

03466  
2  
2 of



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

NIVELES HEPATICOS DEL ARNm DE DIFERENTES  
PROTEINAS PLASMATICAS EN EL SINDROME  
NEFROTICO EXPERIMENTAL

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)  
P R E S E N T A  
MARIA ELENA IBARRA RUBIO

*Analisis*  
142967 0

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN.....	i
ABREVIATURAS.....	iv
I INTRODUCCION.....	1
1. SINDROME NEFROTICO.....	1
1.1 MECANISMOS DE PROTEINURIA.....	1
1.2 HIPOALBUMINEMIA.....	5
1.3 ALTERACIONES EN LA CONCENTRACION DE OTRAS PROTEINAS PLASMATICAS.....	7
1.4 METABOLISMO DE LIPIDOS.....	10
2. ALBUMINA.....	14
2.1 CARACTERISTICAS DE LA ALBUMINA.....	14
2.1.1 Distribución.....	14
2.1.2 Funciones.....	16
2.1.3 Estructura.....	17
2.1.4 Síntesis.....	17
2.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE ALBUMINA Y REGULACION DE SU SINTESIS.....	18
3. TRANSFERRINA.....	29
3.1 CARACTERISTICAS DE LA TRANSFERRINA.....	29
3.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE TRANSFERRINA Y REGULACION DE SU SINTESIS.....	30
4. FIBRINOGENO.....	33
4.1 CARACTERISTICAS DEL FIBRINOGENO.....	33
4.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE FIBRINOGENO Y REGULACION DE SU SINTESIS.....	34
5. GLUCOPROTEINA ACIDA ALFA-1.....	40
5.1 CARACTERISTICAS DE LA GLUCOPROTEINA ACIDA ALFA-1.....	40
5.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE GLUCOPROTEINA ACIDA ALFA-1 Y REGULACION DE SU SINTESIS.....	41
6. APOLIPOPROTEINAS AI Y E.....	44
6.1 CARACTERISTICAS DE LA APOLIPOPROTEINA AI (apo AI).....	44
6.2 CARACTERISTICAS DE LA APOLIPOPROTEINA E (apo E).....	45
6.3 ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LAS APOLIPOPROTEINAS AI Y E Y REGULACION DE SU SINTESIS.....	47
7. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	56
II OBJETIVOS.....	59
III MATERIAL Y METODOS.....	60

1.	REACTIVOS.....	60
2.	DISERO EXPERIMENTAL.....	60
3.	CARACTERIZACION DEL SINDROME NEFROTICO.....	62
3.1	PROTEINAS TOTALES EN SUERO Y ORINA.....	62
3.2	ALBUMINA EN SUERO Y ORINA.....	63
3.3	COLESTEROL Y TRIGLICERIDOS EN SUERO.....	63
4.	DETERMINACION DE LOS NIVELES HEPATICOS DE ARNms ESPECIFICOS.....	64
4.1	TECNICA DE "NORTHERN BLOT".....	64
4.1.1	Extracción de ARN total.....	64
4.1.2	Electroforesis de ARN en geles de agarosa .....	67
4.1.3	Transferencia del ARN de los geles de agarosa a las membranas de hibridación.....	68
4.1.4	Marcaje del ADnc con dCTP-32P.....	70
4.1.5	Prehibridación e hibridación.....	71
4.1.6	Autorradiografía.....	73
4.2	TECNICA DE "DOT BLOT".....	73
4.3	TECNICA PARA LAVAR EL ADnc DE LA MEMBRANA .....	74
5.	ANALISIS ESTADISTICO.....	75
IV	RESULTADOS.....	76
1.	CARACTERIZACION DEL SINDROME NEFROTICO.....	76
2.	NIVELES HEPATICOS DE ARNm ESPECIFICOS.....	82
3.	CORRELACION ENTRE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES HEPATICOS DE ARNms ESPECIFICOS Y LAS PRINCIPALES ALTERACIONES DEL SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.....	90
V	DISCUSION.....	95
VI	CONCLUSIONES.....	105
VII	REFERENCIAS.....	106

## R E S U M E N

Se ha informado que en el síndrome nefrótico (SN) experimental los niveles hepáticos del ARNm de algunas proteínas plasmáticas están alterados. Sin embargo, no hay informes acerca de los cambios secuenciales en los niveles de ARNms específicos durante el desarrollo y remisión espontánea del SN, ni de la correlación de estos niveles con las principales alteraciones del SN. Por otra parte, las ratas con SN experimental disminuyen la ingesta de alimento de manera importante y se sabe que diferentes dietas y cambios en la ingesta de alimento también alteran los niveles hepáticos de los ARNms de algunas proteínas plasmáticas. Por lo tanto, los objetivos de la presente tesis fueron: investigar los cambios en los niveles hepáticos de ARNms específicos en diferentes etapas del SN, su relación con las principales alteraciones del síndrome y la influencia de los cambios en la ingesta de alimento sobre las alteraciones en los niveles hepáticos de los ARNms. Con este fin se determinaron los niveles hepáticos del ARNm de las siguientes proteínas plasmáticas usando las técnicas de "Northern blot" y "dot blot": albúmina, transferrina, fibrinógeno, glucoproteína ácida alfa-1 (GPA) y apolipoproteínas (apo) A-I y E, en ratas con SN inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP), en ratas alimentadas a la par (AP) (a las cuales se les dió la cantidad de alimento consumida por las ratas con SN) y en ratas control (C) alimentadas ad libitum. Estas determinaciones se hicieron en diferentes etapas después de la inyección del ANP: a) pre-nefrótica (día 2), b) nefrótica (día 6), c) de remisión (día 11)

y d) post-nefrótica (día 33) y en los mismos días después de la inyección de vehículo a las ratas C y AP.

El perfil de peso corporal fué similar en las ratas con SN y AP y significativamente menor que el perfil de las ratas C. Las ratas con SN presentaron proteinuria importante del día 4 al día 25, mientras que la excreción de proteínas en las ratas AP y C se mantuvo dentro de límites normales. Las ratas con SN mostraron proteinuria, albuminuria, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia los días 6 y 11, e hipoproteinemia e hipoalbuminemia el día 6. En las ratas con SN los niveles hepáticos de ARNm de apo E aumentó el día 2, los de transferrina y fibrinógeno en el día 6 y los de albúmina y apo A-I en los días 6 y 11, en cambio, el ARNm de GPA no cambió. El hecho de que las alteraciones en los niveles hepáticos de los ARNms específicos estudiados en este trabajo se presenten en diferentes etapas después de la inyección del ANP, y que además sean de magnitud variable, sugiere que no existe una respuesta simultánea de todas las proteínas plasmáticas y que la síntesis de cada una se regula independientemente. En las ratas AP el ARNm de transferrina se elevó en el día 2, el de apo E en los días 6 y 11, los de fibrinógeno y GPA en el día 6 y el de albúmina en el día 11; sin embargo, el ARNm de apo A-I no cambió significativamente. Los aumentos en el ARNm de fibrinógeno en el día 6 y de albúmina en el día 11 fueron significativamente mayores en las ratas con SN que en las ratas AP. Estos datos demuestran que los perfiles de los ARNm en los grupos SN y AP están claramente dissociados y sugieren que las alteraciones en

los niveles de los ARNm en las ratas con SN no son consecuencia de los cambios en la ingesta de alimento. Además, no hubo correlación entre los niveles de los ARNm con los cambios en la ingesta de alimento en el grupo con SN. Los niveles hepáticos del ARNm de albúmina correlacionaron positivamente con la proteinuria, pero no presentaron ninguna correlación ni con las proteínas totales ni con la albúmina en suero. Esto se debe a que hay un mayor aumento de los niveles hepáticos del ARNm de albúmina cuando los niveles circulantes de albúmina y proteínas totales ya están casi normales (día 11). Esto sugiere que, en el día 11 los niveles del ARNm de albúmina no parecen estar regulados por los niveles circulantes de esta proteína ni de proteínas totales, pero sí por la proteinuria. Sin embargo, en el día 6 no se puede descartar un papel regulatorio de la albúmina circulante, lo cual indicaría que hay diferentes estímulos regulatorios en las diferentes etapas del SN. Los niveles del ARNm de apo A-I correlacionaron positivamente con la proteinuria, con la trigliceridemia y con la colesterolemia, y negativamente con los niveles circulantes de proteínas totales y de albúmina por lo que podrían estar regulados por estas variables. A su vez, los niveles de los ARNm de las apos A-I y E presentaron una correlación negativa por lo que estos niveles parecen estar regulados inversamente en el SN.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

Å	.....	Angstrom
aa	.....	AminoÁcido(s)
ac. sp.	.....	Actividad específica
ADN	.....	Acido desoxirribonucleico
ADNc	.....	ADN complementario
ANDEVA	.....	Análisis de varianza
ANP	.....	Aminonucleósido de puromicina
AP	.....	Grupo alimentado a la par
apo(s)	.....	Apolipoproteína(s)
ARN	.....	Acido ribonucleico
ARNm(s)	.....	ARN(s) mensajero(s)
ARNr	.....	ARN ribosómico
ARNt	.....	ARN de transferencia
C	.....	Grupo control
d	.....	Daltones
DE	.....	Desviación estándar
GPA	.....	Glucoproteína ácida alfa-1
HDL	.....	Lipoproteínas de alta densidad
IDL	.....	Lipoproteínas de densidad intermedia
LDL	.....	Lipoproteínas de baja densidad
n	.....	Número de determinaciones o animales
SN	.....	Síndrome nefrótico (grupo con)
pb	.....	Pares de bases
VLDL	.....	Lipoproteínas de muy baja densidad

## I INTRODUCCION

### 1. SINDROME NEFROTICO

La fisiopatología del síndrome nefrótico (SN) primario no está dilucidada totalmente. El SN se caracteriza por un aumento en la filtración glomerular de proteínas plasmáticas, edema, ascitis, retención de sodio, albuminuria, hipoalbuminemia, hiperlipoproteinemia, desnutrición, alteraciones en los factores de la coagulación, tromboembolismo, disminución de la inmunidad humoral y celular y alteraciones en la concentración (aumento o disminución) de casi todas las proteínas plasmáticas (1-4). Se piensa que todas las alteraciones sistémicas en el SN son secundarias a la pérdida de proteínas plasmáticas por la orina debida a alteraciones en la barrera de filtración glomerular. En la Fig. 1 se ilustran las relaciones entre las principales alteraciones sistémicas del SN (3).

En la rata se han diseñado varios modelos experimentales del SN de los humanos (5-7). De los más usados es el producido por el aminonucleósido de puromicina (ANP) (6,8-13). Este modelo es muy parecido al SN primario de los humanos ya que produce la lesión renal característica que es la fusión de los procesos podocíticos de las células epiteliales (podocitos), además de que el edema, la retención de sodio, la hiperlipemia, y la proteinuria remiten espontáneamente (8,9,14).

#### 1.1 MECANISMOS DE PROTEINURIA

La barrera de filtración está constituida por la pared capilar glomerular que consta de tres componentes: 1) las células

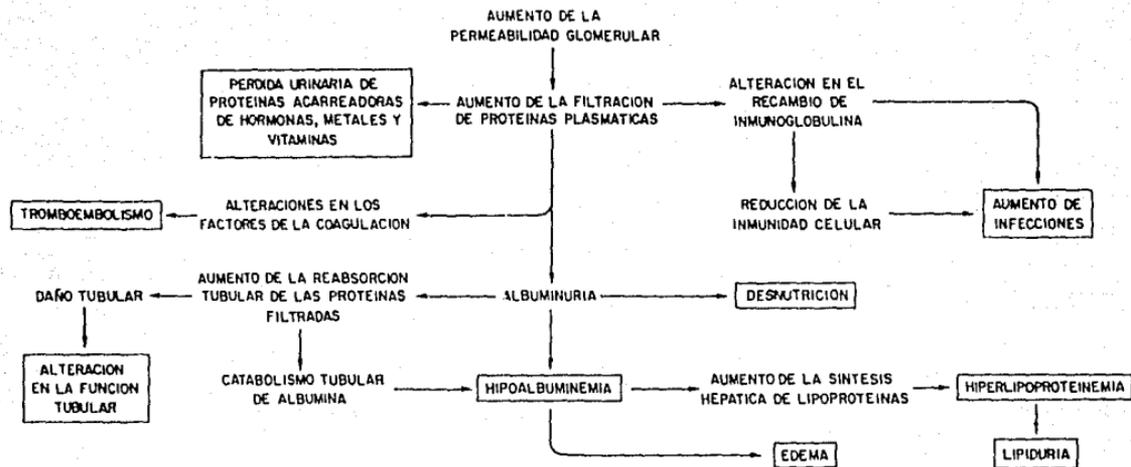


Figura 1. Fisiopatología del síndrome nefrótico. Se propone que todas las alteraciones sistémicas son consecuencia del aumento en la permeabilidad glomerular a las proteínas plasmáticas y que la hipoalbuminemia inicia las principales manifestaciones (Ref 3).

endoteliales cuyo citoplasma está fenestrado, 2) la membrana basal glomerular compuesta por tres capas: lámina rara interna, lámina densa y lámina rara externa, y 3) los procesos podocíticos de las células epiteliales (15). Las fenestraciones de las células endoteliales de un diámetro promedio de 70 nm (50-100 nm) permiten que todos los elementos solubles del plasma puedan estar en contacto íntimo con la membrana basal glomerular. La siguiente capa, la membrana basal glomerular, está compuesta principalmente de una malla de fibras de colágena y tiene un espesor de 300-350 nm en el humano, pero que puede variar de 150 a 350 nm en diferentes especies. La lámina densa constituye una barrera significativa a la filtración de las proteínas plasmáticas neutras debido a la red de fibras de colágena tipo IV. Se piensa que los espacios entre estas fibras representan los "poros" físicos a través de los cuales las moléculas neutras son tamizadas en base a sus dimensión molecular. La parte más externa de la pared glomerular, que se interpone entre la membrana basal glomerular y el espacio de Bowman, está compuesta de procesos podocíticos de las células epiteliales. Estos procesos epiteliales están parcialmente embebidos en la lámina rara externa. Entre los procesos podocíticos adyacentes hay espacios de un tamaño de 20 a 30 nm que están cubiertos por una membrana fina conocida como diafragma de hendidura. Este diafragma contiene espacios rectangulares de un tamaño aproximado de 4 X 14 nm (16,17) a través del cual pasan las moléculas pequeñas y, probablemente, restringen el paso de albúmina y de moléculas más grandes.

Además de la barrera determinada por el tamaño de los poros,

existe una barrera electrostática a base de polianiones, sialoproteínas y heparán sulfato-proteoglucanos, que restringen selectivamente el paso de moléculas con carga negativa. El plasmalema de las fenestraciones endoteliales tiene una cubierta rica en ácido siálico que se tiñe con oro coloidal y que contiene heparán sulfato-proteoglucanos (18). Los heparán sulfato-proteoglucanos están distribuidos principalmente dentro de la lámina rara interna y externa de la membrana basal glomerular (19), y los procesos podocíticos están cubiertos por un glucocálix rico en ácido siálico (20). De acuerdo con esto, los factores que determinan el paso de las moléculas por la barrera de filtración son: el tamaño, la deformabilidad, la carga eléctrica y la configuración moleculares, así como la hemodinámica glomerular. En el SN ocurre un trastorno en la permeabilidad del capilar glomerular que permite el paso de macromoléculas cuyo mecanismo no está dilucidado. En la nefrosis por ANP, la depuración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga es muy elevada, lo que indica que la selectividad, tanto de tamaño como de carga, está alterada (21). La lesión renal característica del SN idiopático es la fusión de los procesos podocíticos, esta fusión parece deberse a la pérdida de la carga negativa de su superficie; esta conclusión se apoya en el hecho de que la administración de polioles al riñón produce proteinuria y fusión de podocitos (22). Charest y Roth (23) observaron una disminución del contenido de ácido siálico en las membranas de los podocitos en la nefrosis por ANP; Kerjaschki y cols. (24) observaron una disminución en el contenido de

Ácido siálico de la podocalixina (la sialoproteína más abundante de las células epiteliales) en ratas nefróticas, lo que sugiere que la disminución de ácido siálico juega un papel muy importante en el mecanismo de proteinuria en la nefrosis humana y experimental. No está claro si los heparán sulfato-proteoglucanos de la barrera glomerular disminuyen en la nefrosis por ANP (25); sin embargo, en los pacientes con SN congénito (26), los sitios aniónicos ricos en heparán sulfato, están prácticamente ausentes.

## 1.2 HIPOALBUMINEMIA

La hipoalbuminemia en SN puede ser secundaria a una disminución en la síntesis de albúmina, a un aumento en su catabolismo, a cambios en su distribución, a una disminución en la ingesta de proteínas o a la pérdida de albúmina del cuerpo (3). En el SN parece que varios de éstos factores están involucrados. La pérdida de albúmina en la orina es muy importante. Sin embargo, la pérdida de proteínas por sí sola no explica la hipoalbuminemia en la mayoría de los pacientes con SN, debido a que la velocidad de síntesis hepática de albúmina puede aumentar por lo menos tres veces y debe ser capaz de compensar fácilmente las pérdidas por orina (27). Los estudios en humanos y en modelos animales de SN demuestran que la velocidad de síntesis de albúmina está aumentada si la ingesta de proteínas es adecuada (28,29). En pacientes con dieta baja en proteínas la síntesis de albúmina puede estar disminuida (29). Hay una buena correlación entre el grado de proteinuria y el grado de hipoalbuminemia aunque existen muchas excepciones (30). La relación albúmina intravascular/albúmina extravascular aumenta de 0.8 a 1.1 en

pacientes con SN (1,30). Esto es, la concentración de albúmina intersticial disminuye más que la concentración de albúmina en plasma. Al darles una dieta alta en proteínas los pacientes presentan una mayor proteinuria y ningún cambio en la concentración de albúmina en plasma, en cambio, una dieta baja en proteínas disminuye la proteinuria aunque no produce cambios en los niveles plasmáticos de proteínas (31, 32).

El aumento en la síntesis de albúmina en el SN se ha demostrado con técnicas de recambio (33), métodos de perfusión de hígado (34), preparaciones microsomales aisladas (35), y mediciones del ARNm de albúmina (36,37). La infusión de dextranos hiperoncóticos disminuye la velocidad de degradación y la síntesis de albúmina, lo que sugiere que la presión coloidosmótica puede ser un regulador importante de la síntesis de albúmina (32,38,39).

Por otra parte, se ha encontrado que el catabolismo fraccional de la albúmina (fracción de la reserva de albúmina intravascular que se cataboliza por unidad de tiempo) está aumentado en el SN (3). En una persona normal, se cataboliza diariamente del 5-12% de la reserva intravascular de albúmina, mientras que en los pacientes con SN esta fracción aumenta a 16-50% (3). El sitio más importante del aumento en el catabolismo de albúmina es el riñón. Este aumento parece ser secundario a la captación tubular y a la destrucción de la albúmina filtrada. Varios estudios en animales y en humanos demuestran que la velocidad catabólica de la albúmina aumenta cuando aumenta la proteinuria (12,28). Si las ratas con SN se nefrectomizan, el

catabolismo de albúmina disminuye un 50% (33). En células del túbulo proximal y distal de ratas con SN se han demostrado gotas de proteínas con albúmina y globulinas (40), además, la actividad de las enzimas lisosomales catepsina B y L aumenta en las células tubulares en respuesta a la proteinuria glomerular (41).

En resumen, el concepto actual es que la hipoalbuminemia en el SN no se debe a una disminución en la síntesis de albúmina, sino a la albuminuria y al aumento en el catabolismo renal de esta proteína (1,4). La síntesis de albúmina no disminuye, sino que aumenta en pacientes y en animales con SN, pero este aumento no es suficiente para compensar la hipoalbuminemia.

### 1.3 ALTERACIONES EN LA CONCENTRACION DE OTRAS PROTEINAS PLASMATICAS

El análisis electroforético de proteínas séricas de pacientes o animales con SN muestra que la albúmina y las globulinas gama están disminuidas, y que las globulinas alfa-2 y beta están aumentadas. El patrón electroforético de la orina de pacientes con SN es similar al del suero normal pero con grandes diferencias cuantitativas (42).

Estas alteraciones en el patrón electroforético general de las proteínas plasmáticas son consecuencia de los cambios en la concentración individual de muchas proteínas. La disminución en la concentración de una proteína circulante puede ser consecuencia de una reducción en su síntesis, un incremento en su catabolismo o en su excreción urinaria, o a una combinación de estos factores. Por el contrario, la elevación en la concentración de una proteína circulante en el SN puede ser consecuencia de un aumento en la síntesis y/o una disminución en

su catabolismo. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios de recambio para dilucidar el mecanismo exacto de las alteraciones de las proteínas plasmáticas individualmente en el SN.

A continuación se describen las alteraciones específicas de algunas proteínas plasmáticas en el SN.

Los niveles séricos de las proteínas transportadoras de Cu (ceruloplasmina) y Fe (transferrina) están disminuidos (43-46). La excreción urinaria de transferrina está aumentada, y se ha propuesto que la de ceruloplasmina también se eleva en pacientes con SN (47-49). La deficiencia de ceruloplasmina puede conducir a hipocupremia (47). Las alteraciones en el recambio de transferrina en pacientes con SN son muy similares a las de albúmina (46). Hay un aumento del 160% en el catabolismo y síntesis de transferrina. La deficiencia de transferrina y hierro pueden llevar a los pacientes con SN a desarrollar anemia microcítica hipocrómica resistente a la terapia con hierro (44). Otras proteínas de transporte cuya concentración está disminuida y/o se pierden en la orina de los pacientes con SN son: transcortina, proteína que une zinc, globulina que une tiroxina y proteína que une vitamina D (50).

Otra proteína que está disminuida en el SN es la glucoproteína ácida alfa-1 (GPA) (50,51). La disminución de esta proteína puede deteriorar la activación de la lipasa de lipoproteínas ya que contiene un cofactor para la reacción de esta enzima (52-54), y esto, junto con la pérdida urinaria de lecitín colesterol acil transferasa, puede contribuir a las

alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas en el SN.

Los niveles séricos de IgG están disminuidos en los pacientes con SN (55) y esto se debe a que la IgG se pierde por orina en grandes cantidades (56) y a que aumenta su catabolismo (28,57). La deficiencia de IgG, junto con la reducción en la inmunidad celular en estos pacientes, trae como consecuencia un aumento en la incidencia de infecciones. Los niveles de IgM y de IgE están elevados y los de IgA están reducidos (58). Cuando los pacientes entran en la etapa de remisión, los niveles de IgG tienden a regresar a valores normales, mientras que los de IgM se mantienen elevados durante varios años después (58). También se ha encontrado una disminución en los niveles séricos del factor B, un componente de la vía alterna de activación del complemento, conocido también como proactivador C3 o beta glucoproteína rica en glicina (59). Se ha propuesto que esta reducción puede deberse a su pérdida por orina y que puede, junto con la disminución en la inmunidad humoral y celular, contribuir al aumento en la incidencia de infecciones en estos pacientes. Los niveles de C4 están normales durante la recaída y aumentan durante la remisión (50).

Las proteínas involucradas en la cascada de la coagulación también presentan alteraciones muy importantes lo que trae como consecuencia trastornos en la coagulación y fibrinólisis en el SN (3, 60). Estas perturbaciones se deben a cambios en la síntesis y el recambio de estas proteínas así como a las pérdidas urinarias (61). Las anomalías de la coagulación más características del estado nefrótico son: aumento de los factores V, VIII y del fibrinógeno; disminución de antitrombina III,

trombocitosis y aumento en la agregación plaquetaria (60). También se ha observado un aumento en la síntesis y en el catabolismo del fibrinógeno (50).

En la tabla 1 se resumen las principales alteraciones y características de algunas proteínas plasmáticas en el SN.

#### 1.4 METABOLISMO DE LÍPIDOS

En pacientes con SN se elevan prácticamente todas las fracciones de lípidos y lipoproteínas séricas, esta alteración incluye el colesterol y todas sus fracciones (total, libre y esterificado), así como los fosfolípidos, en tanto que los triglicéridos no siempre aumentan (46,62,63). En cambio, en el modelo experimental todos los lípidos aumentan consistentemente incluyendo los triglicéridos (9,11,64). Los ácidos grasos están normales, aunque la fracción unida a albúmina se reduce (62). En el humano, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las de densidad intermedia (IDL), y las de baja densidad (LDL) aumentan (46,62-67), mientras que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) pueden encontrarse normales o incluso bajas (68), sin embargo, en ratas con SN se observa un aumento de 4 a 8 veces en todas las fracciones de lipoproteínas (69). También la composición molecular de las lipoproteínas se altera, ya que la proporción de colesterol y triglicéridos es mayor que lo normal (70). En ratas con SN las fracciones VLDL, IDL y LDL presentan menos triglicéridos y más fosfolípidos y colesterol, mientras que la composición lipídica de HDL no está alterada (69). Además, existen alteraciones en la composición y cantidad de las

TABLA 1. ALTERACIONES Y CARACTERISTICAS DE ALGUNAS PROTEINAS PLASMATICAS EN EL SINDROME NEFROTICO EN PACIENTES Y/O EN RATAS.

PROTEINA	CONCENTRACION		SINT	CAT	MOV	PM	REF
	SUERO	ORINA					
ALBUMINA*	(-)	(+)	(+)	(+)	Alb	66	1-4,9,27, 33-37
TRANS-FERRINA*	(-)	(+)	(+)	(+)	Beta-1	76.5	43-49
CERULO-PLASMINA	(-)				Alfa-2	132	43
GPA*	(-)	(+)			Alfa-1	40	50, 51
FIBRINO-GENO*	(+)	NO	(+)	(+)	Beta-2	340	3,43,60 61
ANTITROM-BINA III	(-)	(+)			Alfa-2	62.3	3,60
FACTOR VIII	(+)	NO			Beta	1000	3,60
FACTOR V	(+)	NO			Beta	330	3,60
IgG	(-)	(+)	(-)	(+)	Gama-1 Gama-2	150	28, 55-57
IgM	(+)				Gama-1	850	58
IgE	(+)				Gama	180	58
FACTOR B	(-)	(+)			Beta-2	94	30
APO AI*	(+)	(+)	(+)		Alfa-1	28	64,67,71, 72,81
APO E*	(+)		(+)			36	71,81

SINT = Síntesis, CAT = Catabolismo, MOV = Movilidad electroforética, PM = Peso molecular (kDa), REF = Referencias, GPA = Glucoproteína ácida alfa 1. (-) = Disminución, (+) = Aumento, NO = No excretada. \* Proteínas estudiadas en este trabajo. Los cuadros vacíos indican que no hay datos al respecto.

apoproteínas (67). En ratas con SN la composición de apoproteínas de VLDL e IDL no está alterada, pero LDL contiene apo AI y presenta menos apo E, la composición de HDL está muy alterada ya que prácticamente no presenta apo A-IV ni apo E, Apo A-I está muy aumentada y apo C está disminuida (64, 69, 72). Finalmente, los niveles plasmáticos de ciertas apolipoproteínas se alteran (72-74). Los niveles de apo B y apo C están aumentados mientras que los de apo AI y apo AII están normales en la fase aguda pero se elevan durante la remisión (67, 72). En ratas con SN la apo AI se incrementa aproximadamente 6 veces en estrecha correlación con la hipoalbuminemia (64) y la apo E también aumenta pero en menor proporción (71). Estos trastornos desaparecen con rapidez al remitir el SN.

Los lípidos plasmáticos y las lipoproteínas pueden elevarse debido a un aumento en la velocidad de síntesis, una disminución del catabolismo, un incremento en la movilización de los depósitos de grasas, o una combinación de estos factores (1,3). La causa principal de la hiperlipoproteinemia en el SN parece ser un aumento en la síntesis hepática de proteínas (10,75-77) entre las que destacan las lipoproteínas. Se ha postulado que este incremento ocurre en respuesta a una disminución de la presión coloidosmótica secundaria a la hipoalbuminemia (78-80). La secreción hepática de apo AI está marcadamente elevada, la de apo B y apo E también aumenta aunque en menor proporción, mientras que la secreción de apo C no se eleva (71,81).

En ratas con SN se pierden por orina colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos, triglicéridos, ésteres de

colesterol, apo AI, VLDL, LDL y HDL (64). En humanos con SN se ha encontrado en orina VLDL, IDL, LDL y HDL siendo más abundante HDL. Shore y cols. (82) encontraron que apo B es el principal componente de la LDL urinaria y apo AI es la que se presenta en menor cantidad, y que apo B es la principal proteína de las IDL y VLDL urinarias. De la HDL urinaria se aislaron apo AI, CI, CIII y IV.

No solo el aumento en la síntesis de las lipoproteínas es el responsable de la hiperlipoproteinemia en el SN, sino que también hay una reducción en la degradación de las mismas (83-85). Esto parece deberse a una reducción de la actividad de la lipasa de lipoproteínas (86-88) y de la lecitin colesterol acil transferasa en el SN (89-91). La inhibición de la lipasa de lipoproteínas se ha atribuido a la acumulación de ácidos grasos libres por hipoalbuminemia, a la presencia de inhibidores plasmáticos y a la deficiencia de apoproteína CII o de otros activadores como el heparán sulfato o la GPA (52-54) que se pierden en orina (88). La reducción en la actividad de la lecitin colesterol acil transferasa puede deberse simplemente a su pérdida urinaria o a la acumulación de lisolecitina, que retarda la reacción enzimática. Estas alteraciones disminuyen la producción de HDL y explica, en parte, el por qué se reduce esta lipoproteína en humanos (89); otro factor contribuyente es la pérdida de HDL por orina, ya que su dimensión molecular (70 Å) es semejante a la de la albúmina (81,82). Por el contrario, en pacientes con SN de cambios mínimos hay aumento en la concentración plasmática de HDL porque su eliminación urinaria es pobre, en tanto que en pacientes con SN por otras causas las HDL disminuyen en plasma y

aumentan en orina (92).

La hipercolesterolemia del SN también resulta de un aumento en la síntesis de colesterol inducido por la elevación del ácido mevalónico que se encuentra alto por la disminución de su catabolismo renal (93).

En la Fig. 2 se muestra un esquema donde se resumen las principales alteraciones del metabolismo de lípidos en el SN.

## 2. ALBUMINA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ALBUMINA

La albúmina es la más abundante y la más estudiada de las proteínas plasmáticas. Es la proteína que el hígado sintetiza en mayor cantidad, representa aproximadamente el 50% de la producción de proteínas en cualquier momento (94). Durante mucho tiempo se pensó que se sintetizaba solo en hígado, ahora se sabe que se sintetiza en pequeñas cantidades en otros tejidos tales como riñón, intestino, pulmón, corazón y páncreas (95-97).

#### 2.1.1 Distribución

Solo del 30 al 40% de la reserva total intercambiable de albúmina en el cuerpo humano se localiza en el compartimiento intravascular (27), el resto es extravascular y se encuentra dentro del espacio intersticial. La mayoría de esta albúmina intersticial en el hombre se encuentra en los músculos y en la piel. El hígado, pulmones, corazón, riñones y bazo solo contienen pequeñas cantidades. Aunque constituye solo el 6% del peso total del cuerpo, la piel contiene del 30-40% de la albúmina



extravascular (98). La linfa contiene solo del 2-3% del total de la albúmina intersticial y su concentración en diferentes sitios es variable (99,100). La albúmina se encuentra en pequeñas cantidades en varios líquidos corporales, tales como sudor, lágrimas, jugo gástrico y bilis (101). Una rata normal contiene de 500-600 mg de albúmina por cada 100 g de peso. De esta cantidad, 20 a 25% está en circulación, 20-25% está en la piel, 10% en el intestino y 35-40% en el resto del cuerpo (principalmente en músculo) (102).

#### 2.1.2. Funciones

A la albúmina se le han atribuido dos funciones principales: el mantenimiento de la presión coloidosmótica y el transporte de diferentes sustancias, tales como ácidos grasos de cadena larga, bilirrubina, calcio, drogas, vitaminas, etc.; también se ha propuesto que podría servir de fuente interna de aminoácidos (aa) para la síntesis de otras proteínas. Aunque solo del 50 al 60% de las proteínas plasmáticas es albúmina, esta contribuye con el 80% de la presión coloidosmótica debido a su pequeño peso molecular (103). Juega un papel muy importante en la regulación del tamaño extravascular. La albúmina en el fluido intersticial compete con la albúmina intravascular en la retención del agua que se ha filtrado al área extravascular. Esta proteína tiene una gran afinidad por sustancias de importancia biológica considerable para la homeostasis del individuo (101,104,105). Esta afinidad es la base para llevar a cabo su función de transporte.

### 2.1.3 Estructura

La albúmina está formada por una sola cadena polipeptídica de 585 residuos de aa en el humano (106) y 584 en la rata (107); tiene una forma elipsoidal con un diámetro de 38 Å y una longitud de 150 Å (101). La secuencia de la albúmina humana y de rata se obtuvieron a partir de la secuencia de bases del ADNc específico clonado de ambas especies en 1982 y en 1981 respectivamente (106,107). El peso molecular de la albúmina humana es de 66,288 d (106) y el de la rata de 65,863 d (107).

En la albúmina se presentan 17 puentes disulfuro los cuales inducen un patrón de asas que se repite tres veces y que definen los tres dominios estructurales de la albúmina sérica, los cuales exhiben una homología de aa significativa.

La contraparte fetal de la albúmina es la alfa-fetoproteína que presenta una estructura muy similar (108,109).

### 2.1.4 Síntesis

Las proteínas intracelulares se sintetizan en polirribosomas libres, mientras que las proteínas de secreción se sintetizan en los polirribosomas unidos a la membrana, lo que caracteriza al retículo endoplásmico rugoso (110-112). El ARNm de albúmina se localiza específicamente en este compartimiento subcelular de los hepatocitos en condiciones normales (113-117)

Utilizando técnicas de hibridación se ha calculado que, en condiciones normales, el 97% del ARNm de albúmina en el hígado de una rata normal se encuentra en polisomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, 2% en polisomas libres y 1% en el sobrenadante postribosomal (118,119).

En diferentes patologías y estados fisiológicos existen alteraciones en la distribución del ARNm y en la síntesis de albúmina como en el ayuno de 24 h (119), en la insuficiencia renal crónica (120) y en la cirrosis hepática por tetracloruro de carbono (121).

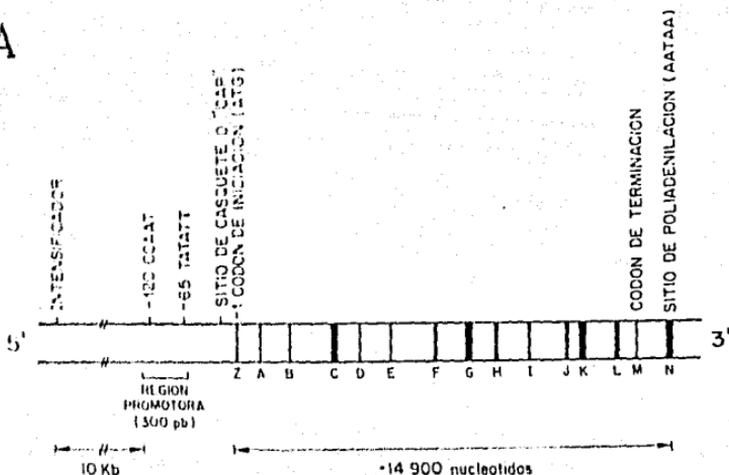
La albúmina se sintetiza en forma de un precursor conocido como preproalbúmina (122). La longitud de este segmento prepro es de 24 aa y se localiza en el extremo amino de la proteína. Dieciocho de estos residuos corresponden al fragmento pre el cual se conoce como péptido señal, y 6 al fragmento pro. De acuerdo a la hipótesis del péptido señal (123), el fragmento pre es muy importante para que la proteína atraviese la membrana del retículo endoplásmico y se transporte a su interior (124,125). Antes de que termine de sintetizarse la proteína y ya dentro del retículo endoplásmico, el fragmento pre se libera al ser cortado por una enzima específica y la proteína queda como proalbúmina. Esta pasa entonces al interior del retículo endoplásmico, de aquí al aparato de Golgi, y finalmente a las vesículas de secreción. El corte del fragmento pro parece tener lugar en el complejo de Golgi distal incluyendo a las vesículas secretoras (126). Se piensa que la formación de los puentes disulfuro se lleva a cabo inmediatamente después de su síntesis o después de que se haya sintetizado cada dominio (127).

## 2.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE ALBUMINA Y REGULACION DE SU SINTESIS

El gen de albúmina es uno de los genes eucariontes más estudiados por lo que se conocen muchas de sus características.

En la Fig. 3 (128,129) se representa esquemáticamente la estructura de este gen. En la rata está formado por 14,900 nucleótidos con 15 exones y 14 intrones (128,130). Presenta una secuencia intensificadora ("enhancer") a 10 kb hacia el extremo 5' del promotor (131). Posteriormente está la región promotora entre los nucleótidos -150 ó -170 y -30, donde se encuentran algunas secuencias específicas (elementos cis) a las cuales se unen los factores de transcripción (elementos trans), y las secuencias CCAAT ("CAAT-box"), en la posición -120, y TATATT ("TATA box") en la posición -65 (128), a 90 y 30 pares de bases (pb) respectivamente hacia la 20 región 5' de los sitios de casquete ("cap") probables (132). Posteriormente se encuentra el sitio de iniciación de la traducción (ATG) seguido por el gen estructural compuesto por 15 exones y 14 intrones anteriormente mencionados. Al exón del extremo 5' se le conoce como exón líder o exón Z y en este se encuentra codificada la región 5' terminal del mensajero, los péptidos prepro y los primeros 2 1/3 aa de la proteína que se secreta (130). Los doce exones siguientes o intermedios (A-L) son los que contienen la información para la síntesis de la proteína que se secreta. Dentro de estos doce exones hay tres zonas con una gran similitud tanto de secuencia como de tamaño, cada una formada por 4 exones en los cuales se encuentran codificados los aa que forman las asas estructurales de la proteína (106,107,133). Estas tres zonas parecen haber surgido por duplicaciones internas, es decir, originalmente, en el gen ancestral, existían 4 exones, los cuales sufrieron dos duplicaciones internas que dieron lugar a los doce exones (130).

A



B

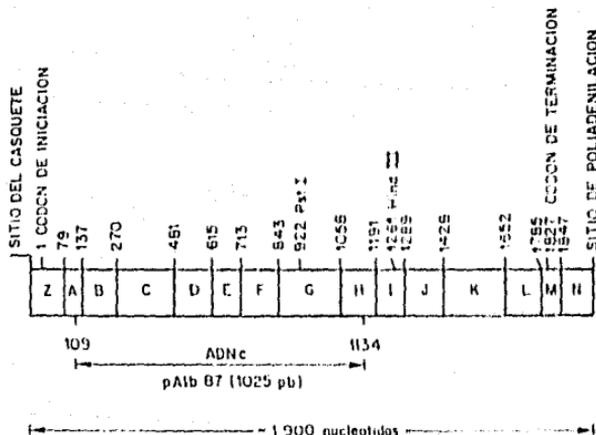


Figura 3. A) Estructura del gen de albúmina. Las barras negras indican la posición y longitud proporcional de los exones. Los espacios vacíos entre las barras indican los intrones. Las letras indican el nombre que corresponde a cada exón. B) Mapa de los exones del ARNm de albúmina de rata. Los números sobre los exones indican la posición del primer nucleótido de cada exón en relación al codón de iniciación de la traducción. Se indica la región que abarca el ADNc utilizado en el presente trabajo (pAlb 87) y los nucleótidos donde inicia y termina (109 y 1134, respectivamente). Adaptado de las referencias 128 y 129.

Estas características las presenta también el gen de alfa-fetoproteína por lo que se cree que ambos genes surgieron por la duplicación de un gen ancestral (108,134,135). Ahora se ha encontrado un tercer gen que forma parte de esta familia génica y es el de la proteína que une vitamina D ya que comparte muchas características (97). Después de los doce exones intermedios se encuentran los exones M y N en el extremo 3' del gen. Estos dos exones tienen secuencias presentes en el ARNm maduro pero que no se traducen. Su función se desconoce a pesar de que incluyen el codón de terminación de la traducción (exón M) y los sitios de poliadenilación (exón N). En el humano hay dos sitios de poliadenilación, uno a 164 nucleótidos del inicio del exón N y otro a 325 nucleótidos, siendo más utilizado el primero. Sin embargo, en la rata solo se ha encontrado un sitio de poliadenilación a 143 nucleótidos del inicio de este exón (132).

Se han analizado las secuencias de la unión intrón-exón de un gran número de genes. La secuencia consenso para los extremos 5' y 3' de los intrones son (A/G)AG-GTAAGT y TY-TYYYYTCAG-G respectivamente (donde Y = T ó C), de tal forma que casi siempre es posible definir el sitio de rompimiento y unión ("splicing") de un intrón, siendo los primeros dos nucleótidos GT y los dos últimos AG. En el caso del gen de albúmina se cumple con esta regla concida como la regla GT-AG (130).

Los sitios de unión de factores de la transcripción de los cuales se habló anteriormente y que se encuentran dentro de la región promotora del gen están entre las bases -170 y -30 ("TATA box"). En esta región hay al menos 6 sitios de enlace para proteínas específicas que se unen al ADN (136,137):

Sitios de unión  
en el ADN  
(elementos cis)

Proteínas  
específicas  
(elementos trans)

3'	A	C/EBP
	B	HNF1
	C	NF-Y
	D	C/EBP, DBP
	E	NF1- NF1
5'	F	C/EBP

Estos factores están presentes en tejidos diferentes al hígado, como en bazo y cerebro, pero en muy baja concentración. El factor nuclear de hepatocito 1 (HNF1) es el factor que juega el papel dominante en la determinación de la transcripción específica del tipo celular in vitro del gen de albúmina. La adición de este factor purificado a extractos nucleares de bazo, los cuales carecen de este factor, estimula fuertemente la actividad del promotor de albúmina. Este es el único factor altamente glucosilado. Además de estimular la transcripción directamente uniéndose a su elemento cis (B), el factor nuclear de hepatocito 1 puede intensificar la actividad del promotor de albúmina interactuando cooperativamente con otros factores trans (137).

Se han identificado elementos similares en los flancos 5' de muchos otros genes hepáticos (138-140) y parece ser que estos elementos unen este factor nuclear de hepatocito 1 (141). Además, se ha visto que el elemento B donde se une el factor nuclear de hepatocito 1 es la única secuencia bien conservada de los promotores del gen de albúmina de Xenopus, pollo, ratón, rata y humano.

Otro de los elementos más fuertes para activar la

transcripción de una manera específica del tejido es el sitio de unión A donde se une el factor C/EBP. El sitio de unión C, donde se une el factor NF-Y, tiene un potencial de activación menor y es menos específico, es igual de eficiente en extractos nucleares de hígado que en los de bazo. El resto de los elementos son sitios activadores relativamente débiles (142).

Asimismo, Frain y cols. (143) definieron dos regiones funcionales diferentes para la transcripción eficiente del gen de albúmina de humano, además de la región promotora: un elemento negativo localizado entre las bases -673 y -486, y un intensificador esencial para la transcripción eficiente de albúmina localizado entre las bases -486 y -221. Los estudios de unión de proteínas han demostrado que un factor trans del hígado que interactúa con la región del intensificador es el bien caracterizado factor de transcripción LF-B1, el cual se une a los promotores de varios genes específicos del hígado. El hecho de que el mismo sitio de unión funcione tanto en un intensificador como en un promotor sugiere que estos dos elementos influyen en la iniciación de la transcripción a través de mecanismos similares.

Schreiber y cols. (144) han sugerido que el fragmento pro liberado durante el procesamiento de la proalbúmina puede tener un efecto de retroalimentación positiva aumentando la síntesis de albúmina. Sin embargo, Weigand y cols. (145,146) sintetizaron el fragmento pro de la albúmina, pero no pudieron demostrar la acción de este en la síntesis de albúmina ni de proteínas totales en hepatocitos, incluso encontraron una ligera disminución (del

124) en la síntesis de albúmina y una clara disminución en un sistema acelular de síntesis de proteínas (147). Estos experimentos están en contra de la hipótesis de Schreiber y cols. (144). Por otra parte, no analizaron el efecto que pudiera tener el fragmento pro en la transcripción.

Además de los elementos cis y trans, se ha visto que el proceso de transcripción del gen de albúmina, y de muchos otros genes, puede estar regulado por cambios globales o locales en la conformación de la cromatina (sitios hipersensibles a la ADNasa), así como por el nivel de metilación de ciertas citocinas específicas, es decir, el número de metilaciones en los genes inactivos es mayor que en los activos y se ha sugerido que cuando disminuye el número de metilaciones se induce la transcripción del gen (148).

Hay muchos factores que parecen influir en la síntesis y degradación de albúmina in vivo. Entre estos se encuentran la nutrición, el estrés, la presión oncótica, las hormonas y varias enfermedades (149). Aunque es muy difícil asegurar la influencia específica de cada uno de estos factores en presencia de muchos mecanismos regulatorios, parece claro que uno de los más importantes es la nutrición adecuada. El efecto de la alteración en la ingesta de proteínas en la síntesis de albúmina es mucho más marcada que en la producción total de proteínas hepáticas (149).

Las hormonas tiroideas y la cortisona aumentan la síntesis de albúmina. La síntesis del ARNm y el ARN ribosomal está reducida en animales tiroidectomizados. La cortisona estimula la síntesis de ARN hepático total y hay evidencias de que la

cortisona estimula la producción de albúmina sérica (149). El tratamiento de células Hep-G2 con triyodotironina aumenta la secreción de albúmina lo cual puede explicarse por el aumento en su ARNm (150) y esto también se ha observado en Xenopus laevis (151). Sin embargo, otros autores han observado que la triyodotironina no tiene efecto sobre la transcripción del gen de albúmina en cultivos de hepatocitos de rata (152) lo cual indica que el aumento en la síntesis de albúmina y de su ARNm por la triyodotironina se debe a procesos post-transcripcionales.

Se ha sostenido que la insulina es necesaria para una producción máxima de albúmina en hígado perfundido aislado y se han demostrado alteraciones en la estabilidad de polisomas y del retículo endoplásmico en la diabetes experimental (149). Por otra parte, se ha visto que hay un aumento en el ARNm de albúmina en ratas diabéticas tratadas con insulina y que este aumento se debe a un mecanismo post-transcripcional ya que la insulina no altera la velocidad de transcripción del gen (153), lo cual también se ha observado en cultivos de hepatocitos de rata (152).

También hay una clara disminución en la concentración de albúmina en animales hipofisectomizados y esto se puede corregir si los animales reciben inyecciones apropiadas de hormona de crecimiento (149).

Otros tres factores que disminuyen la síntesis de albúmina son el factor de necrosis tumoral alfa y la vasopresina, a nivel de ARNm (154,155), y el anestésico halotano (156).

La transcripción del gen de albúmina disminuye dramáticamente si no se adiciona suero y hormonas al medio de cultivo de

hepatocitos, y esta disminución se previene por la adición de dexametasona, la cual restablece la transcripción (152). Además, en ratas adrenalectomizadas la transcripción del gen de albúmina disminuye pero se restablece con la administración de hidrocortisona. Todo esto está apoyado por la identificación de una secuencia regulatoria que responde a glucocorticoides entre las bases -150 y -62 entre el "TATA box" y el "CAAT box" en el flanco 5' del gen de albúmina. La cicloheximida inhibe la inducción de la transcripción de este gen por dexametasona, lo cual sugiere que una proteína mediadora rápidamente inducida, que también es regulada por glucocorticoides, está involucrada en la inducción de la expresión del gen de albúmina por estas hormonas. El gen de albúmina también se regula por otras hormonas además de los glucocorticoides. El glucagón potencia la inducción de la transcripción por dexametasona, aunque el glucagón solo no tiene efecto sobre la transcripción (152), pero sí sobre la síntesis de proteínas (149). Por el contrario, la epinefrina suprime la estimulación de la expresión del gen de albúmina por dexametasona (152).

Por otra parte, parece que las propiedades osmóticas de la albúmina juegan un papel importante en la regulación de la producción de albúmina tanto in vivo como in vitro (32,37-39, 149, 157, 158).

En algunas enfermedades se han descrito alteraciones en el nivel de albúmina, y en algunas de ellas la determinación de esta proteína se ha usado como herramienta de pronóstico. Algunas de estas enfermedades donde se desarrolla hipoalbuminemia son la cirrosis hepática, infección crónica, tumores con metástasis,

desnutrición asociada a trauma o procedimientos quirúrgicos, lesiones masivas de la piel y recuperación de traumas; también se ha encontrado hipoalbuminemia en lesiones específicas que involucran al tracto gastrointestinal, en la analbuminemia, la nefrosis y el alcoholismo. El estrés, lesiones, cirugías y enfermedades de la piel son otros síndromes asociados frecuentemente con alteraciones en la producción de albúmina (149,159,160).

Durante la inflamación disminuye la síntesis de albúmina y los niveles hepáticos de su ARNm (161). Se ha postulado que los productos monocíticos, especialmente la interleucina 1, juegan un papel importante en esta reducción (162).

En la regeneración hepática inducida con  $\text{CCl}_4$  la transcripción del gen de albúmina disminuye un 85% mientras que la transcripción del gen de alfa-fetoproteína aumenta de niveles no detectados a un 50% de la observada en albúmina (163). Los cambios en los niveles del ARNm de albúmina y de alfa-fetoproteína correlacionan con los cambios en la transcripción, lo cual indica que los niveles del ARNm de albúmina, así como los de alfa-fetoproteína, están regulados a nivel transcripcional en la regeneración hepática (163).

Por otra parte, en la fibrosis hepática inducida por  $\text{CCl}_4$ , Panduro y cols. (164) encontraron que durante la fase inicial hay una disminución en la transcripción del gen de albúmina asociada con un aumento en la transcripción del gen de alfa-fetoproteína. Posteriormente, ya durante el desarrollo de la fibrosis, mientras la transcripción del gen de albúmina se

mantiene normal o incluso aumenta, la transcripción del gen de alfa-fetoproteína disminuye (164).

Al analizar la velocidad de transcripción y los niveles de ARNm de algunos genes específicos o preferenciales del hígado durante el desarrollo normal de la rata, Panduro y cols. (165) encontraron ejemplos de control transcripcional como albúmina, alfa-fetoproteína y transferrina, y de control post-transcripcional como GPA y apos A-I y E, así como de regulación mixta. También observaron que en algunos genes el modo predominante de regulación de su expresión puede cambiar de transcripcional a post-transcripcional en diferentes etapas del desarrollo del hígado y que algunos miembros de familias multigénicas (como las apos) pueden mostrar modos de regulación independientes y algunas veces contrastantes (165).

En ratas quemadas, la velocidad de transcripción del gen de GPA se mantiene constitutiva, los genes de alfa y gama fibrinógeno se activan, mientras que la transcripción del gen de albúmina disminuye. La concentración de ARNm de GPA y de fibrinógeno aumenta, mientras que la del ARNm de albúmina disminuye (166). Comparando los cambios en las velocidades de transcripción con los niveles de ARNm se concluyó que las concentraciones del ARNm de GPA se regulan predominantemente por un mecanismo postranscripcional, las del ARNm de albúmina por un mecanismo transcripcional y los del ARNm de fibrinógeno por una combinación de ambos (166).

Entonces, en general y hasta la fecha se ha aceptado que la síntesis de albúmina está regulada a nivel transcripcional, excepto en el caso de los cambios por triyodotironina o por

insulina.

### 3. TRANSFERRINA

#### 3.1 CARACTERISTICAS DE LA TRANSFERRINA

La transferrina es una globulina B1 también conocida como siderofilina o globulina B1 que une metal (167). Está formada por una sola cadena polipeptídica, contiene 6% de carbohidratos (en humano) y tiene un peso molecular de 79,600 d en el humano y 76,500 d en la rata (167-169). Presenta muchos puentes disulfuro intracatenarios por lo que tiene una estructura compleja (169). Su concentración en plasma es de 200-400 mg/dL (168). Es la proteína responsable del transporte de hierro desde las superficies de absorción hasta la médula ósea donde se incorpora al grupo hemo de la molécula de hemoglobina (167). Cada molécula une específicamente dos átomos de hierro libre (170). Parece que no solo se produce en el hígado sino también en bazo, médula ósea y nódulos linfáticos (169). También transporta hierro en cantidades pequeñas al hígado y otros tejidos para la incorporación a sistemas enzimáticos que contienen hierro (por ejemplo, los citocromos) (170). La transferrina se une a los receptores de superficie de los reticulocitos, entra a la célula y libera el hierro, después regresa a la sangre como apotransferrina libre de hierro (171).

### 3.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE TRANSFERRINA Y REGULACION DE SU SINTESIS

El gen de transferrina pertenece a una familia génica compuesta por el gen de melanotransferrina (una proteína de membrana que une hierro), el gen de lactotransferrina (una proteína que se presenta en la leche y otros fluidos), un pseudogen de transferrina y el gen del receptor de transferrina (172). Esta familia génica se encuentra en el brazo q del cromosoma 3 humano (172). Hay una sola copia del gen de transferrina en el genoma humano y de pollo (173). La secuencia de bases de este gen ya se conoce. Tiene un tamaño total de aproximadamente 33.5 kb y está organizado en 17 exones (numerados del 1 al 17) separados por 16 intrones (A-P). La longitud de los exones varía desde 33 nucleótidos (exón 11) hasta 206 nucleótidos (exón 17) teniendo longitudes en promedio de 150 nucleótidos. La longitud de los intrones varía de aproximadamente 675 nucleótidos (intrón F) hasta 5300 nucleótidos (intrón N), la longitud de los intrones es mucho más heterogénea que la de los exones (172). La longitud del ARNm de transferrina de humano es de 2315 pb (174). Este gen cumple con la regla GT-AG para la unión intrón-exón (172). El sitio de iniciación de la transcripción se localiza 50 pb hacia el extremo 5' del codón de iniciación de la traducción. Dentro de la región 5' del gen de transferrina se encuentra un "TATA box" y dos "CAAT box" (172).

Se cree que el gen actual de transferrina surgió de un gen ancestral que sufrió una duplicación intragénica y que las mitades amino y carboxilo terminales de la proteína presentan una gran homología, y de esta manera la proteína ganó dos sitios de

unión para el hierro que transporta (173).

La longitud total del ARNm de transferrina es de 2315 pb. Analizando 620 pb de la región 5' del gen de transferrina humano se encontraron varias regiones reguladoras cis: múltiples elementos reguladores unidores de metales, dos secuencias de unión del factor de transcripción Sp1, un elemento del receptor a progesterona, una secuencia regulatoria que une glucocorticoides, un dominio regulatorio de AMPc y varios intensificadores cis (174). Asimismo, otros autores, analizando también la secuencia nucleotídica de la porción 5' del gen de transferrina, encontraron secuencias cortas que se asemejan mucho a elementos regulatorios que responden al receptor de metales pesados y una probable señal de reacción de fase aguda (175).

El flanco 5' del gen de transferrina también contiene una secuencia de 14 pb que se asemeja a secuencias presentes en los genes de interleucina 2 (IL-2) e interferón gama que están altamente conservadas en las regiones promotoras de estos genes y que se ha sugerido que funcionan como elementos regulatorios cis. Esta secuencia podría estar involucrada en la activación transcripcional coordinada de estas proteínas antes de la proliferación de linfocitos (175).

El gen de transferrina contiene un elemento cis específico del hígado (PRI) en los nucleótidos -76 a -51 cuya secuencia de ADN es homóloga a una secuencia presente en la región 5' esencial para la transcripción del gen de antitrombina III de humano y a otra secuencia específica de hígado del promotor del gen de alfa-1 antitripsina (dominio A) (176). El factor trans Tf-

LF1 que se une al elemento cis PRI interactúa con la región homóloga de antitrombina III, pero es diferente del factor LF-A1 que interactúa con el dominio A del promotor del gen de alfa-1 antitripsina. El centro de este elemento PRI presenta la misma secuencia de 10 nucleótidos que el elemento DRI, el cual es un elemento regulatorio positivo distal del mismo promotor localizado en los nucleótidos -480 a -454; y el factor trans que se une a este elemento, Tf-LF2, es diferente del factor que se une al elemento PRI y del factor LF-A1 que se une al promotor de la alfa-1 antitripsina (176).

En las líneas celulares de hepatoma humano (Hep-G2 y Hep-3B) y de carcinoma epitelial (HeLa) se han identificado cuatro regiones diferentes funcionalmente: a) un promotor para la expresión específica de hígado entre las posiciones -125 y -45; b) una región del promotor distal de -620 a -125 pb conteniendo elementos cis positivos y negativos los cuales regulan la actividad del promotor; c) una región con acción negativa a -1.0 y -0.6 kb del promotor; y d) un intensificador localizado entre -4.0 y -3.3 kb que es más activo en células de hepatoma que en células HeLa (177).

Aunque el hígado es el principal sitio de síntesis de transferrina, este gen se expresa en menor proporción en otros tejidos como linfocitos T, músculo fetal, y oligodendrocitos del cerebro (177, 178). La concentración más alta del ARNm de transferrina en rata está en el hígado y en el plexo coroide de los ventrículos lateral y tercero. Se han encontrado bajas concentraciones en médula y tálamo, plexo coroide del 4o. ventrículo, corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo, pituitaria,

testículos, placenta, estómago, bazo, riñón, músculo y corazón (179).

La síntesis de transferrina se estimula por hormonas esteroides y por la deficiencia de hierro nutricional tanto en hígado de rata como de pollo (177). Por otra parte, el AMPc disminuye la síntesis y secreción de transferrina en células epiteliales del plexo coroide de rata (180) lo cual debe estar mediado por el dominio regulatorio de AMPc del gen de transferrina antes mencionado (174), mientras que la serotonina aumenta los niveles de transferrina e induce un cambio concomitante en las concentraciones de su ARNm (180). Además, la hidrocortisona reduce marcadamente los niveles del ARNm de transferrina (181).

Hay evidencias de que la vitamina A (182), los estrógenos (183) y la dexametasona (184) estimulan la transcripción del gen de transferrina.

Por último, hay evidencias experimentales de que la biosíntesis y secreción hepática de transferrina, y probablemente de otras proteínas séricas, se inhibe por la estimulación del nervio simpático y aumenta por la estimulación del nervio parasimpático (185).

#### 4. FIBRINOGENO

##### 4.1 CARACTERISTICAS DEL FIBRINOGENO

El fibrinógeno, también conocido como factor I de la coagulación, es una glucoproteína con un peso molecular de

aproximadamente 340,000 d (167), contiene un 3% de carbohidratos (168), su concentración normal en plasma es de 200-455 mg/dL (169) y se sintetiza en el hígado (167). Esta proteína está compuesta por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro para formar una molécula compuesta por dos partes simétricas. Estas cadenas se conocen comúnmente como A-alfa, B-beta y gama, sus pesos moleculares son 63,500, 56,000 y 47,000 d, respectivamente y contienen 610, 461 y 411 residuos de aa, respectivamente. El peso molecular calculado de estas cadenas es de 333,000 d para el dímero. Para determinar el peso molecular total hay que sumarle las dos cadenas de carbohidratos, cada una de 2,500 d, en las cadenas B-beta (unida al residuo 364) y a las cadenas gama (unida al residuo 52). La cadena A-alfa es la que produce todos los tipos de fibrinopéptido A cuando es atacada por la trombina, la cadena B-beta es la que produce el fibrinopéptido B y la cadena gama es la que no es atacada por la trombina (186). Ya se ha establecido la estructura primaria de las tres cadenas (186). El fibrinógeno es la proteína central involucrada en la coagulación sanguínea ya que es el precursor del coágulo de fibrina. Es una de las proteínas de fase aguda ya que sus niveles aumentan de 3 a 4 veces durante las primeras 24 horas de una reacción inflamatoria aguda por lo que se ha usado como un indicador sensible de inflamación (187).

#### 4.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE FIBRINOGENO Y REGULACION DE SU SINTESIS

En realidad la síntesis de fibrinógeno depende de una familia

de 3 genes localizados en una pequeña región de 50 kb del brazo largo (q) del cromosoma 4 del humano (188). En el genoma humano existe solo una copia de cada gen, el gen que de la cadena alfa está en medio con el gen de la cadena gama a 10 kb de distancia de un lado y el gen de la cadena beta a 13 kb del otro lado (188). Los genes de las cadenas alfa y gama se transcriben hacia el gen de la cadena beta. En cambio, este último se transcribe en dirección opuesta y en la hebra complementaria de ADN (188).

Las cadenas alfa, beta y gama del fibrinógeno están codificadas por ARNs de 2300, 2050 y 1950 nucleótidos respectivamente en la rata (189).

La longitud estimada del gen de la cadena alfa en el humano es de aproximadamente 9150 pb, la del gen de la cadena beta es de 7430 pb y la del gen de la cadena gama es de 9430 pb. El gen de la cadena alfa presenta 5 exones y 4 intrones y el de la cadena beta, al igual que el de la cadena gama, presenta 8 exones y 7 intrones (188).

Se han encontrado varias regiones altamente conservadas comparando las secuencias traducidas y no traducidas del extremo 3' del gen de la cadena beta de humano, rata, bovino y lamprea. Estas regiones parecen representar diferentes dominios funcionales de la proteína como por ejemplo, sitios de enlace disulfuro, sitios de glucosilación, sitios de unión de calcio y sitios que pueden unir el extremo amino de otras cadenas beta durante la polimerización de la fibrina (190).

Debido a la similitud de secuencias de aa y de nucleótidos entre los tres genes, así como por similitudes de los dominios intrón-exón en los extremos 5' de estos genes, se cree que los

genes de las diferentes cadenas del fibrinógeno surgieron, al igual que los de otras familias génicas de eucariontes, por duplicación y divergencia de un gen ancestral. Se piensa que un gen ancestral se duplicó para formar el gen de la cadena alfa y el gen pre beta-gama, posteriormente el gen pre beta-gama se duplicó para dar lugar a los genes individuales beta y gama (188). Existen algunas teorías para explicar el inesperado arreglo actual de estos tres genes (188).

Al analizar el ensamble de las cadenas de fibrinógeno en células Hep-G2 se encontró que las células contienen pozas intracelulares de las cadenas A-alfa y gama que participan en el ensamble del fibrinógeno. Este comienza mientras las cadenas B-beta nacientes incompletas están unidas a los polisomas. Las cadenas A-alfa y gama tomadas de la poza intracelular se combinan independientemente con las cadenas B-beta crecientes. Cuando se terminan de sintetizar las cadenas B-beta, los complejos recién formados B-beta-A-alfa y B-beta-gama se liberan de los polisomas y entran al espacio luminal del retículo endoplásmico. Más tarde otras cadenas A-alfa y gama se adicionan por la formación ordenada de puentes disulfuro, dirigiendo la formación eventual del fibrinógeno dimérico (191). Estas observaciones sugieren que la síntesis de la cadena B-beta puede ser el factor limitante en el ensamblaje del fibrinógeno y que la producción de esta proteína puede ser fácilmente regulada modificando la velocidad de síntesis de la cadena B-beta (191). Sin embargo, Crabtree y Kant (192) han demostrado que en la estimulación de síntesis de fibrinógeno en hígado de rata por la desfibrinación hay una

acumulación virtualmente idéntica del ARNm de las tres cadenas y, aunque estos autores no sabían si los cambios en los niveles de los ARNm estaban en función de su transcripción o de su estabilidad, las cinéticas similares de la acumulación sugerían que un mecanismo común era el responsable de coordinar los niveles de cada uno de los ARNm del fibrinógeno (192). Por otra parte, durante la reacción de fase aguda también se ha observado este aumento simultáneo de los ARNm de las cadenas alfa, beta y gama del fibrinógeno. Esto sugiere fuertemente que la transcripción de los tres genes está regulada coordinadamente. Además, al comparar las secuencias de las regiones que rodean los puntos de iniciación de la transcripción de los genes de fibrinógeno de la rata, se encontraron dos regiones homólogas. Una región consiste de 15 nucleótidos que tiene una parte central común de 6 nucleótidos y está entre las bases -116 y -160; la otra es de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y está en la región -165 a -472. Se cree que estas áreas de secuencias conservadas juegan un papel en la regulación de la transcripción de fibrinógeno (192). Además, el gen de beta-fibrinógeno tiene una secuencia de 22 nucleótidos en la posición -480 que es homóloga a secuencias que se presentan en genes regulados por glucocorticoides en una posición similar (193).

Por otra parte, Courtois y cols. (194) encontraron que el factor nuclear de hepatocito 1, la proteína nuclear que se une al elemento B del promotor del gen de albúmina (140,141), también se une a una secuencia que se requiere para la transcripción específica de hepatocito de los genes de las cadenas alfa y beta del fibrinógeno. El elemento cis que une al factor nuclear de

hepatocito 1 se encuentra en la posición -102 a -75 del promotor del gen de la cadena beta del fibrinógeno (194). La restringida expresión del factor nuclear de hepatocito 1 y su interacción selectiva con regiones de control de varios genes específicos del hígado como el de la alfa-1 antitripsina, además de los que ya se han mencionado, indican que esta proteína está involucrada en la expresión génica regulada por el desarrollo en el hígado.

Por otra parte, Morgan y cols. (195) encontraron que las secuencias entre 88 y 43 pb hacia el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del gen de la cadena gamma del fibrinógeno, funcionan como elementos cis para dirigir la síntesis de su ARNm en hepatocitos transfectados. Estos autores demostraron que dos factores transcripcionales conocidos y uno probable, interactúan con esta secuencia de 47 pb: el factor de transcripción S1 interactúa con las secuencias entre -51 y -46, adyacente a este sitio, entre los nucleótidos -66 y -53, hay una secuencia que une un factor que se une al "CAAT box" y, por último, en el lado 5' de este sitio, está el sitio de unión del factor transcripcional de adenovirus (MLTF) (195).

Una consecuencia de la interacción de estas proteínas es que se desarrolla una curvatura en el ADN en o cerca de sus sitios de interacción, lo cual apoya la teoría de que los cambios en la conformación del ADN puede regular la expresión génica.

Los glucocorticoides y el factor estimulador de hepatocitos (HSP), un polipéptido derivado de monocitos/macrófagos, son potentes reguladores de la biosíntesis del fibrinógeno. Se ha visto que, en cultivos primarios de hepatocitos y en una línea

celular de hepatoma de rata (FAZA), aunque el factor estimulador de hepatocitos y los glucocorticoides por separado aumentan la secreción de fibrinógeno (y los niveles de ARNm citoplásmico en el caso del factor estimulador de hepatocitos), ocurre una mucho mayor elevación en la producción de fibrinógeno cuando están presentes ambos factores. Los experimentos de "run-off" nuclear revelaron que el factor estimulador de hepatocitos estimula la transcripción, mientras que los glucocorticoides no. Sin embargo, se requieren ambos factores para una transcripción máxima. Estos hallazgos proporcionan una fuerte evidencia de que el factor estimulador de hepatocitos es un regulador transcripcional de los genes de fibrinógeno y que la potenciación por glucocorticoides de la transcripción es ejercida a través de un mecanismo que involucra la síntesis de proteínas. Es decir, estos datos demuestran que se requieren dos tipos de moléculas reguladoras en el control de la expresión del gen de fibrinógeno: una hormona polipeptídica (factor estimulador de hepatocitos) que aumenta la transcripción y un esteroide (dexametasona) que intensifica la acción del polipéptido (196).

Otros estímulos patológicos o fisiológicos que influyen en la producción de fibrinógeno por el hígado son la hormona del crecimiento, el embarazo, polipéptidos liberados de leucocitos durante la inflamación aguda (189), la producción de heridas, o la infección bacteriana (197).

El ARNm de fibrinógeno está presente no solo en hígado sino en riñones de ratas neonatales y en el saco vitelino (198).

## 5. GLUCOPROTEINA ACIDA ALFA-1

### 5.1 CARACTERISTICAS DE LA GLUCOPROTEINA ACIDA ALFA-1

La glucoproteína ácida alfa-1 (GPA) es una globulina alfa a la cual también se le conoce como orosomucoide, uromucoide o seromucoide alfa-1 (alfa-1-S) (167,199). Es una proteína de fase aguda y sus niveles aumentan consistentemente en respuesta a infecciones, inflamación y malignidad (199). Tiene un peso molecular de 40,000 d (169), contiene un 38% de carbohidratos (168) y está formada por una sola cadena polipeptídica de 181 residuos de aa (199). Tiene dos puentes disulfuro, uno entre los residuos 5 y 147 y otro entre los residuos 72 y 164. Presenta 5 cadenas de carbohidratos unidas a residuos de asparagina en las posiciones 15, 38, 54, 75 y 86. Su concentración en plasma es de 55 a 140 mg/dL (169) y se sintetiza en el hígado (167). A pesar de su concentración relativamente alta, lo cual la hace una de las principales proteínas del plasma, y del conocimiento de su estructura, su papel biológico aún no se conoce con certeza. Se han acumulado algunas evidencias de que la GPA está involucrada en la respuesta inmune. Estos datos indican que la GPA es un inmunosupresor, lo cual se ha relacionado en parte con su contenido de azúcares. Además, también tiene la capacidad de unir drogas lo cual se ha estudiado en los últimos años. Parece ser de especial importancia en el metabolismo de drogas básicas como son el propranolol o la quinidina, así como también de drogas psicotrópicas como diazepam e imipramina (199). También se ha informado que la GPA contiene un cofactor para la reacción de la lipoproteína lipasa que parece ser un glucosaminoglucano (52-54).

Sin embargo, a pesar de estas múltiples propiedades, no se le ha asignado un papel claro o definitivo a esta proteína y aún pertenece al grupo de las proteínas plasmáticas para las que se está buscando una función.

## 5.2 ESTRUCTURA DEL GEN DE GLUCOPROTEINA ACIDA ALFA-1 (GPA) Y DE SU SINTESIS

Los análisis de la secuencia de aa de la GPA humana purificada del plasma de varios individuos han mostrado una heterogeneidad considerable (200), de 181 residuos de aa de la proteína se han encontrado 21 sustituciones. En un principio se pensó que se debía a mutaciones puntuales, pero ahora se ha demostrado que esto puede explicarse por la existencia de tres regiones adyacentes que contienen la información para la síntesis de GPA en el genoma humano (200) y que se han confinado al cromosoma 9 (201). Estos tres genes se han denominado GPA-A, GPA-B y GPA-B', y son idénticas en la organización intrón-exón pero tienen diferente potencial de codificación, es decir, el gen GPA-A se expresa más que los otros dos (202). En el genoma de la rata solo hay una copia de este gen (203).

El flanco 5' del gen humano contiene toda la información para dirigir la transcripción y es prácticamente idéntica en los tres genes humanos. Una posibilidad para explicar que el gen GPA-A se exprese aproximadamente 100 veces más que los otros dos, es que la información presente en los intrones (la mayoría de los cuales se ha secuenciado sin revelar ninguna diferencia interesante) podría ser la responsable. La otra posibilidad es un efecto de la

posición por lo cual la transcripción está esencialmente limitada al primer gen del grupo. Esto se ha observado en otros grupos de genes como son los de haptoglobina (202).

Los genes de la GPA de humano y de rata están formados por 6 exones (I-VI) interrumpidos por 5 intrones. El sitio de iniciación de la transcripción se encuentra 36 bases hacia el extremo 5' del codón de iniciación de la traducción ATG, aunque es probable que haya otros sitios de iniciación del lado 5' de este sitio de iniciación (202). En la rata se han encontrado al menos 2 de estos sitios separados por 12 nucleótidos (204). La región promotora tiene un "TATA box".

El ARNm de la GPA de humano tiene aproximadamente 850 bases de longitud. En la región 3' no codificadora se encuentra la señal de poliadenilación (AAUAAA) 17 nucleótidos hacia el extremo 5' de la región donde se adiciona la poliadenina (205) y 18 en la rata (204).

La expresión del gen de GPA aumenta con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina-1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor inhibitorio de la leucemia (LIF) y glucocorticoides en células Hep-G2 (206).

La copia única del gen de rata presenta dos regiones regulatorias separadas que son necesarias y suficientes para reproducir el patrón de regulación del gen de GPA en células Hep-G2 (206-208). La estimulación por glucocorticoides está mediada a través de un solo elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en la posición -120 a -64 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Una secuencia de 142 pb localizada entre las

posiciones -5300 a -5150 y por lo tanto denominada elemento regulatorio distal (DRE) es la que responde a la interleucina-1, al factor de necrosis tumoral alfa, a la interleucina-6, al factor inhibitorio de la leucemia y al éster de forbol (208). Se tienen evidencias in vivo que apoyan la idea de que se necesitan por lo menos dos secuencias del extremo 5' para la inducción de la GPA durante la inflamación inducible por interleucina-6 (209).

Se ha encontrado una proteína que se une al ADN en células de hepatoma que interactúa con los elementos que responden a la interleucina-6 de los genes de varias proteínas de fase aguda (210-212). Los datos obtenidos indican que se requiere de la interacción de varias secuencias en el elemento regulatorio distal para alcanzar el potencial regulatorio óptimo. Por su importancia, se ha analizado más a fondo el elemento regulatorio distal y se ha encontrado la presencia de dos regiones separadas que muestran una actividad regulatoria específica de citocina en células de hepatoma de ratas transfectadas: la región que responde a la interleucina-1 confinada a los 62 pb del extremo 5' del elemento regulatorio distal cuya función parece depender de al menos dos componentes separados, y que también responden a tratamiento con éster de forbol, y la región que responde a la interleucina-6 y que depende de una secuencia de 54 pb localizada en la mitad 3' del elemento regulatorio distal. Ambas regiones presentan un efecto sinérgico sobre la expresión del gen de GPA (203). Se han obtenido resultados que sugieren que la regulación transcripcional a través del elemento regulatorio distal debe estar controlada por modificaciones post-transcripcionales de factores trans que están constitutivamente

unidos al elemento regulatorio distal (203).

Se ha visto que durante la inflamación los niveles hepáticos del ARNm de GPA aumentan hasta 90 veces con respecto a sus niveles normales y este aumento es el responsable de la elevación en la concentración plasmática de la proteína (213).

La GPA y la prealbúmina se sintetizan a bajos niveles en el hígado de ratas normales y no hay una asociación de sus genes con la matriz nuclear, en cambio, la albúmina, la transferrina y la cadena beta del fibrinógeno se sintetizan a niveles mucho más altos en el hígado normal y sus genes están asociados a la matriz nuclear. Durante la inflamación aumenta la síntesis de GPA y de beta-fibrinógeno y la asociación de sus genes con la matriz es más fuerte que en condiciones normales, sin embargo, la disminución en la síntesis de albúmina no altera la asociación de su gen con la matriz. Estas observaciones sugieren que, aunque la asociación de un gen con la matriz nuclear puede alterarse por cambios en su nivel de expresión, no todos los cambios en la expresión de un gen alteran su asociación con la matriz nuclear (214).

## 6. APOLIPOPROTEINAS AI Y E

### 6.1 CARACTERISTICAS DE LA APOLIPOPROTEINA AI (apo AI)

La apo AI es la apolipoproteína más abundante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aunque también está presente en quilomicrones y en lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL) (215). Está representada en su forma monomérica por una

sola cadena polipeptídica de 243 residuos de aa con un peso molecular de 23,016 d, que puede formar agregados de mayor peso molecular cuando se asocian varias de estas cadenas entre sí en amortiguadores acuosos, interactúa con superficies anfífilas y activa a la lecitina-colesterol acil transferasa. Esta última enzima es la responsable de la generación de ésteres de colesterol a partir de colesterol no esterificado en el plasma. La concentración de apo AI en plasma es de 100-200 mg/dL. Se sintetiza principalmente en hígado e intestino. En ambos tejidos se sintetiza como pre-pro apo AI, la cual tiene 24 residuos de aa más que la apo AI madura en el extremo amino. De estos 24 residuos de aa, 18 pertenecen al segmento pre o péptido señal, y 6 pertenecen al segmento pro. El fragmento pre se escinde intracelularmente por una peptidasa señal, mientras que el segmento pro se escinde en una unión Gln-Asp extracelularmente. Se sabe que esta proteasa tiene una afinidad por los quilomicrones, VLDL y HDL, y que se disocia de la superficie de estas lipoproteínas con concentraciones altas de sal. No se conocen aún la fuente y las propiedades moleculares de estas enzimas. Su participación en la conversión de prepro apo AI a apo AI sugiere que puede jugar un papel en el proceso de ensamble y maduración de HDL (215).

## 6.2 CARACTERÍSTICAS DE LA APOLIPOPROTEÍNA E (apo E)

La apo E es una glucoproteína de una sola cadena polipeptídica de 299 residuos de aa con un peso molecular de 34,145 d y que contiene diferentes cantidades de carbohidratos

(215). Su concentración plasmática es de 3.6 mg/dL. En el plasma normal, la mayoría de la apo E está asociada con VLDL, con las fracciones más ligeras de HDL (HDL y HDL<sub>2</sub>) y con IDL. Después de la ingesta de colesterol, la apo E también se encuentra en una lipoproteína HDLc, la cual es más grande que HDL<sub>2</sub> y particularmente rica en esta apolipoproteína. La apo E consiste en varias isoproteínas que difieren en tamaño y/o carga como consecuencia de las mutaciones de aa y del contenido de ácido siálico. De acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio de Breslow, la apo E se sintetiza y se secreta con residuos de ácido siálico que se pierden en circulación. Por razones estructurales aún no definidas, la apo E es reconocida por el receptor de LDL (o receptor apo B/E) presente en tejidos hepáticos y extrahepáticos. También es un ligando específico para el receptor de apo E hepático involucrado en la captación de los remanentes de quilomicrones del plasma. En la apolipoproteína madura la región de unión del receptor se localiza entre los residuos 140-150. Inicialmente se pensó que la síntesis de apo E se llevaba a cabo solo en hígado e intestino. Sin embargo, parece que también se puede sintetizar en glándulas suprarrenales, ovarios, riñón, cerebro y células del retículo endotelial. En un sistema libre de células el producto primario de traducción del ARNm de apoE es una preproteína cuyo segmento pre está en el extremo amino de la proteína madura. Esto se ha confirmado por los análisis de secuencia del ADNc (215).

### 6.3 ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LAS APOLIPOPROTEINAS AI Y E, Y REGULACION DE SU SINTESIS

El gen de apo E se encuentra a 4 kb de distancia del gen de apo CI en el cromosoma 19 humano junto con el gen de apo CII. El gen de apo AI se encuentra formando un grupo con los genes de apo CIII y apo AIV en el cromosoma 11 de los humanos y en el 9 de los ratones. Ambos genes, al igual que los de las apos AII, CII y CIII, tienen 4 exones y 3 intrones. Los intrones parecen tener una localización muy similar en estos genes: el intrón I interrumpe la región 5' no traducible del gen, y en apo AI mide 197 pb; el intrón II interrumpe una región codificadora del gen muy cerca del sitio de rompimiento de la peptidasa señal, en apo AI mide 186 pb; y el intrón III interrumpe la parte del gen que codifica para el péptido maduro y en apo AI mide 588 pb (216).

La longitud de los tres primeros exones también es muy similar en los genes de las apos y la diferencia en la longitud total del ARNm de cada uno está dada por diferencias en la longitud del exón 4 (216). El exón 1 de apo AI mide 76 pb y el de apo E 44, el exón 2 de apo AI mide 63 pb y el de apo E 66 pb, el exón 3 de apo AI mide 157 pb y el de apo E 193 pb, y, por último, el exón 4 de apo AI mide 658 pb y el de apo E mide 860 pb. En el exón 1 se encuentran codificadas regiones no traducibles. Una pequeña porción del exón 2 contiene información para regiones no traducibles y el resto para el péptido señal. En una pequeña porción del exón 3 se encuentra codificada la parte terminal del péptido señal y en el resto el péptido maduro; en el caso de la apo AI hay una pequeña región de este exón que contiene la

información para la síntesis del segmento pro localizada entre la región donde se encuentra codificada la parte final del péptido señal y la región donde se encuentra codificado el péptido maduro. En la gran mayoría del exón 4 se encuentra codificado el péptido maduro y en su última porción (3') una región que no se traduce (216).

Los genes de las apos no solo comparten una estructura común con respecto a la organización de intrones y exones, sino que también presentan una homología significativa en las regiones codificadoras (216). Esta sorprendente similitud en la estructura de los genes de las apos en tres diferentes especies (humano, rata y ratón) apoya la hipótesis de que estos genes surgieron de un ancestro común y que los genes individuales evolucionaron a través de duplicaciones génicas parciales y completas (216).

La longitud total de las regiones codificadoras del gen de apo AI de humano es de 801 nucleótidos y del de la rata es de 776 nucleótidos, de los cuales en 705 se encuentra la información para el péptido maduro, en 18 para el segmento pro y en 54 para el péptido señal. El gen completo tiene una longitud de 1863 pb (216).

La longitud total de las regiones codificadoras del gen de apo E de humano es de 951 nucleótidos y del de rata es de 933 nucleótidos, de los cuales en 879 se encuentra la información para el péptido maduro y en 54 para el péptido señal (216).

El principal sitio de iniciación de la transcripción del gen de apo AI de humano está a 235 pb hacia el extremo 5' del codón de iniciación de la traducción en el hígado, y a 234 pb en el

intestino. Secuencias similares al "TATA box", al "CAAT box" y dos secuencias similares al "GC Box" están presentes en el intestino 30, 108, 220 y 440 pb hacia el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción respectivamente (217).

Los análisis de mutantes con deleciones en el flanco 5' de la apo AI humana revelaron que: a) las regiones de -250 a -199 pb, de -487 a -413 pb y de -1021 a -691 pb hacia la región 5' del sitio de iniciación de la transcripción contienen las secuencias que se requieren para una expresión máxima del gen; y b) las regiones de -2067 a -476 pb y de -199 a -80 pb contienen la secuencia que se requiere para la represión específica de tejido de la expresión del gen de apo AI en células no productoras de esta proteína (217).

Recientemente se han encontrado elementos regulatorios cis en las regiones del flanco 5' proximal y en el primer intrón del gen de apo E de humano (218).

Smith y cols. (219) demostraron que la región promotora de apo E es muy compleja, teniendo un conjunto de elementos positivos y negativos tanto en el flanco 5' como en el primer intrón. Encontraron 7 regiones en las primeras 360 pb del flanco 5' y una en el primer intrón que tienen un efecto positivo tanto en células HepG2, que sí expresan el gen de apo E, como en células HeLa, que no expresan este gen. Todas, excepto una de estas regiones positivas no específicas de tejido, se asocian con secuencias de ADN donde se unen proteínas. También encontraron 3 regiones en el flanco 5' que tienen efecto negativo en la expresión del gen en ambas líneas celulares y que contienen una secuencia similar al elemento A del gen de alfa-1 antitripsina.

Además, encontraron tres regiones negativas específicas de tejido que disminuyen la expresión en células HeLa, y una región que tiene efecto positivo específico de tejido en la expresión en células HepG2. Todas estas suman 15 regiones separadas que influyen en la expresión del gen de apo E. Se cree que esta multitud de elementos en el promotor de la apo E proporciona la compleja regulación de la expresión de este gen por tres condiciones separadas: el tipo celular, el nivel de colesterol intracelular y otros factores nutricionales y hormonales. Hasta la fecha parece que no hay otro gen descrito que tenga tantas regiones regulatorias (219).

Por otra parte, Paik y cols. (220) encontraron múltiples elementos regulatorios dentro de un fragmento de 1 kb esparcidos en los nucleótidos -651 a +356 del gen de apo E humano. Encontraron al menos tres dominios regulatorios en los 383 nucleótidos proximales. Uno de estos dominios contiene el elemento de control transcripcional "GC box" y los otros dos elementos contienen actividad similar a un intensificador. Estos intensificadores se localizaron en los nucleótidos -366 a -246 y -193 a -124. Un tercer intensificador se identificó en el primer intrón en los nucleótidos +44 a +262. Se encontró también que dos de estos (-193 a -124 y +44 a +262) unen proteínas en extractos nucleares de células HepG2 y de células de ovario de hamster chino. También se encontró que un elemento "GC box" que está en los nucleótidos -59 a -45 une proteínas (220).

Simonet y cols. (221) encontraron en ratones transgénicos que parece haber elementos regulatorios en el flanco 3' del gen

de apo E humano que interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción para estimular la expresión génica en el hígado y para suprimirla en el riñón.

En el perro, el ARNm de apo AI está presente en hígado y en intestino delgado aunque en el segundo solo hay un 15% del que se presenta en el hígado (222). El ARNm de apo E está presente en múltiples tejidos, como por ejemplo hígado (100%), yeyuno (17.5%), vejiga urinaria (7.5%), íleo (6.9%), colon (5.9%), cerebro (5.5%), riñón (5%), bazo (3.3%), páncreas (1%) y testículos (1%). Esta distribución tisular del ARNm de apo E indica que en el perro, al igual que en otros mamíferos como humano, rata, simios y marmotas (223-226), la síntesis periférica de apo E contribuye significativamente a la poza total de esta proteína (222).

A diferencia de los mamíferos no herbívoros, donde el hígado y el intestino son los sitios de síntesis de apo AI, en el conejo la expresión de apo AI está limitada al intestino y existe la posibilidad de que esta sea una adaptación a la dieta (227).

Las dietas de grasas polinsaturadas pueden alterar selectivamente la expresión del gen de apo AI de una manera específica de tejido. Se ha visto una fuerte correlación entre la apo AI plasmática y las concentraciones de ARNm de esta proteína en hígado, lo que sugiere que la concentración de apo AI está determinada significativamente por factores que regulan la concentración del ARNm de apo AI en el hígado (228). El ayuno aumenta selectivamente la secreción y los niveles hepáticos del ARNm de apo E, mientras que disminuye la secreción de todos los

lípidos lipoproteicos (229). La disponibilidad de lípidos parece jugar un papel en la determinación del complemento lipídico y el contenido de ácido siálico de la apo E secretada por los hepatocitos (229). Por otra parte, Kim y cols. (230) encontraron que tanto el ayuno como el ayuno más realimentación de una dieta de glucosa al 60% libre de grasas aumentan significativamente la síntesis de apo E y los niveles hepáticos de su ARNm. Estos autores encontraron que las grasas de la dieta no tuvieron efecto ni en presencia ni en ausencia de carbohidratos, y que los lípidos de la dieta tampoco parecen regular la síntesis de apo E en el hígado. Una dieta rica en sacarosa aumenta la síntesis de apo E en el hígado de la rata mientras que la producción de apo AI no cambia (231), lo cual se debe, al menos en parte, a un aumento en la transcripción de su gen (230).

La concentración de colesterol libre no esterificado es una determinante de la síntesis de apo E y esta regulación ocurre a nivel de ARNm (218). En el gen de apo E de ratón se encontraron dos regiones que probablemente estén involucradas en la regulación del ARNm de apo E por el colesterol (218).

En macrófagos peritoneales de ratón en cultivo, los cambios en el contenido de apo E y su secreción después del enriquecimiento o depleción de colesterol pueden atribuirse a alteraciones en los niveles del ARNm de apo E, los cuales, a su vez, están asociados con cambios en la transcripción del gen (232).

En cuanto a la apo AI, la incubación de células HepG2 con LDL o colesterol libre aumenta los niveles relativos de su ARNm y

la HDL los disminuye. Estos resultados indican que las vías de la LDL y de la HDL, así como el colesterol intracelular, pueden ser importantes en la expresión y regulación del gen de apo AI. La LDL y el colesterol libre aumentaron los niveles relativos del ARNm de apo AI, mientras que la HDL tuvo un efecto opuesto (233).

Se ha postulado que la expresión del gen de apo E en el hígado de la rata durante el desarrollo está bajo el control del glucagon plasmático y del balance glucagon/insulina (233). Sin embargo, esto no se ha podido demostrar ya que la insulina no afecta los niveles del ARNm de apo E a pesar de que disminuye la concentración de apo E en el medio de cultivo de células Hep-G2 (235) y de que no cambia, al igual que los glucocorticoides, los niveles de ARNm de apoE cuando se inyecta a la rata o cuando se adiciona al medio de cultivo de hepatocitos (230). Además, la insulina no modifica la secreción de apo E de hepatocitos en cultivo pero sí aumenta el contenido celular de esta proteína (230), este efecto se magnifica por la dexametasona y se suprime por el glucagon (236). De manera interesante, la insulina y la dexametasona aumentan de manera sinérgica la secreción de apo AI y este efecto se revierte solo parcialmente con glucagon (236).

Cuando los glucocorticoides o la insulina se agregan al medio de cultivo o se inyectan a la rata no modifican los niveles del ARNm de apo E (218).

Hasta la fecha, las únicas condiciones que claramente regulan la síntesis de apo-E en el hígado de la rata son el ayuno o una dieta alta en carbohidratos lipogénica (218).

La velocidad de síntesis de apo AI intestinal disminuye en ratas hipotiroideas y aumenta después de la administración de triyodotironina sin embargo, los niveles del ARNm no se alteran. En cambio, en animales hipotiroideos hechos hipertiroideos la síntesis de apo AI y la cantidad de su ARNm en hígado aumentan. La síntesis hepática de apo E aumenta en ratas hipotiroideas y disminuye en animales hipertiroideos. Sin embargo, los niveles del ARNm de apo E se mantuvieron sin cambio con todos estos tratamientos (237).

Las hormonas tiroideas estimulan rápidamente la transcripción del gen de apo AI, sin embargo, en el hipertiroidismo crónico los eventos postranscripcionales son los responsables del aumento en los niveles del ARNm de apo AI. Estas observaciones sugieren una retroalimentación negativa de los niveles nucleares del ARNm de apo AI sobre la transcripción de su gen (238).

La inyección del factor de necrosis tumoral alfa de ratón (caguectina) induce un rápido aumento en los niveles hepáticos del ARNm de GPA, mientras que los niveles del ARNm de apo E no cambian (239).

Los estrógenos aumentan los niveles hepáticos del ARNm de apo AI, pero no tienen ningún efecto sobre los de apo E (240). Estos mismos autores (240) han observado que los cambios en la ingesta de alimento juegan un papel importante en los efectos in vivo de los estrógenos sobre los niveles de los ARNm de las apos.

Panduro y cols. (165) encontraron que durante el desarrollo normal de la rata se observan cambios en los niveles hepáticos de las apos AI y E, y, al comparar las velocidades de transcripción

con los niveles del ARNm, estos autores llegaron a la conclusión que tanto la apo AI como la E presentan una regulación post-transcripcional.

Más recientemente, los mismos autores han demostrado que durante la regeneración hepática, en la cirrosis y en ratas analbuminémicas con hiperlipidemia, la apo E presenta un control principalmente transcripcional con un componente adicional de control post-transcripcional, mientras que la apo AI está controlada principalmente a nivel post-transcripcional, lo cual indica que estos genes están regulados independientemente. Durante estos tres estados patológicos hay un marcado aumento en la relación de ARNm de apo AI/apo E como resultado del aumento en los niveles del ARNm de apo AI y de la disminución del ARNm de apo E. Estos cambios ocurren de manera coordinada a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, y parecen estar asociados con un intento de mantener las partículas de apolipoproteínas en circulación (241).

Otros factores que pueden influir en el nivel de ARNm de apo AI en la cirrosis incluyen un posible efecto de hormonas esteroides, las cuales están elevadas en la cirrosis y causan un aumento en la expresión de apo AI (241).

Finalmente, en base a una gran variedad de estudios, se puede afirmar que la regulación de la expresión de los genes de las apolipoproteínas es multifactorial, en el cual participan hormonas, mediadores intracelulares y señales regulatorias de la región 5' no codificadora de sus genes.

## 7. ANTECEDENTES DIRECTOS

En 1976, Zaringher y cols. (36) demostraron que los niveles del ARNm de albúmina estaban aumentados en la fracción microsomal del hígado de ratas con SN experimental.

En 1982, Pedraza-Chaverri (37) demostró que los niveles hepáticos de ARNm de albúmina, medidos indirectamente, estaban elevados en ratas con SN inducido con ANP. Esta elevación se bloqueó con actinomicina D (un inhibidor de la transcripción), lo cual sugería que el incremento en los niveles de ARNm de albúmina se debían más que a una disminución de su degradación, a un aumento en la velocidad de su síntesis (transcripción).

En 1988, Yamauchi y cols. (13), confirmaron esos hallazgos midiendo los niveles hepáticos del ARNm de albúmina y la velocidad de transcripción de su gen en núcleos aislados de hepatocitos de ratas con SN usando un método directo para medir el ARNm de albúmina (hibridación con su ADNc).

Por otra parte, en 1988, Lewandowski y cols. (10) examinaron los niveles de ARNm de otras proteínas plasmáticas por la técnica de hibridación con ADNc específicos en el hígado de ratas nefróticas. Encontraron que el ARNm de albúmina, de beta-fibrinógeno, de haptoglobina, de metalotioneína, y de otras dos proteínas no identificadas estaba elevado, mientras que el ARNm de GPA estaba disminuido. Por medio de inmunoelectroforesis cruzada de proteínas plasmáticas, y por análisis de los productos sintetizados en un lisado de reticulocitos dependiente de ARNm exógeno, encontraron que la concentración de ciertas proteínas estaba elevada, mientras que la de otras estaba reducida.

En 1986, Tarugi y cols. (73) encontraron que los niveles hepáticos de ARNm de apo A-I estaban incrementados 3 veces, mientras que los de apolipoproteína AII y de apolipoproteína E no cambiaban en ratas con SN inducido con ANP.

En 1989, Kaysen y cols. (158), en otro modelo experimental de SN (inyección de suero antirriñón) encontraron que la dieta alta en proteínas (40%), junto con la reducción de la presión coloidosmótica del suero de estas ratas, estimula la síntesis albúmina a nivel de la transcripción de su gen.

Las ratas con SN inducido con ANP presentan una disminución importante de peso corporal (9-11) lo cual parece deberse a una disminución del consumo de alimento (11, 73 y observaciones no publicadas). Además, se ha demostrado que diferentes dietas y cambios en la ingesta de alimento pueden alterar la síntesis de proteínas, los niveles de ARNm específicos y las velocidades de transcripción (158, 228, 240, 242-248). Por lo tanto, no está claro si los cambios en los niveles de ARNm que se han observado en el SN experimental se deben estrictamente a la enfermedad o a la reducción de la ingesta de alimento. Por otra parte, todos los estudios a este respecto se han hecho solo en la etapa aguda (proteinúrica e hipoproteinémica) del SN y no se han determinado secuencialmente (durante las etapas pre-nefrotica, nefrotica, de remisión y post-nefrotica) los niveles hepáticos de los ARNm de las proteínas plasmáticas. Tampoco se han correlacionado los cambios en estos niveles con las principales alteraciones del SN (proteinuria, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia) ni con los cambios en el consumo de alimento, lo cual podría ayudar a esclarecer cuáles

son las señales que inducen los cambios en los niveles hepáticos de los ARNm.

## II O B J E T I V O S

1. Medir los niveles hepáticos de ARNm de albúmina, fibrinógeno, transferrina, glucoproteína ácida alfa-1 (GPA) y apolipoproteínas AI y E en diferentes etapas del síndrome nefrótico experimental después de la inyección del aminonucleósido de puromicina (pre-nefrótica, nefrótica, de remisión y post-nefrótica).
2. Investigar la influencia de la ingesta de alimento sobre los cambios en los niveles hepáticos del ARNm de las proteínas plasmáticas mencionadas en el síndrome nefrótico experimental. Con este propósito se medirán los niveles de ARNm de las mismas proteínas en ratas alimentadas a la par de las ratas nefróticas.
3. Determinar la relación entre los cambios en los niveles hepáticos de ARNms específicos y las principales alteraciones del síndrome nefrótico (proteinuria, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertrofia hepática) así como con los cambios en la ingesta de alimento.

### III MATERIAL Y METODOS

#### 1. REACTIVOS

El aminonucleósido de puromicina se compró de Sigma Chemical Co, EUA. El alimento usado fué Nutricubos Purina para roedores pequeños de Purina de México, S.A. El tiocianato de guanidina fué de Fluka Chemie AG, Suiza. La agarosa fué Sea-kem HGT de FMC Bioproducts, EUA. El bromuro de etidio fué de Boehringer-Mannheim, Alemania. Las membranas fueron Gene Screen de DuPont-New England, USA. EL CTP-<sup>32</sup>P fué de Amersham, Inglaterra. La ADN polimerasa I fragmento Klenow fué de Bio Labs, EUA. El líquido de centelleo usado fué Aquasol-2 de DuPont-New England Nuclear, EUA. La película de rayos X fué Kodak X-Omat XAR-5. Las bolsas de hibridación fueron de Kapak Corporation, EUA.

Los ADNC (sondas) que se utilizaron para determinar los ARNm específicos (164, 165, 241) se procesaron en la Unidad de Hepatología Molecular del INNSZ y fueron proporcionados por el Dr. Arturo Panduro Cerda para la elaboración de este trabajo experimental.

El resto de los reactivos fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

#### 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de un peso inicial de 110-120 g que se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición. Se estudiaron tres grupos:

a) Grupo con síndrome nefrótico (SN) (n = 32). El SN se indujo con una inyección subcutánea de una solución al 2% de ANP en solución salina al 0.9% a una dosis de 15 mg/100 g de peso (9, 249). A estos animales se les dió alimento estándar para rata ad libitum.

b) Grupo alimentado a la par (AP) (n = 24). Este grupo recibió una inyección subcutánea de vehiculo (salina al 0.9%) y se le restringió el alimento a la cantidad ingerida por las ratas con SN.

c) Grupo control (C) (n = 24). Estas ratas también recibieron una inyección subcutánea de vehiculo, pero se les dió alimento ad libitum.

Los tres grupos tuvieron libre acceso al agua de beber. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas 2 días antes de la inyección del ANP o vehiculo (día 0) y se mantuvieron en éstas los siguientes 33 días con el propósito de recolectar la orina y registrar el consumo de alimento diariamente. A la orina se le midió el volumen, se centrifugó y se dividió en alícuotas que se congelaron a -70°C hasta que se realizaron las determinaciones de proteínas totales y albúmina.

Para obtener un perfil de las diferentes etapas del SN se sacrificaron animales en los días 2 (etapa pre-nefrótica), 6 (etapa nefrótica), 11 (etapa de remisión) y 33 (etapa post-nefrótica). En cada día se sacrificaron 8 animales del grupo SN, 6 del grupo AP y 6 del grupo C.

Las ratas se sacrificaron por decapitación, se recolectó la sangre para separar posteriormente el suero, y el hígado se

extrajo lo más rápido posible. Este se pesó, una porción se cortó en pedacitos que se guardaron en tubos Eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ARN total. Todas estas maniobras se hicieron lo más rápido posible y en hielo para evitar la degradación del ARN por las ribonucleasas.

### 3. CARACTERIZACION DEL SINDROME NEFROTICO

Para caracterizar el SN se realizaron las siguientes determinaciones:

#### 3.1 PROTEINAS TOTALES EN SUERO Y ORINA.

Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry (250) para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: Carbonato de sodio	2.0%
Hidróxido de sodio	0.4%
Tartrato de sodio y potasio	0.02%

Solución B: Sulfato de cobre 0.05%

Solución C: 50 mL de solución A + 1 mL de solución B (se preparó al momento de usarse).

Solución D: Reactivo de Folin & Ciocalteu 1 N. Se preparó a partir de la solución concentrada 2 N.

Solución E: Albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 mg/mL. Con esta solución se preparó una curva patrón de 5 hasta 50  $\mu\text{g}$ .

La solución de albúmina o la muestra se colocaron en un volumen final de 0.2 mL, a todos los tubos se les agregó 1 mL de solución C, se agitaron y se dejaron reposar 10 min, posteriormente se les agregó 0.1 mL de solución D mientras se estaban agitando vigorosamente en vortex. Después de 30 min se

determinó la densidad óptica a 660 nm.

Antes de cuantificar las proteínas urinarias, éstas se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético al 10% de la siguiente manera: se mezclaron 200  $\mu$ L de orina y 1 mL de ácido tricloroacético se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min, el sobrenadante se decantó y esta operación se repitió 3 veces hasta que el resuspendido quedara transparente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 1 mL de NaOH 0.1 M y de esta manera la orina quedó con una dilución 1:5; en algunos casos se hizo una dilución adicional 1:100 (ratas con SN de los días 5 y 15) con agua destilada desionizada y se colocaron 0.2 mL de esta dilución en el ensayo. A los sueros se les hizo una dilución 1:100 con agua destilada y se colocaron 50  $\mu$ L en el ensayo completando a 0.2 mL con agua destilada para obtener una dilución final 1:400. Los resultados de proteínas totales en orina se expresan en mg/día y en suero en g/dL.

### 3.2 ALBUMINA EN SUERO Y ORINA.

Esta se determinó con el dato de proteínas totales y el porcentaje de albúmina que se obtuvo del trazo densitométrico de la electroforesis en acetato de celulosa. El porcentaje de albúmina se multiplicó por la concentración de proteínas totales y de esta manera se obtuvo la concentración de albúmina en g/dL para el suero y en mg/día para la orina (9).

### 3.3 COLESTEROL Y TRIGLICERIDOS EN SUERO.

El colesterol y los triglicéridos séricos se determinaron con estuches comerciales de Boehringer-Lakeside de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La determinación del colesterol se

ralizó con un método enzimático colorimétrico y la de triglicéridos con un método enzimático ultravioleta. Los resultados se expresan en mg/dL.

#### 4. DETERMINACION DE LOS NIVELES HEPATICOS DE ARNms ESPECIFICOS

La cuantificación de los niveles de hepáticos de ARNms específicos se llevó a cabo por medio de los siguientes métodos:

A) técnica de "Northern blot" y B) técnica de "Dot blot".

##### 4.1 TECNICA DE "NORTHERN BLOT".

En la figura 4 se muestra un esquema de la técnica de "Northern blot".

##### 4.1.1 Extracción de ARN total.

Para extraer el ARN total se utilizó la técnica de Chomczynski y Sacchi (251) con algunas modificaciones que se hicieron en la Unidad de Hepatología Molecular del INNSZ y que a continuación se describen:

1. Se homogenizaron con un politrón aproximadamente 200 mg de tejido hepático en 2 mL de solución A en un tubo Falcon de 50 mL.

##### Solución A

Tiocianato de guanidina	4.0 M
Citrato de sodio, pH 7.0	25.0 mM
Sarcosil	0.5 %
2 Mercaptoetanol	0.1 M

2. Se transfirió el homogenado a un tubo de vidrio Corex de 15 mL.

3. Se agregaron los volúmenes indicados de los siguientes

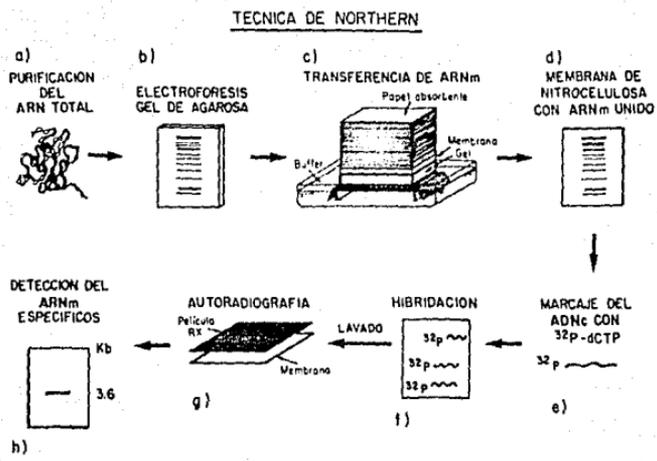


Figura 4. Pasos en la técnica de "Northern blot".

reactivos:

0.2 mL de acetato de sodio 2 M, pH 4.0  
2.0 mL de fenol neutralizado\* y a 65°C  
0.4 mL de cloroformo

\* Para neutralizar el fenol se le dió el siguiente tratamiento: se saturaron 50 mL de fenol con 50 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0, se agitó vigorosamente, se dejó reposar aproximadamente 20 min hasta que se vieron claramente las dos fases y finalmente se desechó la fase acuosa (superior). Esta operación se repitió dos veces más pero usando Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.

4. Se agitó y se enfrió en hielo durante 15 min.

5. Se centrifugó a 10,000 x g durante 20 min a 4°C.

6. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro tubo Corex y el ARN se precipitó con 175 µL de NaCl 4 M y 5 mL de etanol por cada 2 mL de fase acuosa durante 30 min a -70°C (concentración final de NaCl 0.1 M).

7. Se centrifugó durante 20 min a 10,000 x g a -10°C.

8. La pastilla se disolvió en 0.4 mL de solución A, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y el ARN se extrajo con volúmenes iguales de fenol neutralizado a 65°C y de cloroformo.

9. La fase acuosa (superior) se separó y se precipitó con 37.5 µL de NaCl 4 M y con 1 mL de etanol a -20°C (concentración final de NaCl 0.1 M) a -70°C durante 30 min y se centrifugó como se describe en el paso 7.

10. La pastilla se resuspendió en 100 µL de amortiguador TE 10/1 pH 7.0:

Tris-HCl 10 mM  
EDTA 1 mM

11. La concentración de ARN total se determinó al leer la D.O. a 260 nm colocando 2 µL de la muestra en 1 mL de

amortiguador TE 10/1 (Una unidad de  $A_{260}$  nm = 40  $\mu$ g de ARN). También se determinó la D.O. a 280 nm y se calculó la relación 260/280. Una buena preparación de ARN debe tener una relación de alrededor de 2.0.

#### 4.1.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa.

La electroforesis se hizo esencialmente de acuerdo al método de Thomas (252).

1. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 0.8 g de agarosa y 60 mL de agua destilada y desionizada, y se disolvieron calentando en agua a 95°C hasta que la solución quedara transparente.

2. Se agregaron:

6.64 mL de MOPS 12 X  
13.00  $\mu$ L de formaldehído al 37%  
4.00  $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg/mL)

MOPS 12 X  
MOPS 0.24 M  
Acetato de sodio 0.06 M  
Na<sub>2</sub>EDTA 0.012 M

y se agitó para homogenizar.

3. La solución se vació al molde del gel de 14 X 11 cm previamente ejuagado con agua estéril, secado y colocado en una superficie perfectamente horizontal con el o los peines colocados. Se dejó solidificar durante 20-30 min a temperatura ambiente.

4. En un tubo Eppendorf se colocó el volumen de muestra en donde estaban contenidos 10  $\mu$ g de ARN total y 23  $\mu$ L de solución desnaturante cuya composición es la siguiente:

Formamida 500  $\mu$ L  
MOPS 12X 83  $\mu$ L  
Formaldehído 37% 162  $\mu$ L

5. Se colocó en baño María a 60°C durante 10 min poniéndolo posteriormente en hielo.

6. Se agregaron 3 µL de solución de carga de la siguiente composición:

Azul de bromofenol	0.25%
Xileno de Cianol	0.25%
Ficoll 400	15.00%

7. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se agregó suficiente amortiguador de corrida para tapar ligeramente el gel. Este amortiguador se preparó de la siguiente manera:

MOPS 12X	41.6 mL
Agua hasta	500.0 mL

8. Se colocaron las muestras en los pozos del gel (hasta un máximo de 35 µL) y se corrió la electroforesis a 30-35 V durante 4 h aproximadamente. Después de que las muestras entraron al gel se agregó el resto del amortiguador de corrida.

9. Se apagó la fuente de poder, se sacó el gel del molde y se lavó varias veces con agua destilada con cuidado de no romperlo.

10. Se observó el gel con luz U.V. en un transiluminador y se obtuvieron fotografías del mismo. Se probó que la cantidad de ARN colocada en cada línea del gel fuera constante por la intensidad de la fluorescencia del bromuro de etidio con la luz U.V. en las bandas de ARN 18S y 28S.

#### 4.1.3 Transferencia del ARN de los geles de agarosa a las membranas de hibridación

La transferencia se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante de las membranas "Gene Screen" (Du Pont New England):

1. Se removió el exceso de formaldehído enjuagando el gel varias veces en agua destilada.

2. Se cortó la membrana (Gene Screen) a la medida exacta del gel y se humedeció en amortiguador de fosfatos 0.025 M, pH 6.5 o amortiguador de transferencia (50 mL de amortiguador 0.5 M aforados a 1 L) durante 15 min antes de colocarla en el gel.

3. Se humedecieron 1-2 piezas de papel filtro # 2 con el amortiguador de transferencia y se colocaron en un soporte de vidrio elevado de modo que los extremos del papel quedaron inmersos en el amortiguador (Fig. 4C).

4. En el siguiente orden se colocaron el gel, la membrana, 4 piezas de papel filtro (ligeramente menores que el gel), de 8 a 10 cm de toallas absorbentes (ligeramente menores que las piezas de papel filtro), un rectángulo de vidrio y una pieza de metal para compactar las capas ya descritas (Fig. 4C).

5. Se dejó que continuara la transferencia durante 12 horas. El papel absorbente se cambió frecuentemente y se agregó amortiguador de transferencia cuando fué necesario.

6. Se retiraron las toallitas y el papel filtro sin despegar la membrana.

7. Se retiró el gel junto con la membrana como una unidad y se observó en el transiluminador de luz U.V. para comprobar que todo el ARN se había transferido.

8. Se separó la membrana del gel y se marcaron en esta las líneas de referencia (ARN ribosómico) con lápiz.

9. Se lavó cuidadosamente la membrana con amortiguador de transferencia para eliminar residuos de agarosa, ya que estos

pueden interferir con la autorradiografía.

10. Se secó la membrana con papel filtro y después a temperatura ambiente o bajo el calor de un foco.

11. Se envolvió la membrana con papel filtro y aluminio y se colocó en un horno a 80-90°C durante 2-4 h.

12. Se guardó la membrana en una bolsa para hibridación y se colocó a -20°C hasta la hibridación.

#### 4.1.4 Marcaje del ADNc con dCTP-<sup>32</sup>P

Las sondas utilizadas se marcaron radiactivamente con <sup>32</sup>P por la técnica de "primer extension" descrita por Summers (253) y con modificaciones hechas por el Dr. Arturo Panduro Cerda como se describe a continuación:

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron:

2 µL	ADNc (200 µg/mL)
1 µL	NaOH 0.5 N
2 µL	Agua destilada estéril

Después de 2 a 3 min se adicionaron:

1 µL	Tris-HCl 1 M, pH 7.0
1 µL	ADN de timo de ternera (5 mg/mL)
2 µL	Amortiguador de polimerasa 10X (acetato de sodio 17.5 mM más dXTP 0.5 mM)
10 µL	dCTP - <sup>32</sup> P (ac. sp. 3000 Ci/mmol).
1 µL	Enzima ADN polimerasa I fragmento Klenow (5000 U/mL).

2. Inmediatamente después de la adición de la polimerasa, se incubó a 37°C durante 9 min.

3. Después de colocar en hielo, la reacción se detuvo adicionando 50 µL de amortiguador A cuya composición es la siguiente:

Tris-HCl	0.02 M, pH 7.5
EDTA	0.01 M, pH 8.0
NaCl	0.15 M
Dodecil sulfato de sodio	0.1 %

4. Se agregaron 5  $\mu$ L de acarreador de ADN (ARNT de levadura, 5 mg/mL).

5. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol (155  $\mu$ L).

6. Se centrifugó durante 10 min a 10 000 x g y el sobrenadante se decantó a otro tubo Eppendorf, se escurrió ligeramente la pastilla y se disolvió en 200  $\mu$ L de amortiguador TE 10/1, pH 8.0 de la siguiente composición:

Tris-HCl 10 mM pH 8.0  
EDTA 1 mM

7. Para determinar la actividad específica de la sonda marcada se colocaron 2  $\mu$ L de esta en un filtro de fibra de vidrio, se lavó en un Kitasato con filtro al vacío con HCl 5 N y etanol 3 veces.

8. El filtro se colocó en un frasco que contenía 5 mL de líquido de centelleo y se contó el  $^{32}$ P durante 1 min. La determinación de la actividad específica se realizó por duplicado para cada sonda marcada.

#### 4.1.5 Prehibridación e hibridación.

1. Se prehibridó la membrana en la bolsa de hibridación adicionándole la siguiente solución (8 mL/bolsa):

cantidades para un volumen de 8 mL	concentración final
Formamida desionizada, 4 mL sol. 100%	50%
*Solución de Denhardt al 2%, 0.16 mL	0.04%
+Solución de citrato de sodio, 2 mL de sol. 20X	5X
Dodecil sulfato de sodio, 0.32 mL de sol. 25%	1%
ADN de esperma de salmón, 15 mL de sol. 250 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL

*Solución de Denhardt		+Solución de citrato de sodio
Polivinil pirrolidona (40kDa)	2%	Citrato de sodio 0.3 M
Albúmina sérica bovina	2%	NaCl 3 M
Ficoll (400 kDa)	2%	

Se selló la bolsa y se colocó en un horno a 42°C durante 16 h (mínimo 3 h) moviéndola constantemente.

2. Al final de este período se abrió un extremo de la bolsa de plástico y se agregó el ADNc radiactivo. La bolsa se selló otra vez y se incubó a 42°C durante 16-48 h agitando constantemente.

3. Se retiró la membrana de la bolsa con mucho cuidado y se lavó de la siguiente manera:

a) Dos veces con 100 mL de solución de citrato de sodio 2 X (100 mL de solución de citrato de sodio 20 X para 1 L) a temperatura ambiente durante 5 min con agitación constante.

b) Dos veces con 100 mL de una solución de la siguiente composición: solución de citrato de sodio 2X y dodecil sulfato de sodio al 0.5% (100 mL de solución de citrato de sodio 20X + 20 mL de dodecil sulfato de sodio al 25% para 1 L) a 65°C durante 30 min con agitación constante en un baño Dubnoff.

Dodecil sulfato de sodio 25%

Dodecil sulfato de sodio 25 g  
Agua 100 mL

c) Dos veces con 100 mL de solución de citrato de sodio 0.1X (5 mL de solución de citrato de sodio 20X para 1 L) a temperatura ambiente durante 30 min con agitación constante.

4. La membrana se secó con papel filtro y se llevó a cabo la autorradiografía.

#### 4.1.6 Autorradiografía.

1. Después del lavado, la membrana se secó con una pieza de papel filtro, se protegió con una bolsa de plástico y se colocó en un cassette de exposición Kodak X-Omat con intensificadores.

2. En el cuarto oscuro se colocó la película de rayos X y el cassette se colocó a  $-70^{\circ}$  el tiempo necesario.

3. La placa se reveló en un revelador automático.

4. Se realizó la densitometría y los resultados se expresan como la relación de las unidades densitométricas del grupo experimental (AP ó SN) sobre las unidades densitométricas del grupo C.

#### 4.2 TECNICA DE "DOT BLOT"

1. El ARN total se extrajo de la manera descrita en la técnica de "Northern blot" (sección 4.1.1) y se corrió la electroforesis (sección 4.1.2) con el objeto de probar que no estuviera degradado.

2. Se hicieron las diluciones necesarias para tener una concentración de  $5 \mu\text{g}$  de ARN en  $2 \mu\text{L}$ . Se prepararon  $10 \mu\text{L}$  de la dilución con amortiguador TE 10/1 pH 7.0 previamente descrito y se le adicionaron  $2 \mu\text{L}$  de formaldehído al 37% (concentración final 3.7%).

3. El ARN se desnaturalizó calentando la muestra en baño María a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y posteriormente se colocaron los puntos de muestra en la membrana (Gene Screen) ( $2 \mu\text{L}$  por punto =  $5 \mu\text{g}$  de ARN total).

4. Se dejaron secar los puntos durante 15 min al calor de una lámpara y se enjuagó la membrana con solución de citrato de

sodio 2X.

5. Se secó con un papel filtro, se envolvió con papel filtro y aluminio y se metió al horno a 80-90°C durante 2 h.

6. Se llevó a cabo la prehibridación, la hibridación, la autorradiografía y el análisis densitométrico como se describió en la técnica de "Northern blot" (sección 4.1.6).

Todo el material y soluciones usados en las técnicas de biología molecular se esterilizaron previamente y en muchos casos se usó material nuevo (sobre todo puntas de pipetas, tubos Eppendorf y pipetas Pasteur), asimismo el agua utilizada fué destilada, desionizada y estéril.

#### 4.3 TECNICA PARA LAVAR EL ADNc DE LA MEMBRANA

Cuando se utilizó una misma membrana para hibridarla con dos ADNc diferentes, después de haberla hibridado con el primero y obtenido los resultados, la membrana se lavó de la siguiente manera para eliminar el ADNc unido a esta:

1) Dos veces durante 15 min con una solución de citrato de sodio 0.2X + dodecil sulfato de sodio 0.1% hirviendo y agitando constantemente.

2) Dos veces durante 15 min con la misma solución, pero a temperatura ambiente.

Por último se realizó una autorradiografía con largo tiempo de exposición para probar que no había quedado material radiactivo en membrana. Cuando se obtuvo alguna mancha en la autorradiografía se repitió el lavado. Cuando la sonda presentó una actividad específica elevada, el primer lavado se hizo durante 40 min cambiando la solución de lavado (calentada

previamente a punto de ebullición) cada 10 min.

##### 5. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar (DE) de, por lo menos, 6 determinaciones. La prueba estadística aplicada fué el análisis de varianza de mediciones repetidas (ANDEVA) multigrupos (254).

Se calculó el coeficiente de correlación entre los cambios en los niveles hepáticos de los ARNm específicos y las principales alteraciones del síndrome nefrótico (proteinuria, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertrofia hepática) así como con los cambios en la ingesta de alimento. Una  $p < 0.05$  se consideró significativa.

#### IV RESULTADOS

##### 1. CARACTERIZACION DEL SINDROME NEFROTICO

Los perfiles de peso corporal, ingesta de alimento y proteínas urinarias obtenidos durante el estudio en los tres grupos de ratas se presentan en la Fig. 5. El peso corporal de las ratas con SN disminuyó un día después de la inyección del ANP (Fig. 5A) lo cual coincide con la disminución en la ingesta de alimento (Fig. 5B). El peso corporal más bajo se alcanzó en el día 2 y entonces empezó a aumentar. Los perfiles de peso corporal e ingesta de alimento de los grupos AP y SN fueron similares y significativamente menores que los del grupo C. El peso corporal de los grupos AP y SN fué significativamente menor que el del grupo C desde el día 1 hasta el día 22 y la ingesta de alimento desde el día 1 hasta el día 11 (Fig. 5). La proteinuria empezó el día 4 en el grupo con SN y alcanzó un valor máximo el día 9 ( $391 \pm 177$  mg/24 h) a partir del cual disminuyó paulatinamente hasta alcanzar valores normales el día 26 (Fig. 5C). El perfil de proteinuria de los grupos C y AP fué similar y menor a 20 mg/24h.

De los datos presentados en la Fig. 5 se pueden distinguir claramente cuatro etapas después de la inyección del ANP: la etapa pre-nefrótica (del día 1 al día 3), la etapa del SN severo (del día 4 al día 10) y la etapa de remisión (del día 11 al día 25), a partir del día 26 se podría considerar ya una etapa post-nefrótica.

Los perfiles de colesterol y triglicéridos se presentan en la Fig. 6. En el grupo con SN el colesterol (Fig. 6A) aumentó más de 5 veces en los días 6 y 11, y los triglicéridos (Fig. 6B)

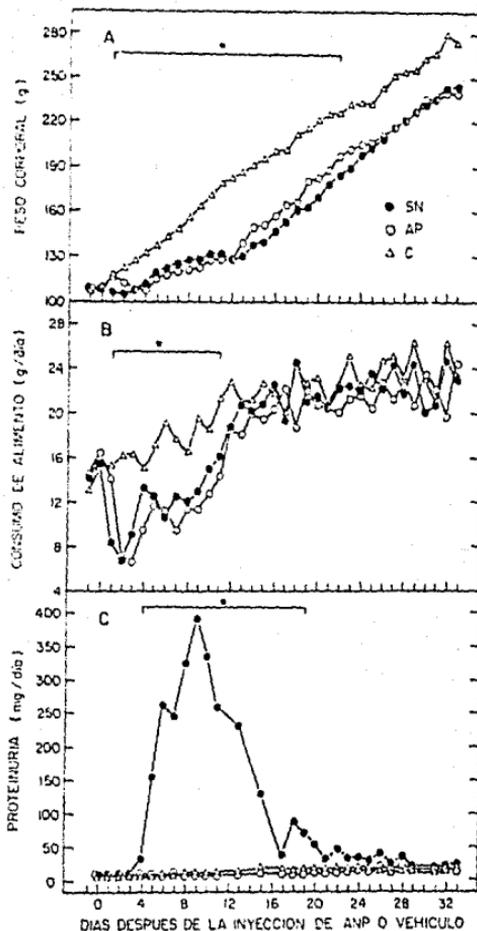


Figura 5. Perfiles de peso corporal (A), consumo de alimento (B) y proteinuria (C) en los tres grupos de ratas estudiados: SN = síndrome nefrótico, AP = alimentado a la par, C = control. El ANP o el vehículo se inyectó el día 0. Cada punto es el promedio de 8 a 30 determinaciones. La proteinuria se determinó por el método de Lowry. \* Días en los que hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por ANDEVA

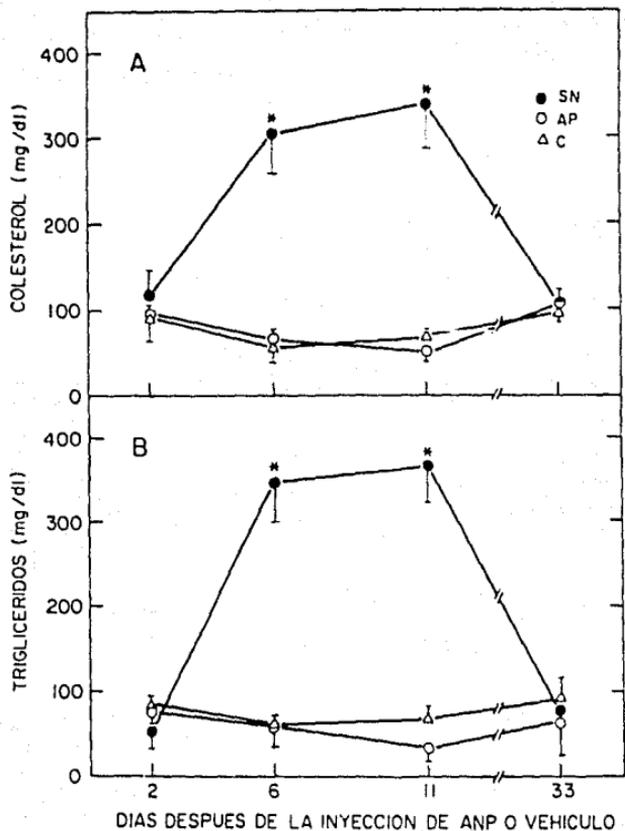


Figura 6. Perfiles de colesterol (A) y triglicéridos (B) séricos de los tres grupos de ratas estudiados: SN = síndrome nefrótico, AP = alimentados a la par, C = Control. Cada punto es el promedio de 8-12 determinaciones  $\pm$  DE. El colesterol se determinó con una prueba enzimática colorimétrica, y los triglicéridos con una prueba enzimática UV. \*  $p < 0.05$  por ANDEVA.

aumentaron alrededor de 6 y 5.4 veces en estos días, respectivamente. El grupo AP presentó los mismos valores de colesterol y triglicéridos que el grupo C.

Los perfiles de proteínas totales y albúmina en suero se muestran en la Fig. 7. Las ratas con SN presentaron hipoproteinemía muy clara en el día 6 (Fig. 7A), cuando las proteínas totales disminuyeron 37% (de 7.6 a 4.7 g/dL); en el día 11 casi se alcanzaron valores normales (6.2 g/dL), es decir, hubo una disminución de solo un 16%, y en el día 33 se presentaron los mismos valores que en los grupos C y AP al igual que en el día 2. Asimismo, la albúmina sérica disminuyó significativamente (41%) en el día 6 y regresó a valores cercanos a los normales en el día 11 (Fig. 7B). En los días 2 y 33 no se presentaron cambios. Los perfiles tanto de proteínas totales como de albúmina en suero en los grupos AP y C fueron similares y se mantuvieron sin cambio durante el estudio.

La excreción de albúmina por orina se presentó en los días 6 ( $153 \pm 35$  mg/24 h) y 11 ( $162 \pm 73$  mg/24 h) en el grupo con SN. La albúmina representó el 69 y 68% de las proteínas totales excretadas en estos días. La albuminuria no se detectó en los días 2 y 33 en el grupo con SN ni en los grupos C y AP en los 4 días estudiados.

El peso del hígado de las ratas C y SN aumentó de manera similar, en cambio el peso del hígado de las ratas AP permaneció sin alterarse hasta el día 11 y nunca alcanzó el peso de las ratas C (Fig. 8A). En los días 6 y 11 hubo un aumento importante en la relación peso hepático/peso corporal en el grupo con SN (Fig. 8B), lo cual indica una hipertrofia del hígado. También

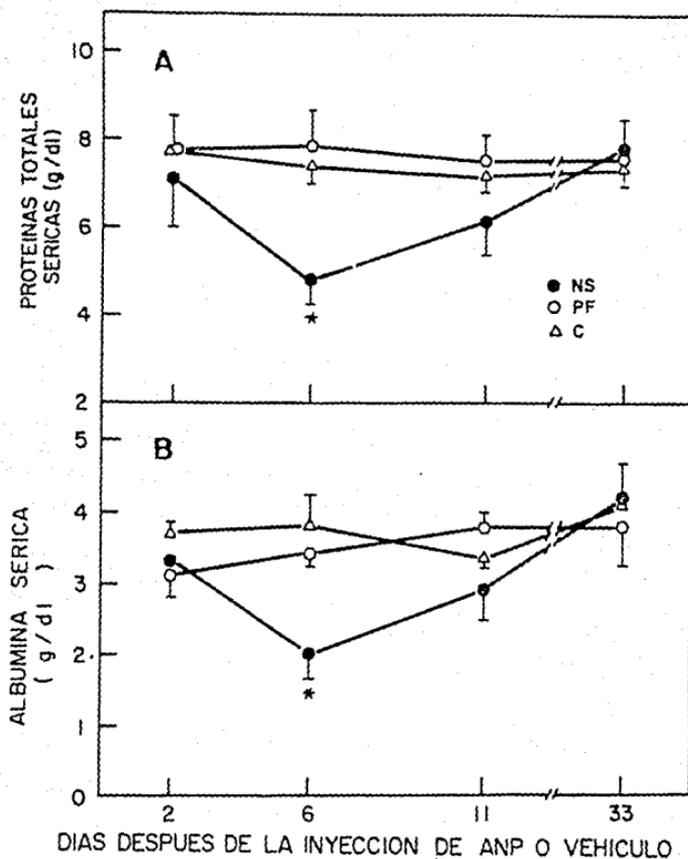


Figura 7. Perfiles de proteínas totales (A) y albúmina (B) en suero en los tres grupos de ratas estudiadas: SN = síndrome nefrótico, AP = alimentado a la par, C = control. Cada punto es el promedio de 8-12 determinaciones  $\pm$  DE. Las proteínas totales se determinaron por el método de Lowry y la albúmina con el dato de proteínas totales y el porcentaje de albúmina que se obtuvo del trazo densitométrico de la electroforesis en acetato de celulosa. \* P < 0.05 por ANDEVA.

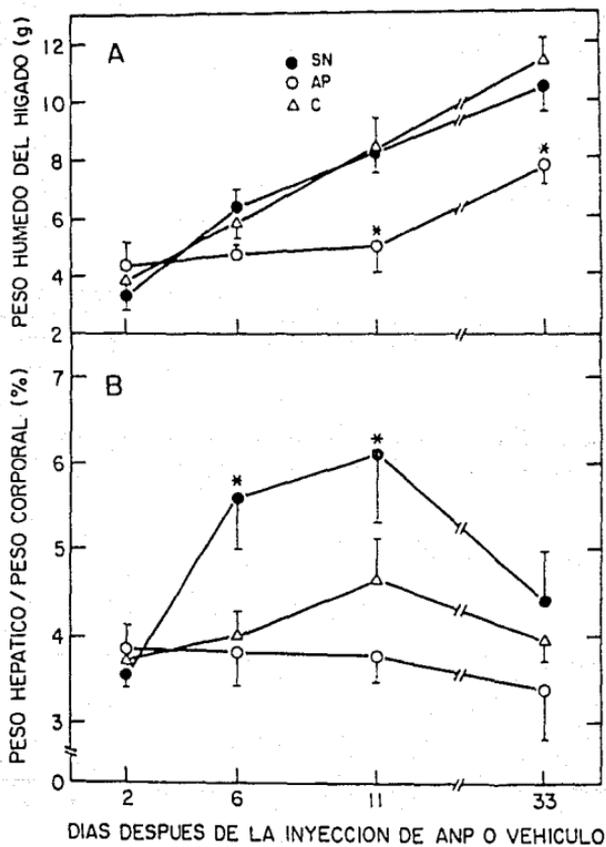


Figura 8. Peso húmedo del hígado (A) y relación peso del hígado/peso corporal en los tres grupos de ratas estudiados: SN = síndrome nefrótico, AP = alimentado a la par, C = control. Cada punto es el promedio de 8-12 determinaciones  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  por ANDEVA.

hubo un aumento en esta relación en el grupo C pero es un aumento observado durante el desarrollo normal de los animales (165). En cambio, en las ratas AP esta relación peso hígado/peso corporal se mantuvo sin cambios durante el estudio y por debajo del grupo C, e incluso disminuyó un poco más en el día 33.

## 2. NIVELES HEPATICOS DE ARNmS ESPECIFICOS

Todas las preparaciones de ARN utilizadas tuvieron una relación de D.O. 260/280 entre 1.8 y 2.1. La concentración de estas preparaciones nunca fué menor de 5 µg/3 µL.

En la Fig. 9 se presentan los perfiles de los niveles hepáticos del ARNm de albúmina. En la parte superior se observa el promedio de los análisis densitométricos de 4 a 6 experimentos, y en la parte inferior se observa un "dot blot" representativo. Hubo un ligero aumento en el grupo AP en el día 11 (1.6 veces). Sin embargo, el aumento en los niveles del ARNm de albúmina en las ratas con SN fué mucho mayor en los días 6 y 11 (2 y 4 veces respectivamente).

En la parte superior de la Fig. 10A se presenta un "Northern blot" de albúmina. Aquí también se puede apreciar un claro aumento en la cantidad del ARNm de esta proteína en el grupo con SN en los días 6 y 11 con respecto a los otros dos grupos (AP y C), siendo mayor este aumento en el día 11. Para probar que este era un comportamiento específico del ARNm de albúmina, la misma membrana se lavó y se hibridó con el ADnc del ARNr 18S. Las variaciones en la cantidad de ARNr en los días estudiados son muy diferentes a las variaciones encontradas para el ARNm de

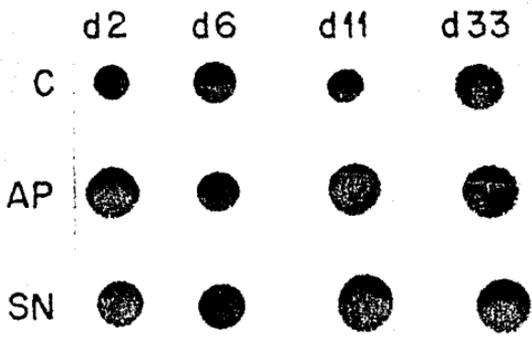
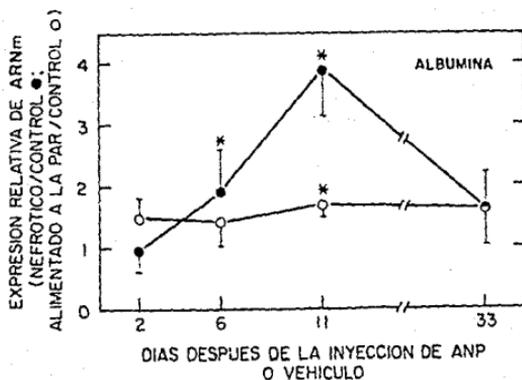
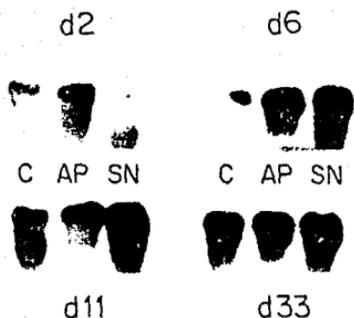


Figura 9. Superior: Cambios en los niveles hepáticos del ARNm de albúmina en los grupos con SN y AP con respecto al grupo control. Los valores relativos se obtuvieron dividiendo el valor densitométrico del grupo experimental entre el valor densitométrico de su respectivo grupo control. Cada punto es el promedio de 4-6 determinaciones  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  por ANDEVA. Inferior: "Dot blot" representativo para el ARNm de albúmina en hígado. C = control, AP = alimentado a la par, SN = síndrome nefrótico. d2, d6, d11 y d33 = días de estudio. En cada punto se colocaron 5  $\mu$ g de ARN total. La actividad específica del ADNc marcado con CTP- $^{32}$ P fué de  $6 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g de ADNc.

## ALBUMINA



## ARNr

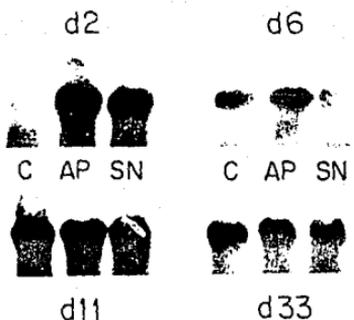


Figura 10. Superior: "Northern blot" para el ARNm de albúmina. C = control, AP = alimentado a la par, SN = síndrome nefrótico. d2, d6, d11 y d33 = días de estudio. En cada carril se colocaron 10  $\mu\text{g}$  de ARN total. La actividad específica del ADNc de albúmina marcado con CTP- $^{32}\text{P}$  fué de  $6 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  de ADN. Inferior: La misma membrana de la parte superior se lavó para eliminar el ADNc de albúmina y se hibridó con el ADNc de ARNr 18S marcado de la misma manera que el ADNc de albúmina y con la misma actividad específica.

albúmina. Además la cantidad de ARNr es muy similar entre los tres grupos estudiados en cada día, lo cual sucede solo en el día 33 para el ARNm de albúmina. En la figura 11 se muestra la fotografía del gel teñido con bromuro de etidio, en la cual se puede ver que la fluorescencia de las bandas de las diferentes líneas es similar, por lo que se puede afirmar que la cantidad de ARN total colocada en cada línea del gel, o en cada punto del "dot blot", fué constante (10 ó 5  $\mu$ g respectivamente). Además, se hicieron diluciones crecientes de las muestras de ARN del día 11 para analizarlas por "dot blot". En la Fig. 12 se puede observar que la intensidad de las manchas de la autorradiografía es proporcional a la cantidad de ARN total que se colocó, y, una vez más, es claro el aumento del ARNm de albúmina en el grupo con SN en este día. Todos estos experimentos demuestran que los cambios observados en los niveles hepáticos del ARNm de albúmina, y de los demás ARNms estudiados, son específicos y no se deben a artificios de las técnicas o a variaciones en la cantidad de ARN colocada en cada carril de los geles o en cada punto de los "dot blots".

Los niveles de ARNm de transferrina aumentaron en las ratas AP en el día 2 y después regresaron a valores normales (Figs. 13 y 14). En el grupo con SN se encontró un incremento significativo solo en el día 6 (alrededor de 2.5 veces) y en los días 2, 11 y 33 no hubo cambios en los niveles del ARNm de transferrina.

Interesantemente, los perfiles del ARNm de fibrinógeno en los grupos AP y con SN fueron similares (Figs. 13 y 14). Hubo un aumento en el día 6, pero éste fue de alrededor de 1.7 veces en el grupo AP y de alrededor de 2.7 veces en el grupo con SN. En

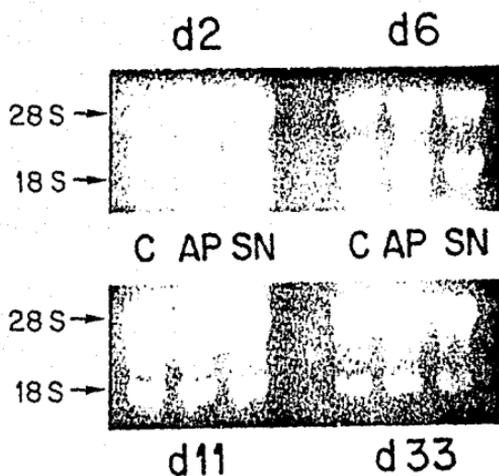


Figura 11. Fotografía de la electroforesis del ARN total en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visto con luz UV. En cada carril del gel se colocaron 10  $\mu$ g de ARN total.

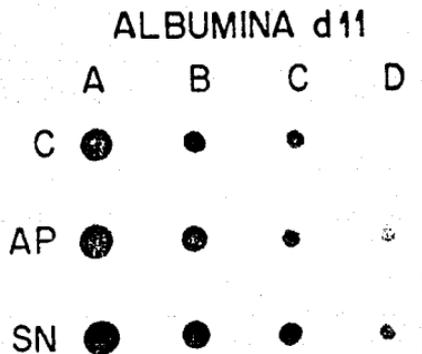


Figura 12. Autorradiografía de la técnica de "dot blot" para el ARNm de albúmina obtenido en el día 11 del estudio en los grupos analizados: C = control, AP = alimentado a la par, SN = síndrome nefrótico. Se hicieron las diluciones necesarias para colocar las siguientes cantidades de ARN total: A = 5  $\mu$ g, B = 2.5  $\mu$ g, C = 1.25  $\mu$ g, D = 0.625  $\mu$ g. La actividad específica del ADnc fué de  $6 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g de ADnc.

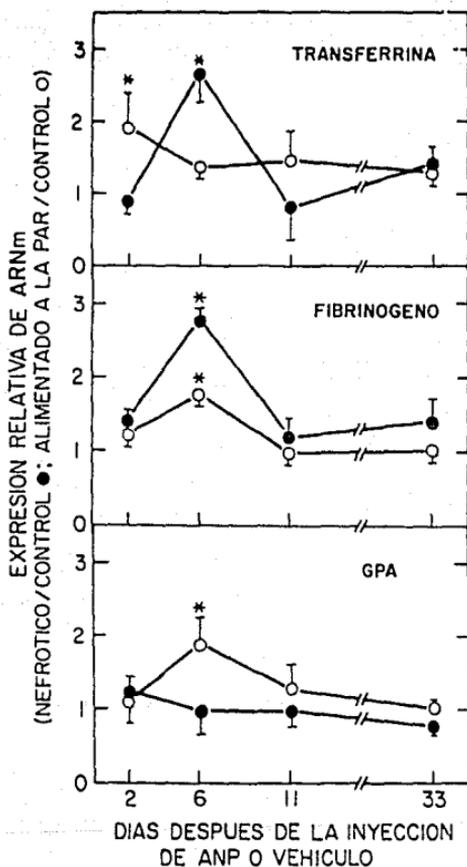


Figura 13. Cambios en los niveles hepáticos del ARNm de transferrina, fibrinógeno y GPA de los grupos alimentado a la par y con síndrome nefrótico con respecto al grupo control. Los valores relativos se obtuvieron dividiendo el valor densitométrico del grupo experimental entre el valor densitométrico de su respectivo grupo control. Cada punto es el promedio de 3 ó 4 determinaciones  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  por ANDEVA.

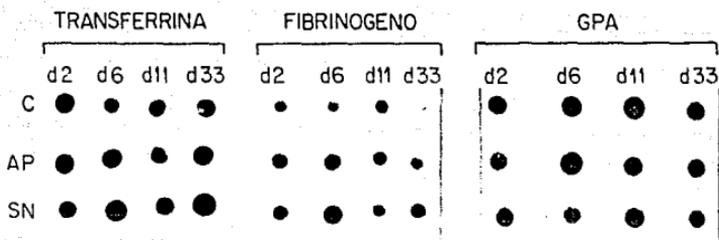


Figura 14. "Dot blots" representativos para los ARNms de transferrina, fibrinógeno y GPA. C = control, AP = alimentado a la par, SN = síndrome nefrótico. d2, d6, d11 y d33 = días de estudio. En cada punto se colocaron 5 µg de ARN total.

los días 2, 11 y 33 los niveles de ARNm de fibrinógeno no fueron distintos a los del grupo C.

En el caso de los niveles de ARNm de GPA (Figs. 13 y 14) a diferencia de los otros ARNms estudiados, no se observaron cambios en el grupo con SN, en cambio hubo un aumento en el día 6 en el grupo AP.

Los resultados obtenidos para los ARNms de las apo se pueden observar en las Figs. 15 y 16. En el grupo con SN se encontró una elevación importante en los niveles del ARNm de apo AI en el día 6 (4.2 veces) y en el día 11 aún se encontraron elevados los niveles de este ARNm. En los días 2 y 33 no hubo cambios significativos al igual que en todos los días estudiados en el grupo AP.

Con respecto a los niveles del ARNm de apo E en el grupo con SN se observó un incremento en el día 2 de 2.3 veces, en cambio, en el grupo AP se encontró una elevación en los días 6 y 11 (1.7 y 1.6 veces respectivamente).

Los niveles del ARNm de apo AI y apo E del grupo con SN presentaron un coeficiente de correlación negativo estadísticamente significativo ( $r = -0.5759$ ).

### 3. CORRELACION ENTRE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES HEPATICOS DE ARNms ESPECIFICOS Y LAS PRINCIPALES ALTERACIONES DEL SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.

Los coeficientes de correlación obtenidos entre los cambios en los niveles hepáticos de los ARNms específicos estudiados y las principales alteraciones del SN se encuentran en la tabla 2. Como podemos observar, los mensajeros que presentaron correlación

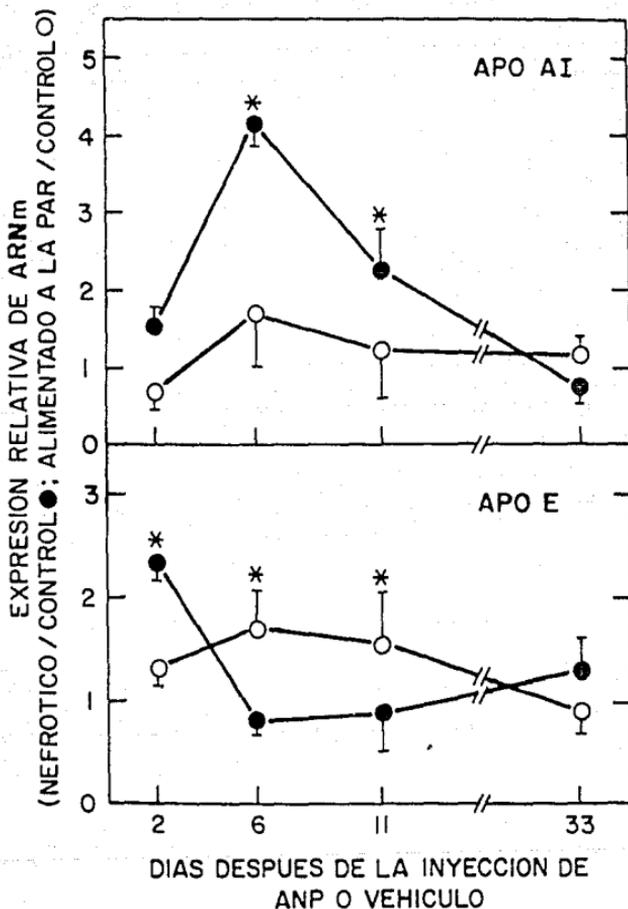


Figura 15. Cambios en los niveles hepáticos del ARNm de apo AI y apo E de los grupos alimentado a la par y con síndrome nefrótico con respecto al grupo control. Los valores relativos se obtuvieron dividiendo el valor densitométrico del grupo experimental entre el valor densitométrico de su respectivo grupo control. Cada punto es el promedio de 3 ó 4 determinaciones  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  por ANDEVA.



estadísticamente significativa fueron el de albúmina, el de apo AI y el de apo E: el ARNm de albúmina correlacionó positivamente con la proteinuria y con la hipertrofia hepática; el ARNm de apo AI correlacionó positivamente con la proteinuria, la colesterolemia y la trigliceridemia, y negativamente con la proteinemia y la albuminemia; por último, los niveles hepáticos del ARNm de apo E correlacionaron negativamente con la proteinuria, la colesterolemia, la trigliceridemia y con la hipertrofia hepática. No hubo correlación entre los cambios en ninguno de los ARNms estudiados y la ingesta de alimento en el grupo con SN.

TABLA 2. COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LOS NIVELES HEPATICOS DE ARNm Y LAS PRINCIPALES ALTERACIONES DEL SINDROME NEFROTICO.

	ARNm					
	ALBU (16)	FIBRI (12)	GPA (8)	TRANS (8)	APO AI (12)	APO E (12)
PROTEINAS EN ORINA	0.67*	0.24	-0.09	0.09	0.58*	-0.71*
PROTEINAS EN SUERO	0.12	-0.52	-0.03	0.19	-0.89*	0.49
ALBUMINA EN SUERO	0.30	-0.25	-0.01	0.04	-0.74*	0.44
COLESTEROL EN SUERO	0.40	0.38	-0.10	-0.34	0.70*	-0.69*
TG EN SUERO	0.45	0.36	0.04	0.46	0.74*	-0.74*
INGESTA DE ALIMENTO	0.04	-0.22	-0.34	0.01	-0.38	-0.42
PESO HIG/ PESO CORP	0.52*	0.13	0.05	0.38	0.38	-0.77*

( ) = n \* P < 0.05, ALBU = Albúmina, FIBRI = Fibrinógeno, GPA = Glucoproteína ácida alfa 1, TRANS = Transferrina, APO AI = apolipoproteína AI, APO E = apolipoproteína E, TG = triglicéridos, PESO HIG/PESO CORP = Peso del hígado/peso corporal.

## V D I S C U S I O N

Los datos presentados en este trabajo demuestran claramente que las ratas inyectadas con aminonucleósido de puromicina desarrollaron un síndrome nefrótico típico caracterizado por proteinuria, hipoproteïnemia, albuminuria, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Estas alteraciones remiten espontáneamente, lo cual está de acuerdo con trabajos previos (9,14) y con la forma humana de la enfermedad (2,4). Una de las características del SN, más relevantes para este trabajo, es la alteración en la concentración (aumento o disminución) de casi todas las proteínas plasmáticas como consecuencia de cambios en la síntesis, degradación y/o pérdida por orina. Por lo tanto, el SN constituye un excelente modelo para estudiar y comprender mejor el complejo fenómeno de regulación de la síntesis de proteínas plasmáticas en todos sus pasos, desde la expresión del gen hasta la secreción de la proteína.

A partir de la inyección del ANP se pueden ver claramente diferentes etapas: pre-nefrótica (antes de la proteinuria), nefrótica (durante la proteinuria y la hipoproteïnemia), de remisión (durante la proteinuria y con concentraciones normales de proteínas totales séricas) y post-nefrótica (después de la proteinuria). Estas etapas durante el desarrollo y remisión del SN, las cuales se acompañan necesariamente de cambios en la síntesis de proteínas, lo hacen más atractivo para estudiar el mecanismo por medio del cual se altera este proceso. El estudio secuencial que se hizo en este trabajo permitió analizar los

niveles de los ARNm's hepáticos en las diferentes etapas del SN y compararlos con las alteraciones sistémicas que caracterizan al SN con el propósito de tratar de encontrar las probables señales que inducen estos cambios. Además, el estudio de un grupo alimentado a la par de las ratas con SN, permitió valorar el impacto de la disminución de la ingesta de alimento sobre las variables estudiadas. Este grupo de ratas se caracterizó por tener un perfil de peso corporal menor al del grupo C y similar al del grupo con SN, sin embargo, a partir del día 3 y hasta el día 11 (Fig. 5A) las ratas con SN tuvieron un peso corporal mayor que las ratas AP. Este aumento no parece deberse a diferencias en la ingesta de alimento (Fig. 5B), sino a que las ratas con SN retienen sodio y agua desde el día 2 lo cual conduce a la formación de edema y acumulación de líquido de ascitis (9) y por lo tanto a un aumento artificial del peso corporal. La remisión del edema y ascitis coincide con la disminución del peso de las ratas con SN con respecto a las ratas AP (día 11). A partir de este día el peso corporal del grupo AP es mayor que el del grupo con SN hasta el día 26, cuando las ratas con SN presentan una proteinuria normal.

Es importante subrayar que en el presente estudio se usó un control para cada día debido a que las ratas utilizadas están aún en etapa de desarrollo y se ha demostrado que durante el mismo se presentan muchos cambios fisiológicos y metabólicos como por ejemplo, cambios en los niveles hepáticos de diferentes ARNm's y en la transcripción de sus genes (165).

Los cambios en los niveles de los ARNm's en las ratas con SN

fueron de diferente magnitud y ocurrieron a diferentes tiempos durante el periodo de estudio. En el día 2 (etapa pre-nefrótica), en el grupo con SN solo aumentó el ARNm de apo E, lo que está de acuerdo con los datos de Marshall y cols. (255). En el día 6 (etapa nefrótica) aumentaron los ARNms de albúmina (2 veces), transferrina (2.8 veces), fibrinógeno (2.8 veces) y apo AI (4.2 veces). En el día 11 (etapa de remisión) aumentó el ARNm de albúmina (3.9 veces) y el de apo AI (2.2 veces); y en el día 33 no hay cambios en los ARNms con respecto al control.

Los niveles de ARNm de transferrina y fibrinógeno, a diferencia de los de albúmina y apo AI, no aumentaron en el día 11. Estos datos, junto con el hecho de que el ARNm de GPA no cambió y de que el ARNm de apo E aumentó solo en el día 2, indican que los niveles de ARNm de cada proteína estudiada se regula independientemente y no como parte de una respuesta generalizada de síntesis de proteínas.

Los perfiles de los ARNms de las proteínas estudiadas en el grupo AP fueron diferentes del grupo con SN. Los perfiles del ARNm de transferrina, apo E, apo AI y GPA en ambos grupos (SN y AP) están totalmente disociados. Mientras que los niveles del ARNm de GPA no cambian en las ratas con SN, aumentan en el grupo AP en el día 6. Por el contrario, los niveles de ARNm de apo AI aumentan en el grupo con SN los días 6 y 11 y no cambian en el grupo AP. Los niveles del ARNm de apoE aumentan en el grupo con SN en el día 2, y en el grupo AP los días 6 y 11. Por último, los niveles del ARNm de transferrina aumentan en el grupo con SN en el día 6 y en el grupo AP en el día 2. En el caso de albúmina y de fibrinógeno, los cambios en los perfiles de los ARNms en ambos

grupos fueron paralelos, sin embargo, el aumento en las ratas con SN fué significativamente mayor que en las ratas AP. Todos estos datos indican que las alteraciones en los niveles de los ARNm en las ratas con SN no son consecuencia de los cambios en la ingesta de alimento. De hecho, los niveles hepáticos de los ARNm en el grupo con SN no correlacionaron con los cambios en la ingesta de alimento (Tabla 2).

A pesar de que la excreción urinaria de albúmina se incrementa los días 6 y 11, su concentración plasmática disminuye solo el día 6 mientras que los niveles de su ARNm aumentan tanto el día 6 como el día 11. Por otra parte, los niveles plasmáticos de GPA disminuyen (51) y su excreción urinaria se eleva (50, 52-54), sin embargo, los niveles hepáticos de este ARNm no se modificaron. En cambio, los niveles circulantes de fibrinógeno aumentan (60), su excreción por orina no cambia (61) y su ARNm hepático se incrementa. En el caso de la apo E, sus niveles circulantes se elevan ligeramente (71) y los niveles hepáticos de su ARNm no cambian, mientras que en el de la apo AI, aumentan su concentración circulante (64), su excreción urinaria (64) y los niveles de su ARNm. Por último, la concentración de transferrina disminuye (46,47), y su excreción urinaria (47,48) y los niveles de su ARNm se incrementan. Por lo tanto, parece que no existe una regla común para todas las proteínas plasmáticas que relacione los niveles hepáticos de los ARNm y las concentraciones circulantes de sus proteínas correspondientes, por lo que es improbable esta sea una señal regulatoria de la síntesis de proteínas en el SN.

La concentración normal de albúmina en presencia de albuminuria importante que se observa en el día 11, sugiere que la síntesis hepática de albúmina está aumentada para compensar completamente las pérdidas de albúmina por orina. Esto es, la síntesis de albúmina aumenta en presencia de concentraciones normales de albúmina circulante. Con base en muchos experimentos, se ha propuesto que la presión coloidosmótica regula la síntesis de albúmina (32, 37-39, 149, 157, 158), sin embargo, la presión coloidosmótica en el día 11 de nuestro modelo experimental debe estar cerca de lo normal como consecuencia de que la concentración de proteínas totales y de albúmina ya no está baja. Por lo tanto, parece que, al menos en este día, la síntesis de albúmina no está regulada por la presión coloidosmótica. Además, los niveles hepáticos del ARNm de albúmina en el presente trabajo no correlacionaron ni con las proteínas totales ni con la albúmina en suero, pero sí con la proteinuria (Tabla 2). Sin embargo, no podemos descartar que en el día 6 la disminución de la presión coloidosmótica estimule la síntesis de albúmina. Por lo tanto, es posible que diferentes señales regulatorias participen en la modulación de la expresión del gen de albúmina durante las diferentes etapas de la enfermedad, o bien que este aumento adicional del ARNm de albúmina en el día 11 se deba a que se ha ido acumulando como consecuencia de un aumento en su estabilidad. Estos datos sugieren que la pérdida de la proteína por orina, más que la hipoproteinemia o la presión oncótica, regulan la síntesis de albúmina en esta etapa de la enfermedad.

También se ha postulado que la disminución de la presión coloidosmótica estimula la síntesis de lipoproteínas y en

consecuencia esta contribuye a la hiperlipoproteinemia (1,3). De hecho, se ha observado en células de hepatoma en cultivo (157) que los cambios en la presión oncótica del medio regulan los niveles del ARNm de apo B. En el presente trabajo se observó una estrecha correlación negativa entre los niveles hepáticos del ARNm de apo AI y la concentración de proteínas totales y de albúmina, observación también hecha en otro trabajo (64), lo cual apoya la hipótesis de que la presión coloidosmótica regula la síntesis de lipoproteínas. Además, los niveles del ARNm de apo AI correlacionaron positivamente con la proteinuria, lo que está de acuerdo con la observación de Kaysen y cols. (51), quienes encontraron que la hiperlipidemia correlaciona con la proteinuria.

El incremento en la concentración hepática del ARNm de albúmina, transferrina, fibrinógeno y apo AI sugieren que el aumento en la síntesis de estas proteínas (33-35, 47, 61, 71) es, al menos en parte, a nivel del ARNm. Los cambios en los niveles de los ARNms pueden deberse a un incremento en su síntesis, a una disminución en su degradación o a una combinación de ambos. Dos estudios previos (13, 37) sugieren que la elevación en los niveles hepáticos del ARNm de albúmina son consecuencia del aumento en la transcripción principalmente. Además, se ha postulado que la principal forma de regulación de la síntesis de albúmina en otras condiciones patológicas y fisiológicas es a nivel transcripcional (148, 163-166). Asimismo, la elevación en la concentración hepática del ARNm de apo AI se debe, al menos en parte, a un aumento la transcripción del gen (255). Estos

autores (255) encontraron que la transcripción del gen se incrementa 1.8 veces, y que el ARNm de apo AI aumenta 6.1 veces, por lo que también se propone que hay un aumento en la estabilidad de este ARNm. Asimismo encontraron que el aumento en la síntesis de la proteína in vitro fué aún mayor que el de los niveles del ARNm, por lo que se piensa que además hay un control traduccional.

Respecto a los demás ARNms estudiados en este trabajo, no existen datos en la literatura acerca del mecanismo por medio del cual aumentan sus niveles hepáticos, lo cual sería muy interesante investigar.

El aumento de apo AI en la etapa nefrótica, pero no en la pre-nefrótica, coincide con los hallazgos de Marshall y cols. (255) publicados después de que el presente trabajo se había terminado. De hecho, el trabajo de Marshall y cols. (255) es el único trabajo publicado en donde se analizan los niveles hepáticos de ARNms específicos tanto en la etapa pre-nefrótica como en la etapa nefrótica, sin embargo, estos autores no los analizaron en las etapas de remisión y post-nefrótica como se hizo en esta tesis. Tarugi y cols. (73) también encontraron que los niveles de ARNm de apo AI aumentan en la etapa nefrótica y los de apo E no cambian.

Comparando la magnitud de los cambios en los niveles hepáticos de los ARNm observados en la presente tesis con los datos de la literatura se encuentran algunas discrepancias. Por ejemplo, Marshall y cols. (255) encontraron un aumento de 3.8 veces en los niveles hepáticos de ARNm de albúmina en la etapa nefrótica, mientras que en esta tesis, al igual que otros autores

(10,13,27,36), se encontró un aumento de aproximadamente 2 veces en esta misma etapa, sin embargo, si se observó un aumento de 4 veces en este ARNm pero en la etapa de remisión. En el caso de los resultados obtenidos para el ARNm de apo E, estos coinciden con los datos de Marshall y cols. (255) en la etapa pre-nefrótica donde encuentran un aumento de 2.2 veces, sin embargo hay una discrepancia con estos autores en la etapa nefrótica ya que ellos encuentran un incremento de 2.3 veces y en el presente trabajo no se observaron cambios. Estas discrepancias pueden deberse al esquema de inducción del síndrome nefrótico, a la cepa y edad de los animales utilizados y a la severidad de la enfermedad en el momento en que se hace el estudio. Todo esto justifica aún más el hecho de haber realizado este estudio en forma secuencial para poder relacionar los niveles de los ARNms con la severidad de las alteraciones características de la enfermedad.

La correlación negativa que se obtuvo en el presente trabajo entre los niveles de ARNm de apo AI y apo E en las ratas con SN también se ha observado en otras condiciones patológicas y fisiológicas (165, 241). Además, los niveles del ARNm de apo E correlacionaron negativamente con la proteinuria, siendo que la apo AI correlacionó positivamente. De igual manera los niveles del ARNm de apo E correlacionaron negativamente con colesterol y triglicéridos y los de apo AI positivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en este modelo experimental no existe una respuesta franca de fase aguda, ya que solo aumentó el ARNm de fibrinógeno, pero no el de GPA. Asimismo las concentraciones en plasma de fibrinógeno

aumentan (60) mientras que las de GPA disminuyen (51).

La hipertrofia hepática que se presentó en las ratas con SN corrobora datos previos de la literatura (6,10,12,35,76,255). Este fenómeno probablemente es secundario al esfuerzo del hígado para aumentar la síntesis de proteínas. De hecho, la hipertrofia hepática correlacionó positivamente con los niveles de ARNm de albúmina. Asimismo se ha encontrado que hay un aumento en el contenido hepático de ARN y ADN (10,35,76,256).

De los datos presentados en la introducción, está claro que hay una multitud de señales que regulan la expresión de los genes de las proteínas estudiadas en este trabajo. Actualmente no está claro cuáles de estas señales pueden estar involucradas en los cambios observados en los APNm en el SN. Por ejemplo, se sabe que la insulina induce un aumento en los niveles de ARNm de albúmina, sin embargo, se ha demostrado que los niveles de insulina están disminuidos en el SN (257) por lo que es improbable que esta hormona esté involucrada. Las hormonas tiroideas estimulan la transcripción del gen de apo AI y aumenta los niveles del ARNm de albúmina, sin embargo, los datos acerca de los niveles de triyodotironina en las ratas con SN son contradictorios (251,252).

Los niveles de los otros probables reguladores de la expresión de estos genes tales como glucocorticoides, glucagon, factor de necrosis tumoral, factor estimulador de hepatocitos, elementos trans de cada gen, vitamina A y serotonina no se conocen en el SN. Por lo que su participación en la regulación de la expresión de estos genes en el SN queda por ser dilucidado. Por otra parte, también sería muy interesante determinar los

niveles de los elementos trans de los diferentes genes de las proteínas plasmáticas en el SN tales como el factor nuclear de hepatocito-1 y el Tf-LF1.

Este modelo experimental puede ser de gran utilidad para estudiar la regulación de la expresión específica de tejido de los genes de las proteínas plasmáticas. En el presente trabajo solo se estudiaron los niveles de los ARNm en hígado, sin embargo, existen evidencias en la literatura de que algunos de estos genes se expresan también en otros tejidos (95-97, 169, 215), por lo que sería muy interesante investigar la regulación de su expresión en tejidos extra-hepáticos en el síndrome nefrótico.

## V I   C O N C L U S I O N E S

1. Las alteraciones en los niveles hepáticos de los ARNm específicos en el SN son de magnitud variable y se presentan en diferentes etapas después de la inyección del ANP, lo que sugiere que no existe una respuesta simultánea de todas las proteínas y que la síntesis de cada una se regula independientemente.

2. Las alteraciones en los niveles hepáticos de los ARNm en las ratas con SN no son consecuencia de los cambios en la ingesta de alimento.

3. Los niveles hepáticos de los ARNm de las apolipoproteínas AI y E parecen estar reguladas inversamente en el SN.

4. Los niveles del ARNm de albúmina no parecen estar regulados por los niveles circulantes de esta proteína, pero sí por la proteinuria en el día 11. Sin embargo, en el día 6 la albúmina circulante sí podría tener un papel regulatorio.

5. Los estímulos regulatorios de los niveles hepáticos de los ARNm de apo AI y apo E podrían ser la proteinuria, la colesterolemia y/o la trigliceridemia, y en el caso de la apo AI también podrían ser los niveles circulantes de albúmina y de proteínas totales.

## VII REFERENCIAS

1. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. En: Brenner BM, Stein JH, eds. Contemporary issues in nephrology, Vol. Nephrotic syndrome. New York:Churchill Livingstone, 1982:85-120.
2. Skorecki KL, Nadler SP, Badr KF, Brenner BM. Renal and systemic manifestations of glomerular disease. En: Brenner BM, Rector FC, eds. The kidney, Philadelphia:Saunders, 1986:891-928.
3. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988;33:1184-1202.
4. Schnaper HW, Robson AM. Nephrotic syndrome: minimal change disease, focal glomerulosclerosis, and related disorders. En:Schrier RW, Gottschalk CW, eds. Diseases of the kidney. 4a edición, Vol. II. Boston/Toronto:Little Brown, 1988:1949-2004.
5. Heymann W, Lund HZ. Nephrotic syndrome in rats. *Pediatrics* 1951;7:691-698.
6. Frenk S, Antonowics I, Craig JH, Metcoff J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.
7. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982;46:16-21.
8. Vernier RL, Papermaster BW, Bood RA. Aminonucleoside nephrosis: I Electron microscopic studies of the renal lesions in rats. *J Exp Med* 1959;109:115-126.
9. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:29-38.
10. Lewandowski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kenk JD, Jefferson LS. Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 1988;254:C634-C642.
11. Gherardi E, Vecchia L, Calandra S. Experimental nephrotic syndrome in the rat induced by puromycin aminonucleoside. Plasma and urinary lipoproteins. *Exp Molec Pathol* 1980;32:128-142.
12. Katz J, Bonorris G, Sellers AL. Albumin metabolism in aminonucleoside nephrotic rats. *J Lab Clin Med* 1963;62:910-934.
13. Yamauchi A, Imai E, Noguchi T, Tanaka T, Yamamoto S, Mikami

H, Fukuhara Y, Fujii M, Orita Y, Kamada T. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats. *Am J Physiol* 1989;254:E676-E679.

14. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on sodium retention and proteinuria. *Rev Invest Clín* 1990;42:210-216.

15. Kanwar YS. Biology of disease. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest* 1984;51:7-21.

16. Schneeberger EE. Glomerular permeability to protein molecules. Its possible structural basis. *Nephron* 1974;13:7-

17. Rennke HG, Venkuchatalam MA. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. *J Clin Invest* 1979;63:713-717.

18. Mohos SC, Skoza L. Histochemical demonstration and localization of sialoproteins in the glomerulus. *Exp Mol Pathol* 1970;12:316-

19. Kanwar YS, Farquhar MG. Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the lamina rara by cationic probes. *J Cell Biol* 1979;81:137-153.

20. Skoza L, Mohos SC. Glomerular sialoproteins. *Science* 1969;164:1519-1521.

21. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM. Mechanism of puromycin induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1977;60:152-161.

22. Hunsicker LG, Shearer TP, Shaffer SJ. Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexadimethrine. *Kidney Int* 1981;20:7-17.

23. Charest PM, Roth J. Localization of sialic acid in kidney glomeruli; regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8508-8512.

24. Kerjaschki D, Vernillo AT, Farquhar MG. Reduced sialylation of podocalyxin - the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus - in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1985;118:343-349.

25. Lelongt B, Makino H, Kanwar YS. Status of glomerular proteoglycans in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1987;31:1299-1310.

26. Vernier RL, Klein VJ, Sisson SP, Mahan DJ, Oegama TR, Brown DM. Heparan sulfate-rich anionic sites in the human glomerular

basement membrane. Decreased concentration in congenital nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1983;309:1001-1009.

27. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis. *N Engl J Med* 1972;286:748-757.

28. Gitlin D, Janeway CA, Farr LE. Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. I. Albumin, gamma-globulin and iron-binding globulin. *J Clin Invest* 1956;35:44-56.

29. Kaysen GA, Gambertoglio J, Jimenez I, Jones H, Hutchison FN. Effects of dietary protein intake on albumin homeostasis in nephrotic patients. *Kidney Int* 1986;29:572-577.

30. Glasscock RJ, Cohen AH, Bennet CM, Martinez-Maldonado M. Primary glomerular disease. En: Brenner BM, Rector FC Jr, eds. *The Kidney*, 2a. edición. Philadelphia:WB Saunders, 1981:1351-1492.

31. Hutchison F, Gambertoglio J, Jimenez I, Jones H, Kaysen G. Effect of reduced dietary protein intake on albumin homeostasis and albuminuria in man. *Kidney Int* 1985;27:141-

32. Kaysen GA, Kirkpatrick W, Couser WG. Nutritional status affects albumin homeostasis in rats with Heymann nephritis. *Clin Res* 1984;32:415A.

33. Katz J, Sellers AL, Bonorris G. Effect of nephrectomy on plasma albumin catabolism in experimental nephrosis. *J Lab Clin Med* 1964;63:680-686.

34. Katz J, Bonorris G, Okuyama S, Sellers AL. Albumin synthesis in perfused liver of normal and nephrotic rats. *Am J Physiol* 1967;212:1255-1260.

35. Marsh JB, Drabkin DL, Braun GA, Parks JS. Factors in the stimulation of protein synthesis by subcellular preparations from rat liver. *J Biol Chem* 1966;241:4168-4174.

36. Zhringer J, Baliga BS, Munro HN. Increased levels of microsomal albumin-mRNA in the liver of nephrotic rats. *FEBS Lett* 1976;62:322-325.

37. Pedraza-Chaverri J. Influencia de la presión coloidosmótica sobre la biosíntesis de albúmina de rata. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. 1982.

38. Rothschild MA, Oratz M, Wimer E, Schreiber SS. Studies on albumin synthesis: the effects of dextran and cortisone on albumin metabolism in rabbits studied with albumin- $I^{131}$ . *J Clin Invest* 1961;40:545-554.

39. Huberman A. The in vitro effect of colloid osmotic pressure on albumin synthesis in normal rat liver. *Rev Invest Clin* 1973;25:321-326.

40. Exaire E, Pollak VE, Pesce AJ, Ooi BS. Albumin and gamma-globulin in the nephron of the normal rat and following the injection of aminonucleoside. *Nephron* 1972;9:42-54.
41. Olbricht CJ, Cannon JK, Tisher CC. Cathepsin B and L in nephron segments of rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1967;32:354-359.
42. Longworth LG, MacInnes DA. An electrophoretic study of nephrotic sera and urine. *J Exp Med* 1940;71:77-82.
43. Jensen H. Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 1967;182:465-473.
44. Ellis D. Anemia in the course of nephrotic syndrome secondary to transferrin depletion. *J Pediatr* 1977;90:953-955.
45. Wharshaw BL, Check IJ, Hymes LC, DiRusso SC. Decreased serum transferrin concentration in children with the nephrotic syndrome: effect on lymphocyte proliferation and correlation with serum immunoglobulin levels. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;33:210-219.
46. Jensen H, Bro-Jorgensen S, Jarnum H, Olsen H, Yssing M. Transferrin metabolism in the nephrotic syndrome and in protein-losing gastroenteropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:293-304.
47. Cartwright GE, Gubler CJ, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XI. Copper and iron metabolism in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1954;33:685-698.
48. Rifkind D, Kravetz HM, Knight V, Schade AL. Urinary excretion of iron-binding protein in the nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1961;265:115-118.
49. Brown EA, Sampson B, Muller BR, Curtis JR. Urinary iron loss in the nephrotic syndrome-an unusual case of iron deficiency with a note on urinary copper losses. *Postgrad Med J* 1984;160:125-128.
50. Glasscock RJ, Adler SG, Word HJ, Cohen AH. Primary glomerular disease. Ed: Brenner BM, Rector Fc, eds. *The kidney*, Philadelphia:Saunders, 1986:929-1013.
51. Davies RW, Staprans I, Hutchinson FN, Kaysen GA. Proteinuria, not altered albumin metabolism, affects hyperlipidemia in the nephrotic rat. *J Clin Invest* 1990;86:500-505.
52. Staprans I, Felts JM. The effect of alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein (orosmuoid) on triglyceride metabolism in the nephrotic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;79:1272-1278.

53. Staprans I, Anderson CD, Lurz FW, Felts JM. Separation of a lipoprotein lipase cofactor from the alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein fraction from the urine of nephrotic patients. *Biochim Biophys Acta* 1980;617:514-523.
54. Staprans I, Garon SJ, Hopper Jr J, Felts JM. Characterization of glycosaminoglycans in urine from patients with nephrotic syndrome and control subjects and their effects of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1981;678:414-422.
55. Momma K. Immunochemical semiquantitative estimation of gamma-M and gamma-A-immunoglobulins in healthy and diseased children. *Acta Paediatrica Japan* 1965;7:13-
56. Peterson PA, Berggard I. Urinary immunoglobulin components in normal, tubular, and glomerular proteinuria: quantities and characteristics of free light chains, IgG, IgA and Fc gamma fragment. *Eur J Clin Invest* 1971;1:255-264.
57. Waldmann TA, Strober W, Mogielnicki RP. The renal handling of low molecular weight proteins. II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome or uremia. *J Clin Invest* 1972;51:2162-2174.
58. Giangiacomo J, Cleary TG, Cole BR, Hoffsten P, Robson AM. Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1975;293:8-12.
59. Mc Lean RH, Forsgre A, Bjorksten B, Kim Y, Quic PG, Michael AF. Decreased serum factor B concentration associated with decreased opsonization of *Escherichia coli* in the idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 1977;11:910-916.
60. Llach F. Hypercoagulability, renal vein thrombosis, and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1985;28:429-439.
61. Girot R, Jaubert F, Leon M, Bellon B, Alich M, Josso F, Lepelletier O, Beguin S, Monnet JP. Albumin, fibrinogen, prothrombin and antithrombin III variations in blood, urines and liver in rat nephrotic syndrome (Heymann nephritis). *Thromb Haemost (Stuttgart)* 1983;49:13-17.
62. Baxter JH. Hyperlipoproteinemia in nephrosis. *Arch Inter Med* 1962;109:742-757.
63. Thomas EM, Rosenblum AH, Lander HB, Fisher R. Relationship between blood lipid and blood protein levels in the nephrotic syndrome. *Am J Dis Chil* 1951;81:207-214.
64. Gherardi E, Calandra S. Plasma and urinary lipids and lipoproteins during the development of nephrotic syndrome induced in the rat by puromycin aminonucleoside. *Biochim Biophys Acta* 1981;710:188-196.

65. Baxter JH, Goodman HC, Havel RJ. Serum lipid and lipoprotein alterations in nephrosis. *J Clin Invest* 1960;39:455-465.
66. Appel GB, Blum CB, Chien S, Kunis CL, Appel AS. The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome: relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure, and viscosity. *N Engl J Med* 1985;312:1544-1548.
67. Muls E, Rosseneu M, Daneels R, Schurgers M, Boelaert J. Lipoprotein distribution and composition in the human nephrotic syndrome. *Atherosclerosis* 1985;54:225-237.
68. Sasaki J, Hara F, Motooka T, Naito S, Arakawa K. Nephrotic syndrome associated with hyper-high density lipoproteinemia potentiated by prednisolone therapy. *Nephron* 1985;41:110-113.
69. Marsh JB, Sparks CE. Lipoprotein in experimental nephrosis: plasma levels and composition. *Metabolism* 1979;10:1040-1045.
70. Gherardi E, Rota E, Calandra S, Genova R, Tamborino A. Relationship among the concentrations of serum lipoproteins and changes in their chemical composition in patients with untreated nephrotic syndrome. *Eur J Clin Invest* 1977;7:563-570.
71. Calandra S, Gherardi E, Fainaru M, Gwaitani A, Bartošek I. Secretion of lipoproteins, apolipoprotein A-I and apolipoprotein E by isolated and perfused liver with experimental nephrotic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:331-338.
72. Otha T, Matsuda I. Lipid and apolipoprotein levels in patients with nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 1981;117:133-143.
73. Tarugi P, Calandra S, Chan L. Changes in apolipoprotein A-I mRNA level in the liver of rats with experimental nephrotic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1986;868:51-61.
74. Levy E, Ziv E, Bar-On H, Shafrir E. Chylomicron synthesis in experimental nephrotic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1989;1005:20-26.
75. Drabkin DL, Marsh JB. Metabolic channeling in experimental nephrosis. I Protein and carbohydrate metabolism. *J Biol Chem* 1955;212:623-631.
76. Marsh JB, Drabkin DL. Experimental reconstruction of metabolic pattern of lipid nephrosis: key role of hepatic protein synthesis in hyperlipemia. *Metabolism* 1960;9:946-955.
77. Marsh JB, Sparks CE. Hepatic secretion of lipoproteins in the rat and the effect of experimental nephrosis. *J Clin Invest* 1979;64:1229-1237.
78. Allen JC, Baxter JH, Goodman HC. Effects of dextran,

polivinylpirrolidone and gammaglobulins on the hyperlipidemia of experimental nephrosis. *J Clin Invest* 1961;40:499-508.

79. Baxter JH, Goodman HC, Allen JC. Effect of infusion of serum albumin on serum lipids and lipoproteins in nephrosis. *J Clin Invest* 1961;40:490-498.

80. Davis RA, Engelhorn SC, Weinstein DB, Steinberg D. Very low density lipoprotein secretion by cultured hepatocytes: inhibition by albumin and other macromolecules. *J Biol Chem* 1980;255:2039-2045.

81. Marsh JB. Lipoprotein metabolism in experimental nephrosis. *J Lipid Res* 1984;25:1619-1623.

82. Shore VG, Forte T, Licht H, Lewis SB. Serum and urinary lipoproteins in the human nephrotic syndrome: evidence for renal catabolism of lipoproteins. *Metabolism* 1982;31:258-268.

83. Gitlin D, Cornwell DG, Nakasato D, Oncley JL, Hughes Jr WL, Janeway CA. Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1958;37:172-184.

84. Furukawa S, Hirano T, Mano JCL, Nagano S, Takahashi T. Catabolic defect of triglyceride is associated with abnormal very-low-density lipoprotein in experimental nephrosis. *Metabolism* 1990;39:101-107.

85. Garber DW, Gottlieb BA, Marsh JB, Sparks CE. Catabolism of very low density lipoproteins in experimental nephrosis. *J Clin Invest* 1984;74:1375-1383.

86. Yamada M, Matsuda I. Lipoprotein lipase in clinical and experimental nephrosis. *Clin Chim Acta* 1970;30:787-794.

87. Kashyap ML, Srivastava LS, Hynd BA, Brady D, Perisutti G, Glueck CJ, Gartside PS. Apolipoprotein CII and lipoprotein lipase in human nephrotic syndrome. *Atherosclerosis* 1:80;35:29-40.

88. Chan MK, Varghese Z, Persuad JW, Moorhead JF. Post-heparin hepatic and lipoprotein lipase activities in nephrotic syndrome. *Aust NZ J Med* 1984;14:841-847.

89. Cohen SL, Cramp DG, Lewis AD, Tickner TR. The mechanism of hyperlipidaemia in nephrotic syndrome - Role of low albumin and the LCAT reaction. *Clin Chim Acta* 1980;104:393-400.

90. Hiramatsu M, Karashima S, Hattori S, Matsuda I, Maeda H. A case of congenital nephrotic syndrome associated with partial deficiency of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) and hypothyroidism. *Int J Pediat Nephrol* 1984;5:183-186.

91. Sestak TL, Alavi N, Subbaiah PV. Plasma lipids and acyltransferase activities in experimental nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1989;36:240-248.

92. Zilleruelo G, Hsia SL, Freundlich M, Groman HM. Persistence of serum lipids abnormalities in children with idiopathic nephrotic syndrome. *J Pediatr* 1984;104:61-
93. Golper TA, Schwartz SH. Impaired renal mevalonate metabolism in nephrotic syndrome: a stimulus for increased hepatic cholesterologenesis independent of GFR and hypoalbuminemia. *Metabolism* 1982;31:471-476.
94. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis. En: Ronsensoer MV, Oratz M, Rothschild MA, eds. *Albumin structure, function and uses*. Elmsford, NY: Pergamon Press, 1977:227-253.
95. Selten GCM, Princen HMG, Selten-Versteegen AME, Mol-Backx GPBM, Yap SH. Sequence of alpha-fetoprotein, albumin and fibrinogen polypeptide mRNAs in different organs, developing tissues and in liver during carcinogenesis in rats. *Biochim Biophys Acta* 1982;699:131-137.
96. Nahon J-L, Trautner I, Poliard A, Presse F, Poiret M, Gal A, Sala-Trepat JM, Legres L, Feldman G, Bernuau D. Albumin and alpha-fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. *J Biol Chem* 1988;263:11436-11442.
97. McLeod JF, Cooke NE. The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues. *J Biol Chem* 1989;264:21760-21769.
98. Rothschild MA, Bauman A, Yallow RS, Berson SA. Tissue distribution of I-131 labelled human serum albumin following intravenous administration. *J Clin Invest* 1955;34:1354-13528.
99. Reeve EV, Chan AY. Regulation of interstitial albumin. En: Rothschild MA, Waldman T, eds. *Plasma protein metabolism*. N. York: Academic Press, 1970:89.
100. Yoffey JM, Courtice MC. Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid complex. N. York: Academic Press, 1970:206.
101. Rothschild MA, Schreiber SS. Serum albumin. *Am J Dig Dis* 1969;14:711-744.
102. Katz J, Bonorris G, Golden S, Sellers AL. Extravascular albumin mass and exchange in rat tissues. *Clin Sci* 1970;39:705-724.
103. Scatchard G, Batchelder AC, Brown A. Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. VI. The osmotic pressure of plasma and of serum albumin. *J Clin Invest* 1944;23:458-464.
104. Peters T Jr. Albumin. An overview and bibliography. Research Products Division. Miles Laboratories Inc. Elkhart, In. 1980.

105. Peters T Jr. Serum albumin. *Adv Clin Chem.* 1970;13:37-111.
106. Dugaiczky A, Law SW, Dennison OE. Nucleotide sequence and the encoded aminoacids of human serum albumin mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:71-75.
107. Sargent TM, Yang M, Bonner J. Nucleotide sequence of cloned rat serum albumin messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:243-246.
108. Jagodzinski LL, Sargent TD, Yang M, Glackin C, Bonner J. Sequence homology between RNAs encoding rat alpha-fetoprotein and rat serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3521-3525.
109. Gorin MB, Cooper DL, Eiferman F, Van de Rijn P, Tilghman SM. The evolution of alpha-fetoprotein and albumin: a comparison of the primary aminoacid sequence of mammalian alpha-fetoprotein and albumin. *J Biol Chem* 1981;256:1954-1959.
110. Siekevitz P, Palade GE. A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. *J Biophys Biochem Cyto* 1960;7:619-630.
111. Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 1975;189:347-358.
112. Shafritz DA, Isselbacher KJ. Current concepts of hepatic protein synthesis. En: Schaffner F, Sherlock S, Leevy CM, eds. *The liver and its diseases.* N. York:NY Intercontinental Medical Book Corp, 1974:43-53.
113. Peters R Jr. The biosynthesis of rat serum albumin. Properties of rat albumin and its occurrence in liver cell fractions. *J Biol Chem* 1982;237:1181-1186.
114. Hicks SJ, Drysdale JW, Munro HN. Preferential synthesis of ferritin and albumin by different populations of liver polysomes. *Science* 1969;164:584-585.
115. Reedman CM. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. *J Biol Chem.* 1969;244:4308-4315.
116. Shafritz DA. Protein synthesis with messenger ribonucleic acid fractions from membrane bound and free polysomes. *J Biol Chem* 1974;249:81-88.
117. Shafritz DA. Evidence from non-translated messenger ribonucleic acid in membrane-bound and free polysomes of rabbit liver. *J Biol Chem* 1974;249:89-93.
118. Yap SH, Strair RK, Shafritz DA. Distribution of rat albumin messenger RNA in membrane-bound versus free polyribosomes as determined by molecular hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5397-5401.

119. Yap SH, Strair RK, Shafritz DA. Effect of a short term fast on the distribution of cytoplasmic albumin messenger ribonucleic acid in rat liver. *J Biol Chem* 1978;253:4944-4950.
120. Grossman SB, Yap SH, Shafritz DA. Influence of chronic renal failure on protein synthesis and albumin metabolism in rat liver. *J Clin Invest* 1977;59:869-878.
121. Yap SH, Strair RK, Shafritz DA. Rat liver albumin messenger RNA: subcellular distribution and change in various models of metabolic diseases. En: Yap SH, Majoor CLH, van Tongeren MHM, eds. *Clinical aspects of albumin*. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff, 1978:49-66.
122. Strauss AW, Donohue AM, Bennet CD. Rat liver prepro-albumin in vitro synthesis and partial aminoacid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:1358-1362.
123. Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 1975;67:835-851.
124. Peters T Jr. Intracellular albumin transport. En: Rosener VM, Ortaz M, Rothschild MA, eds. *Albumin structure, function and uses*. Elmsford, NY: Pergamon Press, 1977:305-332.
125. Campbell PN, Blobel G. The role of organelles in the chemical modifications of the primary translation products of secretory proteins. *FEBS Lett* 1976;72:215-226.
126. Oda K, Ikehara Y. Monensin inhibits the conversion of proalbumin to serum albumin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;105:766-772.
127. Freedman RB, Hillson DA. Formation of disulphide bonds. En: Freedman RB, Hawkins HC, eds. *The enzymology of post-translational modifications of proteins*. N. York: Academic Press, 1980:187.
128. Sargent TD, Jagodzinski LL, Yang M, Bonner J. Fine structure and evolution of the rat albumin gene. *Mol Cell Biol* 1981;1:871-883.
129. Shalaby F, Shafritz DA. Exon skipping during splicing of albumin mRNA precursors of albumin in Nagase analbuminemic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2652-2656.
130. Sargent TD, Sala-Trepat JR, Wallace TM, Rehes RB, Bonner J. The rat serum albumin gene: analysis of cloned sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3256-3260.
131. Pinkert CA, Ornitz DM, Brinster RL, Palmiter RD. An albumin enhancer located 10 kb upstream function along with its promoter to direct efficient liver specific expression in transgenic mice.

Genes Develop 1987;1:268-276.

132. Urano Y, Watanabe K, Sakai M, Tamaoki T. The human albumin gene. Characterization of the 5' and 3' flanking regions and the polymorphic gene transcripts. J Biol Chem 1986;261:3244-3251.

133. Brown JR. Structural origins of mammalian albumin. Fed Proc 1976;35:2141-2144.

134. Eiferman FA, Young PR, Scott RWI, Tilghman SM. Intragenic amplification and divergence in the mouse alpha-fetoprotein gene. Nature 1971;294:713-718.

135. Tilghman SW, Kioussis D, Gavin MB, Garcia-Ruiz JP, Ingram RS. The presence of intervening sequence in the alpha-fetoprotein of the mouse. J Biol Chem 1979;254:7393-7399.

136. Lichtsteiner S, Wuarin J, Schibler U. The interplay of DNA-binding proteins on the promoter of the mouse albumin gene. Cell 1987;51:963-973.

137. Lichtsteiner S, Schibler U. A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. Cell 1989;57:1179-1187.

138. Courtois G, Baumhueter S, Crabtree GR. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with the family of hepatocyte-specific promoters. Proc Natl Acad Sci 1988;85:7937-7941.

139. Cereghini S, Blumenfeld M, Yaniv M. A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. Genes Dev 1988;2:957-974.

140. Kugler W, Wagner U, Ryffel GU. Tissue-specificity of liver gene expression: a common liver-specific promoter element. Nucl Acid Res 1988;16:3165-3174.

141. Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, Crabtree GR. Interaction of a liver specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha-1 antitrypsin promoters. Science 1987;238:688-692.

142. Maire P, Wuarin J, Schibler U. The role of cis-acting promoter elements in tissue specific albumin gene expression. Science 1989;244:343-346.

143. Frain M, Hardon E, Ciliberto G, Sala-Trepas JM. Binding of a liver specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer. Mol Cell Biol 1990;10:991-999.

144. Schreiber G, Urban J, Edwards K. Possible functions of the oligopeptide extension in the albumin precursor. J Theor Biol 1973;60:241-245.

145. Birr C, Weigand K, Turan A. The hexa- and pentapeptide extension of proalbumin. I. Chemical synthesis of serum albumin propeptides. *Biochim Biophys Acta* 1981;670:421-423.
146. Weigand K, Birr C, Suter M. The hea- and pentapeptide extension of proalbumin. II processing of specific antibodies against the synthetic hexapeptide. *Biochim Biophys Acta* 1981;670:424-427.
147. Weigand K, Schmid M, Villringer A, Birr C, Heinrich PC. Hexa- and pentapeptide extension of proalbumin. Feedback inhibition of albumin synthesis by its propeptide in isolated hepatocytes and in the cell free system. *Biochemistry* 1982;21:6053-6059.
148. Nahon JL. The regulation of albumin and alpha-fetoprotein gene expression in mammals. *Biochimie* 1987;69:445-459.
149. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis. *Int Rev Physiol* 1980;21:249-274.
150. Conti R, Ceccarini C, Trecce MF. Thyroid hormones effect on alpha-fetoprotein and albumin coordinate expression by a human hepatoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1989;1008:315-321.
151. Moskaitis JE, Sargent TD, Smith LHJr, Pastor RL, Schoenberg DR. Xenopus laevis serum albumin: sequence of the complementary deoxyribonucleic acids encoding the 68- and 74-kilodalton peptides and the regulation of albumin gene expression by thyroid hormone during development. *Mol Endocrinol* 1989;3:464-473.
152. Nawa K, Nakamura T, Kumatori A, Noda C, Ichihara A. Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocyte. *J Biol Chem* 1986;261:16883-16888.
153. Davis BB, Magge S, Mucenski CG, Drake RL. Insulin-mediated post-transcriptional regulation of hepatic malic enzyme and albumin mRNAs. *Life Sci* 1988;154:1081-1087.
154. Brenner DA, Buck M, Feitelberg SP, Chojkier M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits albumin gene expression in a murine model of cachexia. *J Clin Invest* 1990;85:248-255.
155. Chojkier M, Brenner DA, Lefert HL. Vasopressin inhibits type-I collagen and albumin gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1989;264:9583-9591.
156. Frank JJ, Kruskal JB, Kirsch RF, Beechey APG, Morrel DF, Harrison GG. Halothane decreases albumin and transferrin synthesis studies in the isolated, perfused rat liver and in the intact rat. *Anesthesiology* 1988;68:529-533.
157. Yamauchi A, Yamamoto S, Fukihara Y. Oncotic pressure regulates the levels of albumin mRNA and apolipoprotein B mRNA in cultured rat hepatoma cells (H411E). *Kidney Int* 1989;35:441.

158. Kaysen GA, Jones H Jr, Martin V, Hutchinson FN. A low protein diet restrict albumin synthesis in nephrotic rats. *J Clin Invest* 1989;83:1623-1629.

159. Shafritz DA, Panduro A. Protein Synthesis and gene control in pathophysiological states. En: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver biology and pathophysiology*, 2a. edición. N. York:Raven Press, 1988:83-101.

160. Panduro A, Shalaby F, Shafritz DA. Liver-specific gene expression in various pathophysiological states. *Hepatology* 1987;7:105-185.

161. Liao WSL, Jefferson LS, Taylor JM. Changes in plasma albumin concentration, synthesis rate, and mRNA level during acute inflammation. *Am J Physiol* 1986;251:C928-C934.

162. Moshage HJ, Janseen JAM, Franssen JH, Hafkenscheid JCM, Yap SH. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J Clin Invest* 1987;79:1635-1641.

163. Panduro A, Shalaby F, Weiner FR, Biempica L, Zern MA, Shafritz DA. Transcriptional switch from albumin to alpha-fetoprotein and changes in transcription of other genes during tetrachloride induced liver regeneration. *Biochemistry* 1986;25:1414-1420.

164. Panduro A, Shalaby F, Biempica L, Shafritz DA. Changes in albumin, alpha-fetoprotein and collagen gene transcription in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 1988;8:259-266.

165. Panduro A, Shalaby F, Shafritz DA. Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of liver-specific gene expression during rat development. *Genes Dev* 1987;1:1172-1182.

166. Sevaljević L, Ivanović-Matić S, Petrović M, Gilbetić M, Pantelić D, Poznanović G. Regulation of plasma acute-phase protein and albumin levels in the liver of scalded rats. *Biochem J* 1989;252:663-668.

167. Ritchie RF. Specific proteins. En: Henry JB, ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 16a edición, vol 1. Philadelphia:Saunders, 1979:228-258.

168. Ritzman SE, Daniels JC. Serum protein abnormalities. Diagnostic and clinical aspects. Boston:Little Brown, 1975:527-535.

169. Putnam FW. Alpha, Beta, Gamma, Omega - the rooster of plasma proteins. En: Putnam FW, ed. *The plasma proteins*. 2a edición, Vol 1. N. York:Academic Press, 1975:58-125.

170. Scott T, Eagleson M. *Concise Encyclopedia of Biochemistry*,

2a. edición. Berlin:Walter de Gruyter, 1988:551-552.

171. Daniels JC. Carrier protein abnormalities. En: Ritzman SE, Daniels JC, ed. Serum protein abnormalities. Diagnostic and clinical aspects. Boston:Little Brown, 1975:213-241.

172. Schaeffer E, Lucero MA, Jeltsch JM, Py MC, Levin MJ, Chambon P, Cohen GN, Zakin MM. Complete structure of human transferrin gene. Comparison of analogues chicken gene and human pseudogene. Gene 1987;56:109-106.

173. Bowman BH, Yang F, Adria-GI. Transferrin: evolution and genetic regulation of expression. Adv Genet 1988;25:1-38.

174. Lucero MA, Schaeffer E, Cohen GN, Zakin MM. The 5' region of the human transferrin gene: structure and potential regulatory sites. Nucl Acids Res 1986;14:8692.

175. Adrian GS, Korinek FW, Bowman BH, Yang F. The human transferrin gene: 5' region contains conserved sequences which match the control elements regulated by heavy metals, glucocorticoids and acute phase reaction. Gene 1986;49:167-175.

176. Ochoa A, Brunel F, Mendelson D, Cohen GN, Zakin MM. Different liver nuclear protein bind to similar DNA sequences in the 5' flanking regions of three hepatic genes. Nucl Acid Res 1989;17:119-133.

177. Schaeffer E, Boissier F, Py MC, Cohen GN, Zakin MM. Cell type-specific expression of the human transferrin gene. Role of promoter, negative, and enhancer elements. J Biol Chem 1989;264:7153-7160.

178. Morgan EH. Synthesis and secretion of transferrin. En: Glaumann H, Peters JRT, Redman C, eds. Plasma protein secretion by the liver. Londres:Academic Press, 1983:331-355.

179. Aldred AR, Dickson PW, Marley PD, Schreiber G. Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. J Biol Chem 1987;262:5293-5297.

180. Tsutsumi M, Skinner MK, Sanders-Bush E. Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. J Biol Chem 1989;264:9626-9631.

181. Espinosa de los Monteros A, Kumar S, Seully S, Cole R de Vellis J. Transferrin gene expression and secretion by rat brain cells in vitro. J Neurosci Res. 1990;25:576-580.

182. Hugly S, Griswold M. Regulation of levels of specific sertoli cell mRNAs by vitamin A. Develop Biol 1987;121:318-324.

183. Hammer RE, Idzerda RL, Brinster RL, Mckignht S. Estrogen regulation of the avian transferrin gene in transgenic mice. Mol Cell Biol 1986;6:1010-1014.

184. Kraemer M, Vassy J. The effect of dexamethasone on transferrin secretion by cultured fetal rat hepatocytes. *Eur J Cell Biol* 1986;42:52-59.

185. Watanabe Y, Takahashi A, Shimazu T. Neural control of biosynthesis and secretion of serum transferrin in perfused rat liver. *Biochem J* 1990;267:545-548.

186. Williams WJ. *Biochemistry of plasma coagulation factors*. Ed: Williams WJ, Bentler E, Erslev AJ, Lichtman MA, Hematology. N. York: McGraw-Hill, 4a edición 1990:1267-1284.

187. Fuller GM, Bunzel RJ, Nesbit JE. Fibrinogen. *Methods Enzymol* 1988;163:474-485.

188. Kant JA, Fornace Jr AJ, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2344-2348.

189. Crabtree GR, Kant JA. Molecular cloning of cDNA for the alpha, beta, and gamma chains of rat fibrinogen. A family of coordinately regulated genes. *J Biol Chem* 1981;256:9718-9723.

190. Eastman EM, Gilula NB. Cloning and characterization of a cDNA for the B-beta chain of rat fibrinogen: evolutionary conservation of translated and 3'-untranslated sequences. *Gene* 1989;79:151-158.

191. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM. Fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains *J Biol Chem* 1984;259:10574-10581.

192. Crabtree GR, Kant JA. Coordinate accumulation of the mRNAs for the alpha, beta, and gamma chains of rat fibrinogen following defibrination. *J Biol Chem* 1982;257:7277-7279.

193. Fowlkes DM, Mullis NT, Comeau CM, Crabtree GR. Potential basis for regulation of the coordinately expressed fibrinogen genes: homology in the 5' flanking regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2313-2316.

194. Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, Crabtree GR. Interaction of the liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha-1-antitrypsin promoters. *Science* 1987;238:688-692.

195. Morgan JG, Courtois G, Fourel G, Chodosh LA, Campbell L, Evans E, Crabtree GR. Sp1, a CAAT-binding factor, and the adenovirus major late promoter transcription factor interact with functional regions of the gamma-fibrinogen promoter. *Mol Cell Biol* 1988;8:2628-2637.

196. Otto JM, Grenett HE, Fuller GM. The coordinated regulation

of fibrinogen gene transcription by hepatocyt-stimulating factor and dexamethasone. *J Cell Biol* 1987;105:1067-1072.

197. Chung DW, Rixon MW, McGillivray RTA, Davie EW. Characterization of a cDNA clone coding for the beta chain of bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1466-1470.

198. Selten GCM, Princen HMG, Selten-Versteegen AME, Mol-Backx GPBM, Yap SH. Sequences content of alpha-fetoprotein, albumin and fibrinogen polypeptide mRNAs in different organs, developing tissues and in liver during carcinogenesis in rats. *Biochim Biophys Acta* 1982;699:131-137.

199. Arnaud P, Miribel L, Roux AF. Alpha-1 acid glycoprotein. *Methods Enzymol* 1988;163:418-430.

200. Schindl K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, Ishiguro M, Nanno S. Structure of alpha-1-acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry* 1973;12:2711-2724.

201. Cox DW, Francke U. Direct assignment of orosomucoid to human chromosome 9 and alpha-2-HS-glycoprotein to chromosome 3 using human fetal liver X rat hepatoma hybrids. *Human Genet* 1985;70:109-115.

202. Dente L, Pizza MG, Metspalu A, Cortese R. Structure and expression of the genes coding for human alpha-1-acid glycoprotein. *EMBO J* 1987;6:2289-2296.

203. Woon KW, Baumann H. The cytokine response element of the rat alpha-1-acid glycoprotein gene is a complex of several interacting regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 1990;10:3965-3978.

204. Ricca GA, Taylor JM. Nucleotide sequence of rat alpha-1-acid glycoprotein messenger RNA. *J Biol Chem* 1981;256:11199-11202.

205. Board PG, Jones IM, Bentley AK. Molecular cloning and nucleotide sequence of human alpha-1-acid glycoprotein cDNA. *Gene* 1986;44:127-131.

206. Delers F, Mangeney M, Paffa D, Vallet-Colom I, Daveau M, Tran-Quang N, Davrinches C, Chambaz J. Changes in rat liver mRNA for alpha-1-acid glycoprotein, apolipoprotein E, apolipoprotein B and beta-actin after mouse recombinant tumor necrosis factor injection. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:81-88.

207. Baumann H, Maquat LE. Localization of DNA sequences involved in dexamethasone-dependent expression of the rat alpha-1-acid glycoprotein. *Mol Cell Biol* 1986;6:2551-2561.

208. Prowse KR, Baumann H. Hepatocyte-stimulating factor, beta-2 interferon, and interleukin-1 enhances expression of the rat

alpha-1-acid glycoprotein gene via a distal upstream regulatory region. *Mol Cell Biol* 1988;8:42-51.

209. Dewey MJ, Rheaume C, Berger FG, Baumann H. Inducible and tissue-specific expression of rat alpha-1-acid glycoprotein in transgenic mice. *J Immunol* 1990;144:4392-4398.

210. Majello B, Arcone R, Toniatti C, Ciliberto G. Constitutive and IL-6 induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J* 1990;9:457-465.

211. Oliviero S, Cortese R. The human haptoglobin gene promoter: interleukin-6-responsive elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6. *EMBO J* 1989;8:1145-1151.

212. Poli V, Cortese R. Interleukin 6 induced a liver-specific nuclear protein that binds to the promoter of acute-phase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8202-8206.

213. Ricca GA, Hamilton RW, McLean JW, Conn A, Kalinyak JE, Taylor JM. Rat alpha-1-acid glycoprotein mRNA. Cloning of double stranded cDNA and kinetics of induction of mRNA levels following acute inflammation. *J Biol Chem* 1981;256:10362-10368.

214. Birch HE, Schreiber G. The association of acute phase protein gene with the nuclear matrix of rat liver during experimental inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;137:633-639.

215. Scanu AM. Plasma apolipoproteins: gene structure, function, and variants. En: Putnam FW, ed. *The plasma proteins*, vol V. N. York:Academic Press, 1987:141-189.

216. Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1988;29:245-271.

217. Higuchi K, Law SW, Hoeg JM, Schumacher UK, Meglin N, Brewer HB. Tissue-specific expression of apolipoproteins A-I (Apo AI) is regulated by regulated by the 5' flanking region of the human Apo AI gene. *J Biol Chem* 1988;263:18530-18536.

218. Horiuchi K, Tajima S, Menju M, Yamamoto A. Structure and expression of mouse apolipoprotein E gene. *J Biochem* 1989;106:98-103.

219. Smith JD, Melian A, Leff T, Breslow JL. Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J Biol Chem* 1988;263:8300-8308.

220. Paik YK, Chang DJ, reardon CA, Walker MD, Taxman E, Taylor JM. Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1988;263:13340-13349.

221. Simonet ES, Bucay N, Lauer SJ, Wirak Do, Stevens ME, Weisgraber KH, Pitas RE, Taylo JM. In the absence of a downstream element, the apolipoprotein E gene is expressed at high levels in kidneys of transgenics mice. *J Biol Chem* 1990;265:10809-10812.
222. Luo CC, Li WH, Chan L. Structure and expression of dog apolipoprotein A-I, E, and C-1 mRNAs: implications for the evolution and functional constraints of apolipoprotein structure. *J Lipid Res* 1989;30:10735-10746.
223. Blue M-L, Williams SL, Zucker S, Khan SA, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:283-287.
224. Elshourbagy NS, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;82:203-207.
225. Lin-Lee YC, Kao FT, Cheung P, Chan L. Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the mRNA in lipoprotein and non-lipoprotein producing tissues. *Biochemistry* 1985;24:3751-3756.
226. Lin C-T, Xu Y, Wu J-Y, Chan L. Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues. *J Clin Invest* 1986;78:947-958.
227. Lenich C, Brecher P, Makrides S, Chobanian A, Zannis VI. Apolipoprotein gene expression in the rabbit: abundant size, and distribution apolipoprotein mRNA species in different tissues. *J Lipid Res* 1988;29:755-764.
228. Sorci-Thomas M, Prack MM, Dashti N, Johnson F, Rudel LL, Williams DL. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1989;30:1397-1403.
229. Davis RA, Druz SM, Leighton JK, Brengaze VA. Increased translatable mRNA and decreased lipogenesis are responsible for the augmented secretion of lipid-deficient apolipoprotein E by hepatocytes from fasted rats. *J Biol Chem* 1989;264:8970-8977.
230. Kim MH, Nakayam R, Manos P, Tomlinson JE, Choi E, Ng JD, Holten D. Regulation of apolipoprotein E synthesis and mRNA by diet and hormones. *J Lipid Res* 1989;30:663-671.
231. Strobl W, Gorder NL, Fienup GA, Lin-Lee YC, Gotto AM Jr, Patsch W. Effect of sucrose diet on apolipoprotein biosynthesis in rat liver. Increase in apolipoprotein E gene transcription. *J Biol Chem* 1989;264:1190-1194.

232. Mazzone T, Bashceruddin K, Poules C. Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J Lipid Res* 1989;30:1055-1064.
233. Monge JC, Hoeg JM, Law SW, Brewer HB Jr. Effects of low density lipoproteins, high density lipoproteins, and cholesterol on apolipoproteins A-I mRNA in HepG2 cells. *FEBS Lett* 1989;243:213-217.
234. Mangeney M, Cardot P, Lyonnet S, Coupe C, Nenarou R, Munnich A, Girard J, Chambaz J, Bereziat G. Apolipoprotein-E-gene expression in rat liver during development in relation to insulin and glucagon. *Eur J Biochem* 1989;181:225-230.
235. Dashti N, Williams DL, Alaupovic P. Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in Hep G2 cells. *J Lipid Res* 1989;30:1365-1373.
236. Lin RC. Effects of hormones on apolipoproteins secretion in cultured rat hepatocytes. *Metabolism* 1988;37:745-751.
237. Davidson HO, Carlos RC, Drewak MJ, Parner TG. Apolipoprotein gene expression in the rat is regulated in a tissue-specific manner by thyroid hormone. *J Lipid Res* 1988;29:1511-1522.
238. Strobl W, Gorder NL, Lin-Lee YC, Gotto AM, Patsch W. Role of thyroid hormones in apolipoprotein A I gene expression in rat liver. *J Clin Invest* 1990;85:659-667.
239. Delers F, Mangeney M, Raffa D, Vallet-Colom I, Danveau M, Fran-Quang N, Davrinches C, Chambaz J. Changes in rat liver mRNA for alpha-1-acid glycoprotein, apolipoprotein E, apolipoprotein B and beta-actin after mouse recombinant tumor necrosis factor injection. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:81-88.
240. Staels B, Auwerx J, Chan L, van Tol A, Rosseneu M, Verhoeven G. Influence of development, estrogens and food intake on apolipoprotein A-I, A-II, and E mRNA in rat liver and intestine. *J Lipid Res* 1989;30:1137-1145.
241. Panduro A, Lin-Lee YC, Chan LC, Shafritz DA. Transcriptional and post-transcriptional regulation of apolipoprotein E, AI and A-II gene expression in normal rat liver and during several pathophysiological states. *Biochemistry* 1990;29:8430-8435.
242. Perozzi G, Mengheri E, Faraonio R, Gaetani S. Expression of liver specific genes coding for plasma proteins in protein deficiency. *FEBS Lett* 1989;257:215-218.
243. Kaysen GA, Jones Jr H, Hutchison FN. High protein diets stimulate albumin synthesis at the site of albumin mRNA transcript. *Kidney Int* 1989;36 (suppl 27):S-168-S-172.
244. de Jong FA, Schreiber G. Messenger RNA levels of plasma

proteins in rat liver during protein depletion and refeeding. *J Nutr* 1987;117:1795-1800.

245. Garlick PJ, Millward DJ, James WPT, Waterlow JC. The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1975;414:71-84.

246. Kirsch RE, Frith L, Black E, Hoffenberg R. Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. *Nature* 1968;217:578-579.

247. Morgan EH, Peters T Jr. The biosynthesis of rat serum albumin. V. Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. *J Biol Chem* 1971;245:3500-3507.

248. James WPT, Hay AM. Albumin metabolism: effect of the nutritional state and the dietary protein intake. *J Clin Invest* 1968;47:1958-1972.

249. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8:219-232.

250. Lowry OH, Rosenbrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein determination with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-272.

251. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.

252. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5201-5205.

253. Summers J. Physical map of polyoma viral DNA fragments produced by a cleavage with a restriction enzyme from *Haemophilus aegyptius* endonuclease R Hae III. *J Virol* 1975;15:946-953.

254. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980;47:1-9.

255. Marshall JF, Apostolopoulos JJ, Brack CM, Howlett GJ. Regulation of apolipoprotein gene expression and plasma high-density lipoprotein composition in experimental nephrosis. *Biochim Biophys Acta* 1990;1042:271-279.

256. Marsh JB, Drabkin DL. Metabolic channeling in experimental nephrosis. III. Influence of diet and of adrenalectomy; liver hypertrophy. *J Biol Chem* 1958;230:1063-1071.

257. Shafirir E, Brenner T, Gutman A, Orevi M, Diamant S, Mayer M. Hepatic metabolic pathways and hormonal status in experimental nephrotic syndrome. *Israel J Med Sci* 1972;8:271-284.

258. Glass AR, Vigersky RA, Rajatanavin R, Pardridge W, Smallridge RC, Wartofsky L, Burman KD. Low serum thyroxine and high serum triiodothyronine in nephrotic rats: etiology and implications for bioavailability of protein-bound hormone. *Endocrinology* 1984;114:1745-1753.