

ORIGINALES

Ausencia de alteraciones en la carga iónica de la membrana basal glomerular durante el síndrome nefrótico inducido por aminonucleósido de puromicina

M. Arévalo Gómez y E. Carrascal Marino

Departamento de Histología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

RESUMEN

La inyección intraperitoneal de aminonucleósido de puromicina en ratas induce en estos animales la aparición de alteraciones patológicas en la barrera de filtración glomerular que simulan el síndrome nefrótico de cambios mínimos (nefrosis lipoidea humana). En el presente trabajo hemos estudiado si este síndrome nefrótico experimental provoca alteraciones en las cargas iónicas de la membrana basal glomerular. Para estos propósitos hemos utilizado un trazador aniónico, ácido tánico, y dos trazadores catiónicos, rojo de rutenio y ferritina cationizada. Los animales se sacrificaron a los siete, quince y treinta días de la inyección del tóxico, recogiendo la orina semanalmente para detectar la existencia de proteinuria. Los hallazgos ultraestructurales revelan las alteraciones morfológicas descritas clásicamente en el síndrome nefrótico inducido por aminonucleósido de puromicina en las ratas sacrificadas a los siete y quince días. Estas lesiones habían desaparecido en los animales sacrificados a los treinta días. No obstante, se ha podido observar que la localización de los trazadores empleados para detectar las cargas electrostáticas de la membrana basal glomerular permanece constante, sin pérdida apreciable de los mismos, a lo largo del período de estudio. Concluimos que la barrera de cargas iónicas de la membrana basal glomerular no presenta alteraciones durante el curso de la nefrosis inducida por aminonucleósido de puromicina, a pesar de existir modificaciones ultraestructurales importantes y proteinuria abundante, por lo que no puede imputarse totalmente a estas cargas el que, en condiciones normales, detengan la salida de proteínas plasmáticas al espacio urinario.

Palabras clave: **Membrana basal glomerular. Carga iónica. Nefrosis. Aminonucleósido de puromicina.**

ABSENCE OF ALTERATIONS IN THE IONIC CHARGE OF THE GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE DURING NEPHROSIS INDUCED BY PUROMYCIN AMINONUCLEOSIDE

SUMMARY

Puromycin aminonucleoside injected intraperitoneally into rats in a single dose induces the appearance of pathological alterations in the glomerular filtration

Correspondencia: Dr. M. Arévalo Gómez.
Departamento de Histología.
Facultad de Medicina.
Fonseca, s/n. 37007 Salamanca.

Recibido: 18-III-86.
En forma definitiva: 2-V-86.
Aceptado: 5-V-86.

barrier which mimic minimal change nephrotic syndrome (Human lipoid nephrosis). In the present work we studied whether the experimental nephrotic syndrome leads to alterations in the ionic charge of the glomerular basement membrane. To do so we used an anionic tracer, tannic acid, and two cationic tracers, ruthenium red and cationized ferritin. The animals were sacrificed at 7, 15 and 30 days post-injection of puromycin aminonucleoside. Urine was collected weekly for the detection of proteinuria. Ultrastructural findings revealed the classical morphological changes of aminonucleoside nephrosis in the rats sacrificed at 7 and 15 days. These lesions were seen to disappear in the animals sacrificed at 30 days. However, the deposits of the tracer on the glomerular basement membrane remained constant with no appreciable losses throughout the experimental period. These results show that no significant alterations take place in the ionic charge of the glomerular basement membrane during the course of puromycin aminonucleoside induced nephrosis.

Key words: *Glomerular basement membrane. Ionic charge. Nephrosis. Puromycin aminonucleoside.*

Introducción

La importancia de que la barrera de filtración glomerular se mantenga en perfectas condiciones, tanto estructural como funcionalmente, se pone en evidencia cuando el mencionado filtro sufre un aumento anormal de su permeabilidad, sobreviniendo entonces una pérdida de proteínas plasmáticas a la orina. Este hecho ha motivado que se realicen múltiples estudios con el fin de desvelar los componentes estructurales de la barrera glomerular, sus características bioquímicas y la relación morfofuncional que existe entre ellos para impedir que, en condiciones normales, aparezca proteinuria. En términos generales, la posibilidad de que una macromolécula atraviese el filtro glomerular depende de su tamaño, carga eléctrica y configuración molecular, además de las condiciones de flujo y presión plasmáticas en el capilar glomerular. (Para una revisión más amplia consultar las referencias ¹ y ².)

La membrana basal glomerular (MBG), considerada como el filtro principal para macromoléculas plasmáticas en el riñón ³, está compuesta por colágeno de los tipos IV⁴ y V⁵, los proteoglicanos heparán sulfato y condroitin sulfato ⁶⁻⁸ y las glicoproteínas entactina ⁹, nidógeno ¹⁰ y laminina ¹¹. De todos ellos se cree que es el heparán sulfato (HS) el responsable de los lugares aniónicos presentes en la MBG ^{12, 13}, confiriendo a la misma una gran electro-negatividad, hecho que evitaría el paso de proteínas a través de esta membrana basal, ya que la destrucción de HS mediante digestión enzimática con heparitinasa permite una mayor permeabilidad a las macromoléculas. Además, en determinados modelos patológicos experimentales se ha descrito que la proteinuria sucede a una alteración de la barrera de car-

gas electrostáticas que posee la MBG ¹⁴⁻¹⁶, sin que, aparentemente, se vean afectados el resto de dispositivos del filtro ¹⁷. Esta pérdida de cargas negativas sería debida a una disminución en la síntesis de HS o a un aumento de su degradación ¹⁸. Sin embargo, otros investigadores no encuentran que exista pérdida de lugares aniónicos en los mismos modelos experimentales ¹⁹⁻²¹.

Basándonos en nuestras observaciones sobre un modelo experimental de diabetes química por estreptozotocina ²² hemos efectuado en el presente trabajo un estudio de las cargas eléctricas de la MBG, tras provocar un síndrome nefrótico de cambios mínimos mediante la inoculación de aminonucleósido de puromicina ^{23, 24}. Dicha nefrosis aminonucleosídica es reversible para las dosis que hemos empleado, permitiendo, por tanto, analizar la cinética de la membrana desde que sufre la alteración hasta que se recupera y vuelve a la normalidad.

Para detectar los componentes electrostáticos a lo largo de la prueba se han utilizado un marcador aniónico, ácido tánico y dos marcadores catiónicos, rojo de rutenio y ferritina cationizada.

Material y métodos

Se han utilizado 21 ratas albinas, machos y hembras indistintamente, con un peso que oscilaba al inicio de la prueba entre 125 y 150 gramos. Estos animales recibieron por vía intraperitoneal una inyección única de aminonucleósido de puromicina (Sigma Chemical Company) a una dosis de 10 mg. por 100 g. de peso corporal, disueltos en suero salino al 0,9 %. Se utilizaron nueve animales control, a los que se inyectó el suero salino solamente. Los anima-

les fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, recogiendo la orina semanalmente, que fue analizada por medio de tiras reactivas en un aparato Clin-Tek AMES.

Las ratas se sacrificaron a los siete, quince y treinta días (siete cada vez, de las cuales se utilizaron dos para cada una de las técnicas con trazadores y una para realizar la técnica habitualmente empleada en microscopia electrónica). Los animales control se sacrificaron en los mismos períodos (tres cada vez). Todos fueron anestesiados previamente con hidrato de cloral al 30 %, 0,1 ml/100 g. de peso.

Técnica del ácido tánico

Tras extirpar los riñones se tallaron microbloques de 1 mm³ de corteza renal que se fijaron en una solución compuesta por ácido tánico (Merck) al 8 % en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 y glutaraldehído al 2,5 % en el mismo buffer, a temperatura ambiente durante noventa minutos. Transcurrido este tiempo los bloques se lavaron con buffer y se posfijaron en tetróxido de osmio al 1 % durante una hora a 4° C; posteriormente se deshidrataron en series crecientes de acetona y se incluyeron en resina Durcupan.

Técnica del rojo de rutenio

Los animales se perfundieron por vía cardíaca, a través del ventrículo izquierdo, primero con suero fisiológico heparinizado durante un minuto para efectuar el lavado sanguíneo total, seguido inmediatamente por una solución compuesta por glutaraldehído al 3,6 % en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 y rojo de rutenio al 1 % (Sigma Chemical Company), purificado según la descripción de Luft²⁵ durante sesenta minutos. A continuación se extirparon los riñones y se retallaron microbloques que se lavaron en buffer cacodilato (tres pases de diez minutos), tras lo cual los tejidos se posfijaron durante tres horas a temperatura ambiente en una mezcla de rojo de rutenio al 1 % y tetróxido de osmio al 1 %. Se deshidrataron e incluyeron según describimos más arriba.

Técnica de la ferritina cationizada

Las ratas utilizadas para esta técnica fueron inyectadas intravenosamente con una dosis de 0,5 ml/100 g. de peso corporal de ferritina cationizada (ferritina de bazo de caballo copulada con N,N-dimetil-1-3-propanodiamina en suero fisiológico 0,15 M a una concentración de 10 mg/ml. (Sigma Chemical Company). Transcurridos quince minutos desde la inyección se extirparon los riñones, y tras tallar pequeños bloques de corteza renal éstos se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 durante noventa minutos, lavando a continuación las piezas en buffer y posfijándolas en tetró-

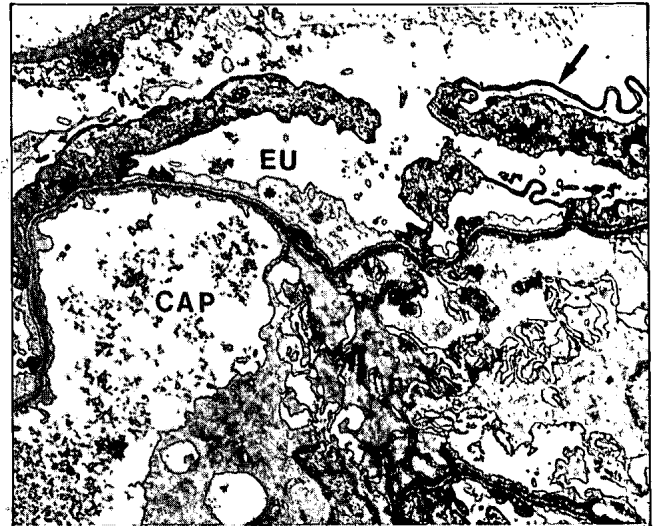


Fig. 1.—Semipanorámica de glomérulo de una rata sacrificada a los siete días, en la que se aprecian las lesiones ultraestructurales debidas al aminonucleósido de puromicina. Asterisco: fusión de los pedicelos. CAP: luz del capilar glomerular. EU: espacio urinario. Flecha: desaparición citoplasmática (18.900 X).

xido de osmio al 1 % durante una hora, deshidratando e incluyendo en resina finalmente.

De todos los bloques preparados se efectuaron cortes ultrafinos con cuchillas de cristal en un ultramicrotomo LKB Ultratome III; dichos cortes fueron examinados en un microscopio electrónico Philips EM 201, con un potencial de aceleración de 40 kV. Solamente se contrastaron con plomo y uranio las rejillas preparadas a partir de las piezas procesadas con ácido tánico.

Resultados

Entre las cuarenta y ocho y las setenta y dos horas tras la inyección todos los animales inoculados con aminonucleósido de puromicina presentaron oliguria, que se acentuó a medida que pasaba el tiempo. Las proteínas en orina, que eran negativas el día de la inyección, se manifestaron hasta alcanzar valores de entre 100 y 300 mg/dl. a los siete días, manteniéndose estas cifras a los quince días, y a partir de entonces fueron disminuyendo, hasta que a los treinta días sólo se detectaron indicios de proteinuria. Al mismo tiempo desapareció la oliguria, mostrando los animales supervivientes un aspecto saludable a los treinta días. Los animales control no exhibieron proteinuria en ningún momento a lo largo del período de estudio.

Los glomérulos de los animales sacrificados a los siete días de la inyección del tóxico muestran una fusión pedicelar masiva y difusa, apareciendo en el citoplasma de los podocitos grandes vesículas y

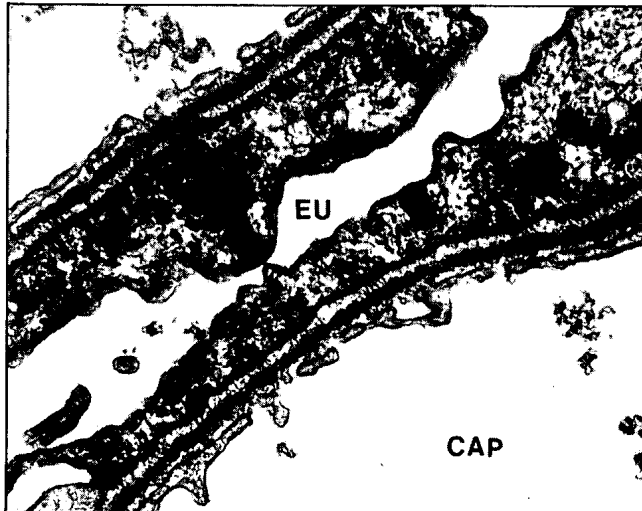


Fig. 2.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los siete días. Técnica del ácido tánico. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario (84.000 X).

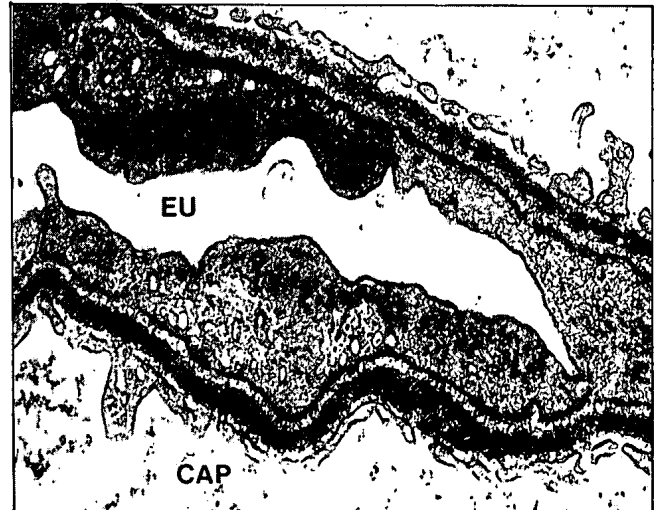


Fig. 3.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los quince días. Técnica del ácido tánico. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario (84.000 X).

abundantes fagolisosomas. En algunas zonas el citoplasma está adelgazado, formando finas láminas, hasta su casi total desaparición. La MBG conserva su aspecto y morfología normal, no observándose tampoco alteraciones en el endotelio del capilar glomerular (fig. 1). A los quince días se aprecia en todos los animales una recuperación parcial de la morfología normal de los podocitos, persistiendo, no obstante, zonas de fusión amplias en las que es posible apreciar las lesiones estructurales citadas más arriba. En los animales sacrificados a los treinta días aparece una recuperación morfológica completa.

A los siete días postinyección (p.i.) en las muestras tratadas con ácido tánico se aprecia que el trazador ha reaccionado sobre todo con la lámina densa de la MBG, que aparece contrastada en su totalidad. Además, en ambas láminas claras se aprecian depósitos del trazador en forma de filamentos perpendiculares a la lámina densa (fig. 2). Esta misma disposición del trazador se observó a los quince días (fig. 3) y a los treinta días p.i. (fig. 4), a pesar de existir en este último estadio una recuperación tanto estructural como funcional de las alteraciones glomerulares.

El rojo de ruténio aparece a los siete días depositado en las láminas claras, sobre todo en la lámina clara externa, en forma de partículas electrodensas de 55-65 nm, con un espaciado entre las mismas de aproximadamente 20 nm (fig. 5). A los quince días se mantiene la misma disposición del trazador (fig. 6), y a los treinta días, aunque se aprecia una recuperación estructural del glomérulo, las partículas electrodensas siguen apareciendo de forma idéntica a lo descrito anteriormente (fig. 7).

La ferritina cationizada se presenta, a los siete días de la inyección del tóxico, depositada en la MBG,

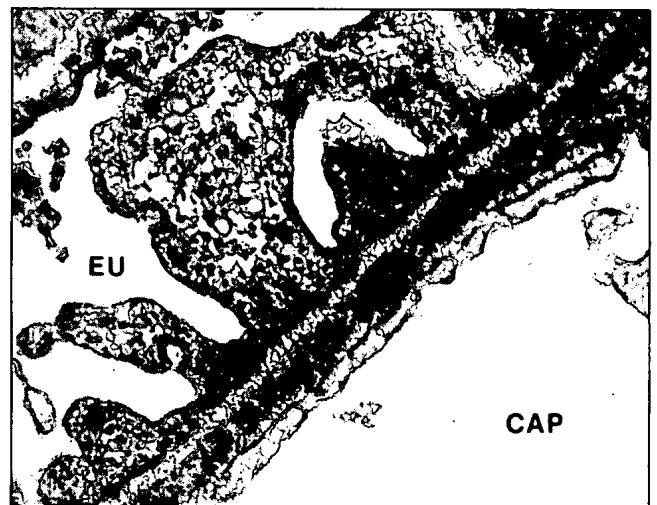


Fig. 4.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los treinta días. Técnica del ácido tánico. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario (126.000 X).

sobre todo en la lámina clara interna, apreciándose en forma de acúmulos de partículas de un diámetro aproximado de 6 nm. Estas partículas aparecen también a nivel de la lámina clara externa, pero con una intensidad mucho menor (fig. 8). A los quince y treinta días se aprecia la misma disposición del trazador descrita anteriormente (figs. 9 y 10). En ningún caso atraviesan las partículas de ferritina la barrera de filtración glomerular, ya que no se han observado en el espacio urinario.

Los glomérulos de los animales control no presentaron alteración estructural alguna a lo largo de la prueba; sin embargo, la disposición de los trazadores ultraestructurales sobre la MBG es la misma que la observada en las ratas nefróticas (figs. 11, 12 y 13).

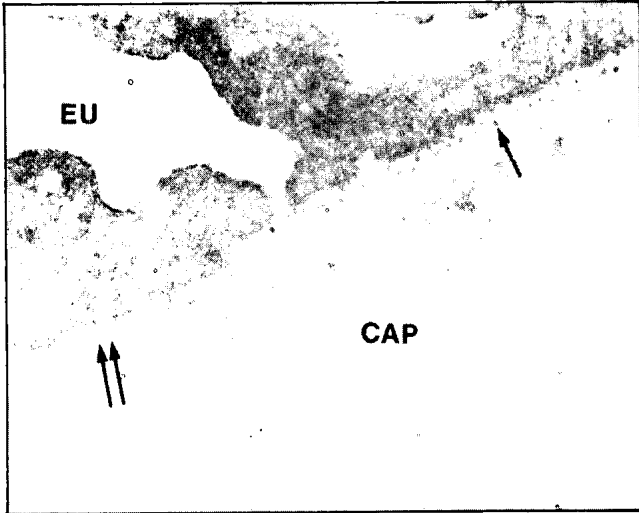


Fig. 5.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los siete días. Técnica del rojo de rutenio. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario. Flechas: lugares aniónicos marcados por el trazador (126.000 X).

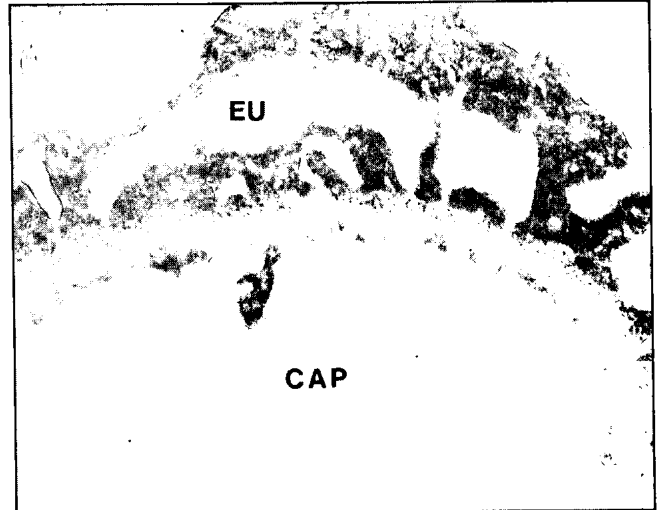


Fig. 7.—Sección ligeramente sagital de la MBG de una rata sacrificada a los treinta días. Técnica del rojo de rutenio. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario (63.000 X).

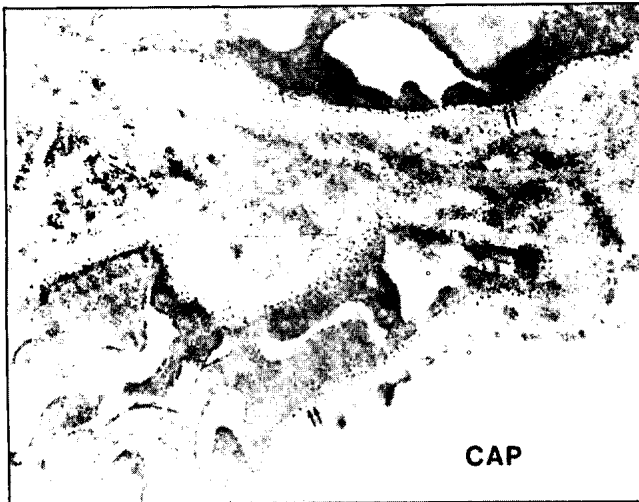


Fig. 6.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los quince días. Técnica del rojo de rutenio. CAP: luz del capilar. Flechas: lugares aniónicos (67.500 X).

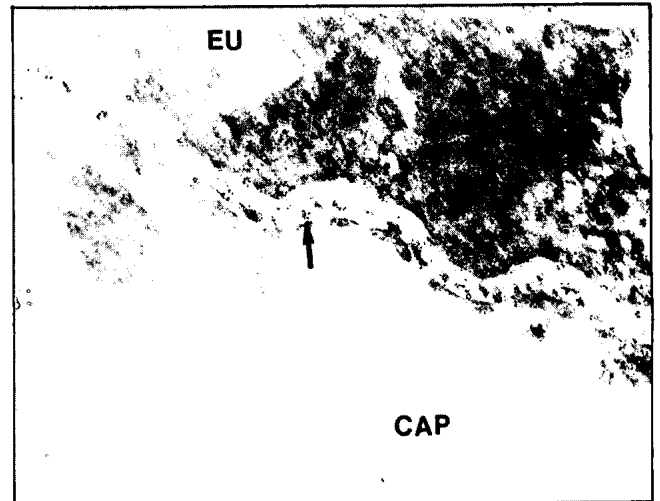


Fig. 8.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los siete días. Técnica de la ferritina cationizada. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario. Flecha: partículas de ferritina en la lámina clara interna (84.000 X).

Discusión

De los datos obtenidos en el presente trabajo se desprende que las cargas electrostáticas que posee la MBG permanecen inalteradas durante el curso de la nefrosis por aminonucleósido de puromicina, al igual que sucediera en otros modelos experimentales estudiados por nosotros²², a pesar de que en la nefrosis aminonucleosídica la proteinuria es de mucha mayor intensidad durante el período activo del síndrome. Este proceso se induce mediante la inyección de un aminonucleósido (6-dimetilaminopurina-3-amino-D-ribosa) preparado a partir de la puromicina²⁶; estructuralmente es análogo del aminoacil-s-RNA. Se

utiliza como medicamento antineoplásico y su mecanismo de acción se basa en la afectación de la biosíntesis proteica en la etapa ribosomal, produciendo liberación de cadenas polipeptídicas incompletas. El mecanismo por el que causa la nefrosis es desconocido, pero pudiera ser debido a un defecto en la síntesis de uno o varios componentes de la MBG¹⁵.

Si el defecto fuera a expensas de una desaparición de los lugares aniónicos de la MBG, las mencionadas cargas negativas no serían detectadas mediante la ferritina cationizada, ya que este trazador catiónico es específico solamente para los grupos sulfato presentes en el heparán sulfato. Dichos radicales son los que ocasionan los lugares aniónicos, ya que se ha demos-

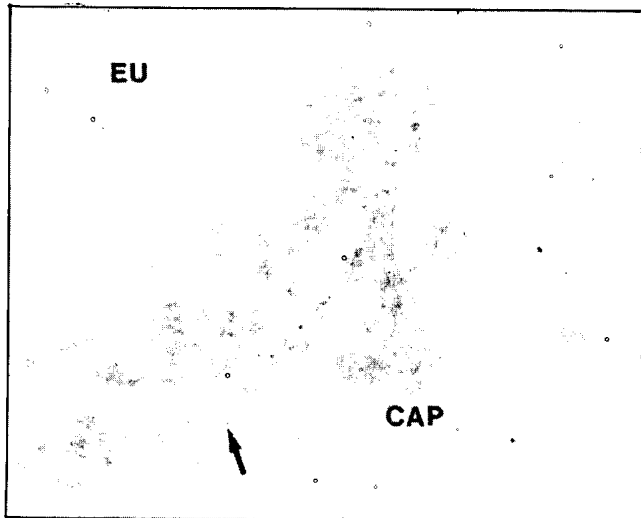


Fig. 9.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los quince días. Técnica de la ferritina cationizada. CAP: luz del capilar. EU: espacio urinario. Flecha: acúmulo de partículas de ferritina (84.000 \times).

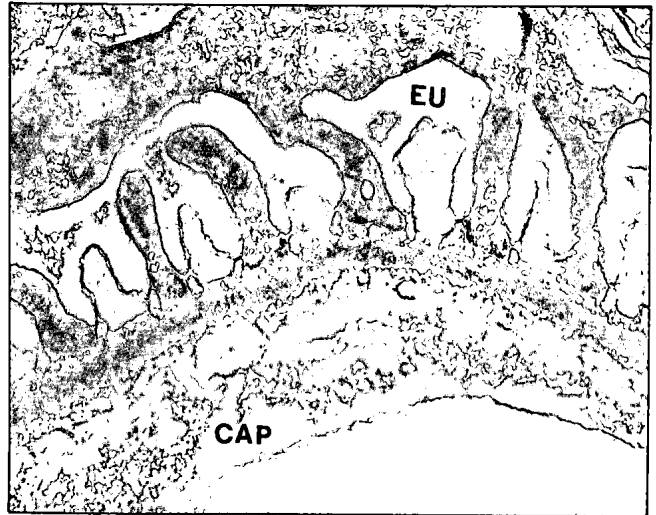


Fig. 11.—Sección transversal de la MBG de una rata control. Técnica del ácido tánico. EU: espacio urinario. CAP: capilar glomerular (115.000 \times).

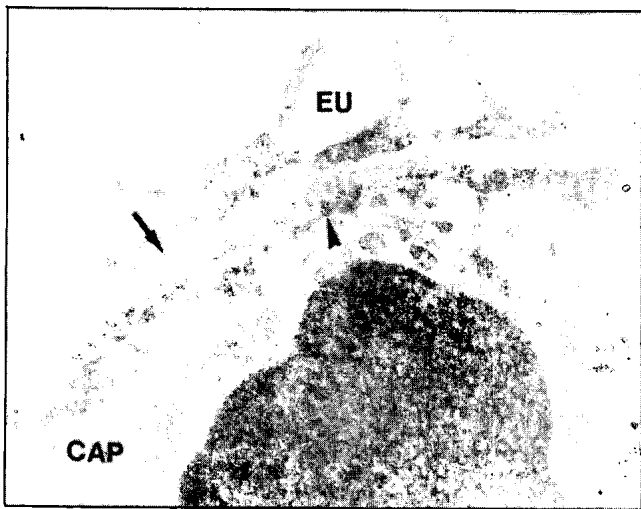


Fig. 10.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los treinta días. Técnica de la ferritina cationizada. CAP: capilar. EU: espacio urinario. Cabeza de flecha: partículas de ferritina en la lámina clara interna. Flecha: partículas de ferritina en lámina clara (115.000 \times).

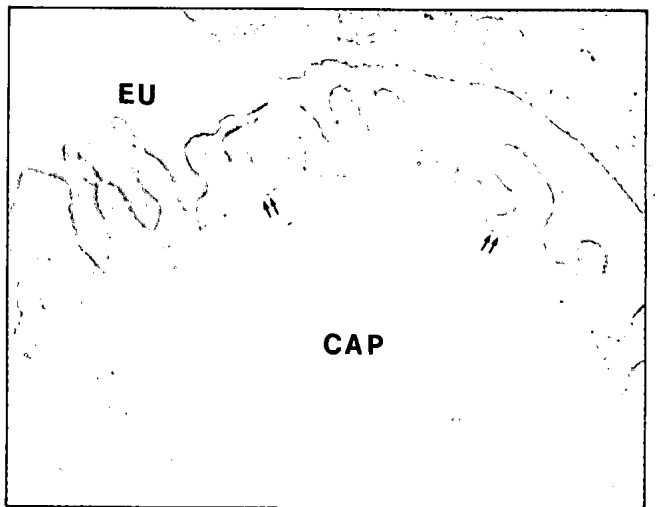


Fig. 12.—Sección transversal de la MBG de una rata control. Técnica del rojo de rutenio. EU: espacio urinario. CAP: capilar glomerular. Flechas: lugares aniónicos marcados por el trazador (84.000 \times).

trado que el depósito de ferritina cationizada desaparece al tratar la MBG con el enzima heparitina-^{27, 28}. Este hecho sugiere que el defecto de marcado de la MBG por otros trazadores catiónicos, como el azul alcian o la lisozima, durante el curso de la nefrosis aminonucleosídica, descrito por otros autores¹⁴⁻¹⁶, sería debido a una pérdida de grupos polianiónicos distintos a los presentes en la MBG y que podrían estar localizados en la pared del capilar glomerular o en la membrana de la célula epitelial podocitaria, lo que explicaría las alteraciones ultraestructurales presentes en dicha célula durante el curso del síndrome nefrótico y que, a su vez,

provocaría cambios conformacionales en la estructura molecular de la MBG, que no afectarían a los lugares aniónicos, como se desprende de los resultados descritos en el presente trabajo con los trazadores rojo de rutenio y ferritina cationizada. Tampoco se vería afectada la carga positiva de dicha membrana, ya que la disposición del ácido tánico, que se comporta como un anión a pH neutro, permanece constante a lo largo de la prueba.

Al igual que lo observado en nuestros anteriores estudios sobre las implicaciones renales en un modelo experimental de diabetes por estreptozotocina²², la disposición de los trazadores catiónicos dentro de

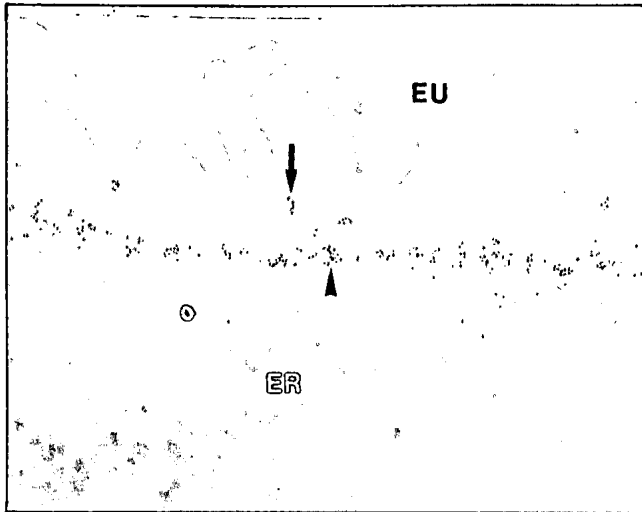


Fig. 13.—Sección transversal de la MBG de una rata control. Técnica de la ferritina cationizada. ER: eritrocito. EU: espacio urinario. Cabeza de flecha: partículas de ferritina cationizada depositadas en la lámina clara interna. Flecha: partículas del trazador bajo el diafragma interpedicelar (124.000 ×).

la MBG es diferente, apareciendo el rojo de rutenio más abundantemente en la lámina clara externa, mientras que la distribución de la ferritina cationizada predomina sobre la lámina clara interna. Este hecho se explicaría si se tiene en cuenta la existencia de un filtro mecánico a nivel de la lámina densa que impediría, en su mayor parte, el que las moléculas de ferritina superasen la lámina clara interna²⁹, lo que avalaría una vez más la hipótesis de que la filtración selectiva de macromoléculas a través del glomérulo es debida a un mecanismo multifactorial que precisaría para su correcto funcionamiento de la integridad morfofuncional de todos los componentes de la barrera de ultrafiltración renal.

Bibliografía

- Karnovsky M: *Kidney disease: present status*. Ed. Williams and Wilkins, pp. 1-41, Baltimore, 1979.
- Kanwar Y: Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest* 51:7-21, 1984.
- Caulfield J y Farquhar M: The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier. *J Cell Biol* 63:883-903, 1974.
- Kefalides N: Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int Rev Cytol* 61:167-228, 1979.
- Martínez-Hernández A, Gay S y Miller E: Ultrastructural localization of type V collagen in rat kidney. *J Cell Biol* 92:343-350, 1982.
- Kanwar Y y Farquhar M: Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. *J Cell Biol* 81:137-153, 1979.
- Kanwar Y y Farquhar M: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1303-1307, 1979.
- Lemkin M y Farquhar M: Sulfated and nonsulfated glycosaminoglycans and glycopeptides are synthesized by kidney in vivo and incorporated into glomerular basement membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1726-1730, 1981.
- Carling B, Jaffe R, Bender B y Chung E: Entactin a novel basal lamina associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 256:5209-5214, 1981.
- Timpl R, Dziadek M, Fujiwara S, Nowack H y Wick G: Nidogen: a self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* 137:455-465, 1983.
- Timpl R, Rohde H, Robey P, Rennard S, Fjeldart J y Martin G: Laminin: a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254:9933-9937, 1979.
- Kanwar Y y Farquhar M: Isolation of glycosaminoglycans (Heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4493-4497, 1979.
- Kanwar Y, Hascall V y Farquhar M: Partial characterization of newly synthesized proteoglycans isolated from glomerular basement membranes. *J Cell Biol* 90:527-532, 1981.
- Caulfield J: Alterations in the distribution of alcian blue staining fibrillar anionic sites in the glomerular basal membrane normal and aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 40:503-511, 1979.
- Caulfield J y Farquhar M: Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 39:505-512, 1978.
- Bliss D y Brewer D: Glomerular lysozyme binding in protein overload proteinuria. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 48:351-359, 1985.
- Bertolatus J y Hunsicker L: Glomerular sieving of anionic and neutral bovine albumins in proteinuric rats. *Kidney Int* 28:467-476, 1985.
- Mynderse L, Hassel J, Kleinman H, Martín G y Martínez-Hernández A: Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rats. *Lab Invest* 48:292-302, 1983.
- Kanwar Y, Rosenzweig L y Kejachki D: Glycosaminoglycans of the glomerular basement membrane in normal and nephrotic states. *Renal Physiol* 4:121-130, 1981.
- Kanwar Y y Jakubowsky M: Unaltered anionic sites of the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 25:613-618, 1983.
- Seiler M, Hoyer J y Krueger T: Altered localization of protamine-heparin complexes in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 43:9-17, 1980.
- Arévalo M y Carrascal E: Barrera iónica de la membrana basal glomerular durante la diabetes por estreptozotocina. *Nefrología* vol. 6, n.º 1: 27-32, 1986.
- Caulfield J, Reid J y Farquhar M: Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 34:43-52, 1976.
- Kanwar Y, Manaligod J y Krakower C: Aminonucleoside nephrosis on PRO/Re mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 155:339-349, 1977.
- Luft J: Ruthenium Red and violet: Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat Rec* 171:347-368, 1972.
- Velasco A: Fármacos antineoplásicos e inmunosupresores. En *Farmacología y su proyección a la clínica*. Ed Oteo, p. 1077, Madrid, 1975.
- Kanwar Y, Lynkef A y Farquhar M: Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (Heparan sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol* 86:688-693, 1980.
- Kanwar Y, Rosenzweig L y Jakubowsky M: Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix. *Eur J Cell Biol* 31:290-295, 1983.
- Schurer W, Fleuren G, Hoedemaker P y Molenaar I: A model for the glomerular filter. *Renal Physiol* 3:237-243, 1980.