explicar la distribución de las distintas sustancias filtradas, que aparecen en la orina en cantidades variables. También retomó el concepto de Claude Bernard de que los riñones eran los maestros reguladores del medio interno, otra labor titánica del riñón. Esta monografía fue un parteaguas importante que permitió a los nuevos grupos despegar hacia lo que llamaremos la "fisiología moderna del riñón". Sin embargo, la controversia Bowman-Heidenhain versus Ludwig persistió, ya que Cushny no la resolvió, sino que dejó muchas dudas. Primariamente, no aceptó la teoría de la filtración-reabsorción de Ludwig y consideró que sólo tenía un interés histórico, ya que se le hacía difícil explicar la gran reabsorción tubular con sólo factores físicos, y sobre todo, que ésta fuera selectiva. De hecho, revivió en parte el concepto vitalista de Heidenhain para explicar la gran reabsorción tubular que era fundamental en la teoría del ultrafiltrado glomerular. De este modo, hasta unos años después, en 1924, con estudios puntuales, se resolvió esta controversia.

Alfred Newton Richards y JT Wearn

AN Richards¹²⁻¹⁴ nació en 1876 y se educó en Yale. Un curso de RH Chitenden, el líder de la nascente ciencia de fisiología química, fue una experiencia que determinó la carrera futura del Dr. Richards. Cuando Chitenden fue nombrado miembro de la facultad de la Universidad de Columbia en Nueva York, Richards se le unió y fue su primer alumno de Doctorado (PhD) del nascente Departamento de Fisiología Química. En 1910, ya doctorado, se le ofreció el puesto para organizar el Departamento de Farmacología de la Universidad de Pensilvania. En ese lugar inició experimentos de perfusión renal con una bomba diseñada por Cecil Drinker. Él creía que la controversia Ludwig versus Bowman-Heidenhain se podía resolver con experimentos en los que la presión de perfusión renal se mantuviera constante. La primera Guerra Mundial detuvo sus experimentos; sin embargo, durante ese periodo, Richards se unió al grupo de Henry Dale en Oxford para investigar el estado de choque secundario a heridas. Durante unos estudios realizados con histamina llegó a la conclusión de que los capilares poseían mecanismos intrínsecos de control.

En 1918, fue dado de baja del ejército, retornó a Pensilvania y, con Carl Schmidt, reanudó sus experimentos de perfusión renal en conejos. Con ese modelo aprendió que la administración de epinefrina mostraba una respuesta paradójica. Dosis pequeñas provocaban diuresis, mientras que a dosis altas el flujo de orina se detenía. Richards pensó que la explicación de este fenómeno residía en los capilares glomerulares. A dosis bajas, los capilares eferentes se constreñían un poco más que los aferentes, la presión glomerular se incrementaba y esto causaba diuresis. Por el contrario, a dosis elevadas, se constreñían ambas arteriolas, el flujo sanguíneo glomerular era insuficiente para generar filtrado y el flujo urinario se detenía.

Este bagaje de información fue lo que permitió a Richards y su laboratorio hacerse famosos en los años siguientes.¹²

Joseph T Wearn nació en 1893, se educó en el Colegio de Davison y se graduó en la Escuela de Medicina de Harvard. La guerra lo atrapó y fue comisionado oficial del servicio médico del ejército bajo las órdenes del Mayor Francis W Peabody. Al terminar la guerra, inició su residencia en medicina en el Hospital "Peter Bent Brigham" en Boston. Cuando decidió intentar una carrera en medicina académica,^{13,14} su amigo el Mayor Peabody le recomendó visitar al Dr. AN Richards; en ese sitio, le comentó, se estaba realizando trabajo experimental muy interesante. Visitó a Richards, que trabajaba a la sazón en un modelo de estudio de la circulación del riñón vivo de la rana. Este le ofreció una posición y él, ni tardo ni perezoso, la aceptó de inmediato.

Wearn llegó al laboratorio del Dr. Richards el año siguiente. Richards le dio a leer la monografía de Cushny.¹¹ En el laboratorio, Wearn aprendió a exponer el riñón de una rana anestesiada, lo que permitía su visualización directa bajo el microscopio. Richards había visitado al Dr. Robert Chambers para aprender una técnica que permitía insertar la punta de una pipeta capilar afilada en la pared de un eritrocito con un micromanipulador. Richards sugirió a Wearn que, usando la técnica de Chambers, inyectara directamente epinefrina en el glomérulo y observara su efecto sobre las arterias aferente y eferente; sin embargo, Wearn^{8,13} tenía una idea diferente. Él mismo relata: "Contradije la sugestión de Richards [...] con mi idea de atacar el problema tratando de obtener suficiente líquido glomerular para análisis y comparar estos resultados con los obtenidos de muestras de orina y sangre recolectadas de forma simultánea. La idea de obtener líquido glomerular nunca se me hubiera ocurrido si no hubiera realizado el trabajo de campo y la lectura de la monografía de Cushny. El Dr. Richards aceptó la idea instantáneamente y de todo corazón." ¿Qué tan frecuente es que el jefe y profesor acepte la idea de un recién llegado? La idea de Richards era buena, pero consideró que la idea de Wearn era mejor.

El resultado fue uno de los experimentos más simples y sin ambigüedades que todo investigador anhela y rara vez logra.

Wearn¹² relata cómo fue el primer experimento exitoso.¹³

"Después de mucha práctica pude, con certeza razonable, insertar una pipeta en el glomérulo sin tocar el ovillo glomerular o romper la cápsula [...] Una tarde temprano, preparé una rana e inserté la pipeta en el glomérulo sin tocar el ovillo capilar y sin interrumpir su flujo de sangre. En un poco menos de una hora, la punta de la pipeta comenzó a mostrar algo de líquido [...] la circulación en el ovillo glomerular era rápida y el fluido en la pipeta se incrementó en forma continua. Era la primera vez que veíamos esa 'copiosa' cantidad de líquido glomerular. El Dr. Richards y yo caminábamos de puntitas alrededor del laboratorio para evitar sacudir la preparación. Ya más entrada la tarde, terminé la recolección, transferí el fluido exitosamente a un tubo capilar y [...] terminé con cuatro muestras [...] Guardamos los tubos en refrigeración [con las muestras de sangre y orina obtenidas de manera simultánea], nos retiramos a celebrar a casa del Dr. Richards, donde tomamos un par de cocteles y después nos fuimos a ver un show de burlesque.

El protocolo estaba establecido e iniciamos los experimentos con premura.¹³ Tuvimos múltiples interrupciones en puntos cruciales en nuestros experimentos, así que decidí trabajar por las noches. Esto probó ser ideal [...] Después de unas cuantas noches, Richards vino a su oficina

y vio luz en mi laboratorio e investigó: ‘Qué gran idea’, me dijo, y desde ese momento trabajamos por las noches.”

Los resultados de los análisis del fluido glomerular arrojaron los siguientes datos:

1. El filtrado glomerular estaba libre de proteínas en 11 ranas estudiadas.
2. El filtrado contenía cloro. La orina de la vejiga fue negativa para cloro en seis ranas y positiva en dos.
3. El filtrado contenía glucosa, pero no había glucosa en la orina. Después de la infusión intravenosa de glucosa, la orina de la vejiga se volvió positiva para glucosa cuando la glucosa en sangre alcanzó valores de 65 mg/100 mL.

El primer hallazgo estableció que el líquido glomerular separado de la sangre estaba libre de proteínas, el punto cardinal de la hipótesis de Ludwig. El segundo hallazgo demostró que el cloro es filtrado por el glomérulo. El cloro filtrado fue reabsorbido por los túbulos renales, aun cuando en algunas ranas, no en forma completa, lo que demostraba que el cloro (y el sodio) eran filtrados y reabsorbidos por el túbulo renal, tal como Ludwig había sugerido. El tercer hallazgo fue que la glucosa es filtrada y después reabsorbida hasta alcanzar un umbral de reabsorción. El concepto de diferente reabsorción de los solutos filtrados por el túbulo se estableció claramente.

En un segundo grupo de experimentos, Wearn¹⁴ administró índigo carmín a la rana y observó el riñón por el microscopio. Una pipeta fue insertada en el glomérulo para obtener fluido glomerular y orina recolectada al mismo tiempo. Después de la inyección endovenosa de la tintura, en los siguientes 30 segundos, las arterias y el capilar glomerular se tiñeron intensamente de azul. El líquido glomerular (en lo habitual, incoloro) tomó un color azul claro. A continuación, todos los vasos visibles, incluidas las venas, se tiñeron de azul, de tal manera que todo el riñón se opacó. El color rápidamente desapareció en los siguientes 3-5 minutos. De 10 a 30 minutos después, los túbulos —que son transparentes— se hicieron más visibles debido a la presencia de gránulos azules en su pared celular. Hilos de tintura aparecieron en la luz tubular.

El fluido obtenido del glomérulo era de color azul claro, mientras que la orina de la vejiga estaba teñida de azul intenso.

Los experimentos con índigo carmín demostraron que la tintura se filtraba en el glomérulo, contradiciendo a Heidenhain. La presencia del pigmento en las células tubulares y en la luz tubular era consistente, pero no demostraba con claridad la secreción, porque la sola reabsorción del filtrado por el túbulo podía, por sí misma, concentrar grandemente el pigmento en la orina.

Estos experimentos dirimieron la vieja controversia de 80 años, al establecer que la formación de la orina se iniciaba con el paso de un ultrafiltrado de la sangre libre de proteínas a través de los capilares glomerulares, seguido de la reabsorción del filtrado por los túbulos renales.

Después de dos años en el laboratorio de Richards, Wearn regresó a Harvard para iniciar una distinguida carrera en el campo de la medicina.

En los siguientes 15 años, un número sustancial de trabajos sobre la composición del líquido glomerular y tubular fueron publicados por el grupo de Richards, con él como autor.^{12,14-20} Su grupo desarrolló métodos microanalíticos para estimar la composición del filtrado glomerular en la rana, en el *Necturus*²¹ y en el riñón de la serpiente. De cada una de las muestras analizadas en estos animales, el filtrado glomerular siempre estuvo libre de proteínas. Se diseñó un método para medir la función tubular, que consistió en un bloqueo con una gota de mercurio proximal y distal del túbulo que se perfundía con una solución conocida, y después se extraía para ser analizada. Los resultados mostraron que había diferencias de función en los diversos segmentos de túbulo estudiados.

Una década después, un alumno del Dr. Richards, el Dr. Arthur Walker, en colaboración con Phyllis Bott, Jean Oliver y Muriel MacDowell, adaptó el método y lo aplicó a mamíferos, específicamente ratas, cobayos y ratas del desierto (*opossum*). Sus hallazgos fueron publicados en 1941.^{22,23} Los resultados fueron semejantes a los encontrados en anfibios.

Aun cuando los estudios de Richards y sus colaboradores sugerían con fuerza que los túbulos renales no sólo reabsorbían, sino que también secretaban solutos, fueron finalmente los experimentos de AK Marshall^{24,25} los que proveyeron las evidencias definitivas. Un pigmento, la sulfonftaleína (PSP), fue inyectado en perros anestesiados y se obtuvieron muestras de sangre y orina. La concentración de PSP en tejido renal estaba en un orden de magnitud mayor que en otros tejidos del organismo. La cantidad de PSP urinaria excedía la cantidad de PSP filtrada, no unida a proteínas, evidencia clara de la existencia de secreción tubular.

La Segunda Guerra Mundial suspendió las investigaciones fisiológicas con el empleo de técnicas de micropunción. Éstas fueron reanudadas en 1950, en Suiza, por Heinrich Wirz —discípulo de Phyllis Bott—, Karl Ulrich en Alemania, Carl Gottschalk, en los EUA y, eventualmente, muchos otros.⁸ Maurice Burg, en los institutos de salud en Bethesda, adaptó la técnica de perfusión de túbulos *in vivo* a la de perfundir segmentos de túbulos *in vitro*. Esto le permitió variar en forma experimental la composición tanto de la solución de perfusión como de la solución que bañaba el segmento tubular. Esta técnica de perfusión *in vitro* inició

otro avance que permitió entender aún mejor la función renal. Burg y sus colegas publicaron su primer trabajo con esta nueva técnica en 1966;^{25,26} en ese mismo año falleció el Dr. AN Richards.

Sin duda, los grandes avances en el conocimiento de la formación de la orina basados en los estudios de Wearn y Richards en 1923, al resolver la controversia a favor de la teoría de filtración-reabsorción de Carl Ludwig, fueron un homenaje justo para este portentoso visionario y el despegue de la fisiología moderna del riñón. En escritos posteriores relataré otros avances nacidos de la técnica de micropunción, como lo fue el mecanismo de concentración de la orina, postulado inicialmente por Wirz, Hargitay y Kuhne.

REFERENCIAS

- Smith HW. Renal physiology. In: Fishman AF, Richards DW. *Circulation of the blood: men and ideas*. New York: Oxford Univ. Press; 1964. pp. 545-606.
- Malpighi M. *De viscerum structura exercitatio anatomica*. Bologna ex typ. J. Montij, 1666. [citado en Smith (1)].
- Harvey W, Leake CD. *Exercitation anatomica de motu cordis et sanguinis in animalbus with an English traslation and annotation*. Springfield, Ill.: Thomas; 1928.
- Mezzogiorno A, Mezzogiorno V. Marcello Malpighi. *Am J Nephrol*. 1997; 17: 269-273.
- Bowman W. On the structure and use of the malpighian bodies of the kidney, with observations on the circulation through that gland. *Philos Trans R Soc Lond*. 1942; 132: 57-80.
- Thurau K, Davis JM, Häberle DA. Carl Friedrich Wilhelm Ludwig: the founder of modern renal physiology. *Pflügers Arch*. 1996; 432 (3 Suppl): R68-R72.
- Ludwig C. *De viribus physicis secretionem urinae adjuvantibus* [Thesis]. Marburg, Germany; 1842. [Mencionado en la referencia 8]
- Jamison RL. Resolving an 80-yr.-old controversy: the beginning of the modern era of renal physiology. *Adv Physiol Educ*. 2014; 38 (4): 286-295.
- Heidenhain R, Neisser A. Versuche über den Vorgang der Harnabsonderung. *Pflügers Arch Ges Physiol*. 1874; 9: 1-27.
- Heidenhain R. *Die Harnabsonderung*. En: Hermann's Handbuch der Physiol. Leipzig: Vogel; 1883, Vol. 5, pp. 279-373. [Mencionado en la referencia 8]
- Cushny AR. *The secretion of the urine*. London: Longmans, Green and Co; 1917.
- Richards AN, Walker AM. Quantitative studies of the glomerular elimination of phenol red and indigo carmine in frogs. *J Biol Chem*. 1930; 87: 479-498.
- Wearn JT. Composition of glomerular urine with conclusive evidence of reabsorption in the renal tubules. *Physiologist*. 1980; 23 (5): 1-4.
- Wearn JT, Findley T, Cochrane DW, Graham J. On working with Dr. Richards in Philadelphia. Recollections. *Ann Intern Med*. 1969; Suppl 8: 45-50.
- Bordley J 3rd, Richards AN. Quantitative studies of the composition of glomerular urine: VIII. The concentration of uric acid in glomerular urine of snakes and frogs, determined by an ultramicroadaptation of Folin's method. *J Biol Chem*. 1933; 101: 193-221.
- Bordley J 3rd, Hendrix JP, Richards AN. Quantitative studies of the composition of glomerular urine: XI. The concentration of creatinine in glomerular urine of frogs determined by an ultramicroadaptation of Folin's method. *J Biol Chem*. 1933; 101: 255-267.
- Freeman B, Livingston AE, Richards AN. A second series of quantitative estimations of the concentration of chlorides in glomerular urine from frogs. *J Biol Chem*. 1930; 87: 467-477.
- Hayman JM, Richards AN. Deposition of dyes, iron, and urea in the cells of a renal tubule after their injection into its lumen; glomerular elimination of the same substances. *Am J Physiol*. 1926; 79: 149-169.
- Richards AN, Walker AM. Methods of collecting fluid from known regions of the renal tubules of amphibia and of perfusing the lumen of a single tubule. *Am J Physiol*. 1937; 118: 111-120.
- Walker AM, Hudson CL, Findley T Jr., Richards AN. The total molecular concentration and the chloride concentration of fluid from different segments of the renal tubule of amphibia. The site of chloride reabsorption. *Am J Physiol*. 1937; 118: 21-129.
- Westfall BB, Findley T, Richards AN. Quantitative studies of the composition of glomerular urine: XII. The concentration of chloride in glomerular urine of frogs and Necturi. *J Biol Chem*. 1934; 107: 661-672.
- Walker AM, Bott PA, Oliver J, MacDowell MD. The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1941; 134: 580-595.
- Walker AM, Oliver J. Methods for the collection of fluid from single glomeruli and tubules of the mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1941; 134: 562-579.
- Marshall AK Jr. The secretion of urine. *Physiol Rev*. 1926; 6: 440-484.
- Marshall AK Jr, Crane MM. The secretory function of the renal tubules. *Am J Physiol*. 1924; 70: 465-488.
- Burg M, Grantham J, Abramow M, Orloff J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol*. 1966; 210: 1293-1298.