

26
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS ELECTROFORETICO SECUENCIAL DE
PROTEINAS SERICAS Y URINARIAS EN RATAS
CON SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

PATRICIA CALDERON GONZALEZ

México, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN

En este estudio se realizó un análisis electroforético secuencial en gel acetato de celulosa de las fracciones de proteínas albúmina, globulinas alfa-1, alfa-2, beta y gamma en suero y orina de ratas con síndrome nefrótico (SN) los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 30 después de la inyección única de aminonucleósido de puromicina (ANP) en una dosis correspondiente al modelo agudo.

A pesar de que se han realizado estudios previos sobre el patrón electroforético de proteínas en suero y orina de ratas con nefrosis experimental, no existe un patrón electroforético definido para las fracciones de proteínas en suero y orina durante todo el periodo de la enfermedad de síndrome nefrótico en ratas. Ya que sólo en 2 trabajos se ha encontrado que, por un lado, en suero la fracción globulina alfa-1 aumenta, la gamma desciende mientras que las fracciones alfa-2 y beta no cambian; por otro lado las fracciones de proteína alfa-2 y beta se incrementan en suero. Tales estudios muestran diferencias en las fracciones de globulinas alfa-2 y beta, por lo que los resultados no son muy consistentes.

En el presente análisis se encontró que los niveles de proteínas totales disminuyeron en suero y aumentaron en orina los días 4 al 16 y 6 al 16 respectivamente.

La fracción albúmina en suero disminuyó sus niveles los días 4 al 16 y su excreción aumentó los días 6 al 16; la

fracción globulina alfa-1 aumentó en suero los días 8 al 30 y en orina se incrementó los días 6 al 16; la fracción globulina alfa-2 en suero no tuvo cambios significativos y su excreción urinaria aumentó los días 6 al 10; la fracción globulina beta disminuyó en suero los días 4 al 20 y en orina se incrementó los días 6 al 16; la fracción globulina gamma bajó en suero sus niveles los días 6,8 y 12 significativamente y en orina aumentaron los días 6 al 10.

Se observó en estas ratas un incremento en la excreción urinaria de todas las fracciones de proteína después de la inyección única de ANP; lo que indica que la proteinuria no es selectiva.

Los perfiles de las fracciones de proteínas fueron diferentes; la fracción alfa-1 aumentó en suero, mientras que las demás disminuyeron y la fracción alfa-2 no se modificó, esto sugiere que la concentración de las diferentes fracciones de proteína en suero de las ratas nefróticas se regula independientemente.

El patrón electroforético de fracciones de proteínas en suero de ratas nefróticas inducidas con ANP fué diferente a los patrones electroforéticos previamente reportados en nefrosis humana y en ratas con respuesta inflamatoria de fase aguda.

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS.	iii
I. INTRODUCCION.	1
I.1 SINDROME NEFROTICO.	1
a) MODELO AGUDO	2
b) MODELO CRONICO	2
I.2 ESTRUCTURA DEL GLOMERULO.	3
I.3 PROTEINURIA	6
I.4 MECANISMOS DE PROTEINURIA	7
I.5 ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEINAS CIRCULANTES EN EL SN	9
II. ANTECEDENTES DIRECTOS	13
III. OBJETIVOS	15
IV. MATERIAL Y METODOS.	16
IV.1 REACTIVOS	16
IV.2 EQUIPO.	16
I.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	18
IV.4 METODOS ANALITICOS.	19
IV.6.1 DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN SUERO	19
IV.6.2 DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN ORINA	20
IV.6.3 ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA	21
a) PRINCIPIO	21
b) METODOLOGIA	23

c)	DENSITOMETRIA DE LAS ELECTROFORESIS27
IV.6.4	ANALISIS ESTADISTICO.28
V.	RESULTADOS.30
V.1	ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN SUERO.30
V.2	ELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIAS30
V.3	TRAZOS DENSITOMETRICOS DE LAS ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN SUERO..33
V.4	TRAZOS DENSITOMETRICOS DE LAS ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN URINARIAS.33
V.5	VOLUMEN URINARIO.37
V.6	PROTEINAS TOTALES37
V.7	FRACCION ALBUMINA40
V.8	FRACCION GLOBULINA ALFA-140
V.9	FRACCION GLOBULINA ALFA-243
V.10	FRACCION GLOBULINA BETA43
V.11	FRACCION GLOBULINA GAMMA.46
VI	DISCUSION48
VII	CONCLUSIONES.53
VIII	BIBLIOGRAFIA.54

ABREVIATURAS

ANP.Aminonucleósido de puromicina.
ARN.Acido ribonucleico.
ASB.Albúmina sérica de bovino.
BFG.Barrera de filtración glomerular.
°CGrados centígrados.
dlDecilitros.
DDDensidad óptica.
g.Gramos.
h.Horas.
IDL.Lipoproteínas de densidad intermedia.
IgG.Inmunoglobulina G.
IgE.Inmunoglobulina E.
IgM.Inmunoglobulina M.
LDL.Lipoproteínas de densidad baja.
LRE.Lámina rara externa.
LRI.Lámina rara interna.
M.Molar.
MBG.Membrana basal glomerular.
min.minuto.
mgmiligramos.
ulmicrolitros.
mlmililitros.
mmmilímetros
nmnanómetros.

N.Normal.
rpm.revoluciones por minuto.
seg.segundos.
SNSíndrome nefrótico.
VLDLLipoproteínas de densidad muy baja.
vol.Volumen.

I. INTRODUCCION

I.1. SINDROME NEFROTICO

GENERALIDADES.

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad renal que se caracteriza principalmente por una proteinuria masiva como consecuencia del aumento en la filtración glomerular de las proteínas plasmáticas, hipoalbuminemia, retención de sodio, edema generalizado, disminución de la presión coloidosmótica, alteraciones en la concentración de casi todas las proteínas plasmáticas, hiperlipidemia, hipertrofia hepática con aumento de ADN y ARN, alteraciones en el metabolismo de calcio y la vitamina D, alteración en los factores de la coagulación, disminución de la inmunidad humoral y celular además de desnutrición (1-4).

Se piensa que las alteraciones sistémicas del SN son secundarias a la pérdida de proteínas plasmáticas en orina debido al daño en el glomerulo a nivel de la barrera de filtración glomerular (1).

El SN que se presenta en humanos, puede reproducirse experimentalmente en animales mamíferos como en ratas, donde presentan alteraciones renales y sistémicas muy parecidas a la enfermedad en los humanos (5).

Se han descrito diversas maneras de inducir síndrome nefrótico experimental a través de inyecciones con diferentes compuestos como son los siguientes:

- suero antirriñón ó suero nefrotóxico (5,6).
- adriamicina (doxorubicina) (7,8).
- daunomicina o daunorubicina. (9).
- ANP (Aminonucleosido de puomicina) (4,10,12).

Los cuales inducen una masiva proteinuria característica del SN.

Se han descrito 2 modelos experimentales con ANP para inducir síndrome nefrótico.

a) MODELO AGUDO.

Este modelo se induce por 1 ó varias inyecciones subcutáneas ó intraperitoneales, en una dosis de 50 a 150 mg/100g de peso corporal total. Que produce nefrosis en ratas además de una proteinuria masiva, el SN al término de 7 a 14 días después de su aplicación, alrededor de 3 semanas posteriores la proteinuria disminuye y desaparece a las 6 semanas.

b) MODELO CRONICO.

Este modelo produce daño renal inducido por 1 ó varias dosis de inyecciones intravenosas a bajas dosis (5 mg/100 g de peso corporal total) (12).

Grand et al. (25) reportaron que con inyecciones repetidas de ANP se produce nefrosis crónica y el daño renal es irreversible.

1.2. ESTRUCTURA DEL GLOMERULO

Anatómicamente el glomérulo consiste en una intrincada red de capilares a través de la cual fluye sangre que se bombea por fuerzas hidráulicas generadas por las contracciones isorritmicas del corazón (figura 1).

El glomérulo es una estructura o barrera selectiva de filtración de moléculas de proteína, esta barrera está constituida por la pared capilar glomerular que consta de 3 componentes:

- a) células endoteliales cuyo citoplasma está fenestrado,
- b) la membrana basal glomerular (MBG) compuesta de 3 capas: la lámina rara interna (LRI), la lámina densa (LD), la lámina rara externa (LRE), y
- c) los procesos podocíticos de las células epiteliales.

La fenestración de las células endoteliales es de un diámetro promedio de 70 nm. Estas células no ofrecen una barrera mecánica aparente a la filtración de macromoléculas, sin embargo, el contenido de compuestos como los sialoglicanos, proveen al endotelio de cargas negativas, para repeler moléculas cargadas negativamente como la albúmina.

Estas células endoteliales permiten que todos los elementos solubles del plasma puedan estar en contacto directo con la membrana basal glomerular.

La membrana basal glomerular (MBG) está compuesta principalmente de una malla de fibras de colágena. La LRI tiene un espesor de 300 a 350 nm en el humano pero puede

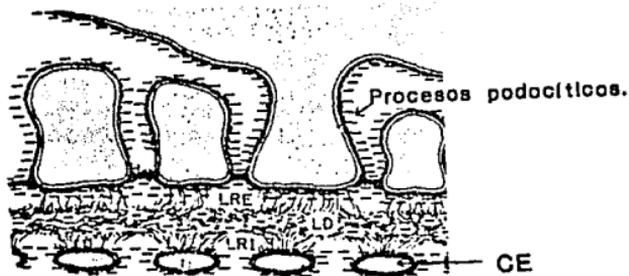
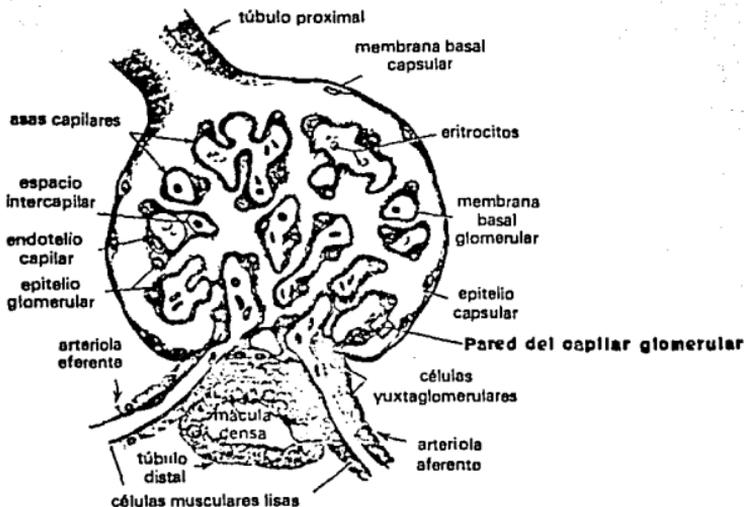


FIGURA). Estructura del glomérulo.- Se observa anatomía de la pared del capilar glomerular. CE=células endoteliales MBG= Membrana basal glomerular: consta de 3 capas celulares, la lámina rara interna (LRI), la lámina densa (LD) y la lámina externa (LRE); CE=los procesos podocíticos de las células epiteliales.

variar de 150 a 350 nm en diferentes especies, la LD constituye una barrera significativa de filtración de proteínas plasmáticas neutras basadas en su tamaño molecular debido a la red de fibrillas empaquetadas y compuestas por colágena tipo IV. Se piensa que los espacios entre estas fibras son poros con moléculas neutras donde se tamizan las moléculas en base a sus dimensiones; la LD contiene pocos residuos aniónicos, excepto los grupos carboxilo libres de la colágena, la hendidura del poro contiene una carga negativa debido a la presencia de ácido siálico, rico en glicoproteínas que sirven de barrera a la filtración de moléculas aniónicas, la LRE es la parte más externa de la pared glomerular hacia el espacio de Bowman.

Los procesos podocíticos de las células epiteliales que están parcialmente embebidos en la LRE, se encuentran como extensiones citoplásmicas sujetas al exterior de la MBG como una serie de interdigitaciones de procesos podocíticos. 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 que contiene espacios rectangulares de un tamaño aproximado de 4 x 14 nm, a través del cual pasan las moléculas pequeñas y probablemente restringen el paso de la albúmina y de moléculas más grandes (13).

Tanto la LRI y LRE determinan una barrera que puede retardar las moléculas de proteínas aniónicas, por su contenido de proteoglicanos tales como el heparán sulfato-proteoglicano y otras glicoproteínas sulfatadas o grupos

libres carboxilo que funcionan como una barrera electrostática a base de polianiones (figura 1) (2,14).

1.3 PROTEINURIA

El paso anormal de proteínas plasmáticas en la orina se conoce como proteinuria; puede ser consecuencia de un incremento en la permeabilidad glomerular ocasionado por una lesión glomerular o de una resorción defectuosa de proteínas por un túbulo lesionado o saturado (15).

En el síndrome nefrótico el incremento de la excreción urinaria de algunas proteínas ha sido bien documentada (14), siendo la albúmina la principal proteína urinaria en el SN.

Se ha descrito que la proteinuria es paralela al nivel de proteínas en el plasma y a la proporción de filtración glomerular, pero en diversos estudios realizados en humanos y animales con SN se demuestra que la disminución en la concentración de albúmina plasmática no siempre se correlaciona con la proteinuria. Esto puede deberse al aumento en el catabolismo de la albúmina que se ha observado en el SN (15); otros factores que pueden contribuir a explicar la hipalbuminemia son la disminución en su síntesis, cambios en su distribución ó pérdida total en el cuerpo (2).

La pérdida de albúmina por orina es importante; sin embargo la pérdida por sí misma no explica la hipalbuminemia, pero también se ha visto que en muchos pacientes con SN la

velocidad de síntesis de la albúmina hepática puede incrementarse al menos el triple para compensar su pérdida; por otro lado también la velocidad de síntesis de albúmina puede estar aumentada en pacientes si la ingestión de proteínas es adecuada. (2,16).

La hipalbuminemia juega un papel importante en la patogénesis de la hiperlipoproteinemia y del edema (16).

El edema junto con la ascitis se deben a una disminución en la presión coloidosmótica provocada por la pérdida de proteínas plasmáticas principalmente albúmina(2,3,17); esto produce una reducción en la presión oncótica de la sangre favoreciendo el movimiento de agua al espacio intravascular e intersticial y se inicia la retención de sodio para mantener la osmolaridad de los líquidos del cuerpo dando un progresivo desarrollo del fluido extracelular siendo esto una manifestación del edema (15,17).

El descenso de las proteínas séricas coincide con el periodo de la máxima proteinuria y también ocurre un aumento en el volumen urinario como consecuencia de la disminución del líquido de ascitis (12).

I.4 MECANISMOS DE PROTEINURIA

La proteinuria en el SN se presenta por daño a nivel de glomérulo, fundamentalmente en la estructura que permite el

filtrado de proteínas, lo que conduce a una filtración de proteínas que exceda la capacidad de absorción máxima del túbulo.

Se ha sugerido que la pérdida de proteoglicanos en la MBG puede contribuir a una proteinuria en forma masiva; en otros estudios sobre SN se ha descrito que la glucosa y la manosa se acumulan principalmente en las glicoproteínas componentes de la MBG y le inducen cambios en la orientación de su estructura tridimensional; estos cambios principalmente alteran el tamaño de sus poros propiciando que exista un aumento en la excreción de proteínas (3).

El ANP utilizado para inducir SN, parece tener su sitio de acción en el epitelio glomerular, donde produce la fusión de podocitos ocasionando un daño en la MBG (5,12,14) y una proteinuria, además de otras alteraciones sistémicas secundarias que se manifiestan en el SN.

Para determinar el paso de proteínas en la orina final, existen diferentes mecanismos, que están en función de la barrera de filtración, la cual se define por 2 sistemas:

- La barrera tamaño selectiva, basada en el tamaño molecular y/o su configuración de proteínas.
- La barrera de carga selectiva, basada en la densidad de carga molecular (3).

Todos estos mecanismos que permiten el paso de moléculas considerando el tamaño, deformabilidad de la carga eléctrica y la configuración molecular, así como la hemodinámica glomerular (13).

En el SN estos mecanismos están alterados dando como

resultado la proteinuria.

1.5 ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEINAS CIRCULANTES EN EL SN.

Las proteínas circulantes tienen diferentes funciones fisiológicas dentro del organismo y que de acuerdo con el papel específico de cada proteína tienen ciertos niveles de concentración en plasma, las alteraciones en la concentración de cada proteína puede indicar diferentes condiciones patológicas.

En el SN existen algunas proteínas involucradas, mismas que por sus características como la referente a su carga eléctrica y su movilidad electroforética, han hecho posible su determinación; sin embargo, se han realizado pocos estudios para dilucidar el mecanismo exacto de las proteínas plasmáticas individuales en la enfermedad de SN.

La concentración en el suero de algunas proteínas en la nefrosis experimental y humana se encuentra alterada debido a que existen grandes cambios en el metabolismo de proteínas plasmáticas (3,16).

La concentración de varias proteínas en suero ha sido medida en SN y se ha demostrado que, a pesar de una marcada hipoproteinemia, la concentración en suero de algunas proteínas no cambia y que la de otras aumenta (2,4).

Los niveles varían de acuerdo con la magnitud de la

enfermedad, se ha visto que las proteínas totales disminuyen en suero durante la máxima proteinuria (entre los días 10 y 12), por lo que se ha propuesto que existe relación entre la pérdida de proteínas en suero y su incremento en orina en esta enfermedad (3).

La disminución en la concentración de una proteína circulante puede ser consecuencia de una reducción en su síntesis, del incremento en su catabolismo, de la excreción urinaria o una combinación de estos factores (4), o por el contrario el incremento en la concentración de proteína circulante en el SN puede ser consecuencia de un aumento en la síntesis y/o una disminución de su catabolismo, sin embargo, las proteínas tales como la albúmina, glicoproteína ácida alfa-1 y transferrina no tienen la capacidad de incrementar su síntesis para llegar a balancear su pérdida urinaria y/o incrementar su degradación (4).

Algunos estudios de análisis electroforéticos de proteínas séricas en pacientes y animales con SN donde demuestran que la albúmina y las globulinas gamma están disminuidas, mientras que en ratas con SN se describe una disminución en los niveles séricos de globulina alfa-2 y un aumento para la globulina alfa-1 (20,23).

El patrón electroforético de las proteínas de la orina en pacientes con SN es muy similar cualitativamente al de suero normal pero con grandes diferencias cuantitativas (18).

Los niveles séricos de inmunoglobulina G (IgG) están disminuidos en los pacientes con SN y esto se debe a que la IgG se pierde en grandes cantidades ya que aumenta su

catabolismo. Cuando los pacientes con SN entran en la etapa de remisión, los niveles de IgG tienden a regresar a valores normales mientras que los de la inmunoglobulina M (IgM) se mantienen elevados durante varios años después. La deficiencia de la IgG junto con la reducción en la inmunidad celular en estos pacientes trae como consecuencia un incremento en la incidencia de infecciones. También los niveles de la IgM e inmunoglobulina E (IgE) están aumentados y los de la Inmunoglobulina (IgA) están reducidos (21).

Otras proteínas de transporte cuya concentración está disminuida y/o se pierden en la orina en pacientes con SN son la transcortina, proteína que une Zinc, globulina que une tiroxina y proteína que une vitamina D (21).

Se ha descrito que la disminución de la glicoproteína ácida alfa-1 (GPA) puede deteriorar la activación de la lipasa de lipoproteínas ya que contiene un cofactor para reacción de esta enzima, esto junto con la pérdida urinaria de la lecitina colesterol acil transferasa puede contribuir a alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas en el SN (21).

En el SN existen alteraciones como la hiperlipidemia y la hipercolesterolemia; en etapas tempranas del SN se incrementan las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de intermedia densidad (IDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La hiperlipidemia en el SN es debida a una sobreproducción hepática de lipoproteínas plasmáticas las que son muy grandes para ser eliminadas en la orina; este estudio se ha descrito en hígado perfundido aislado (16).

Por otra parte, en otros estudios demuestran una reducción en la actividad de algunas enzimas (19,20), estas observaciones se han tomado en cuenta, al realizar estudios para observar la actividad de enzimas séricas en el SN inducido con ANP donde se define que la actividad de cada enzima durante la nefrosis experimental es regulada específicamente, dado que los mecanismos de síntesis y degradación son diferentes para cada proteína (21).

II ANTECEDENTES DIRECTOS

El modelo de nefrosis experimental y la nefrosis humana se caracterizan por profundos cambios en los niveles y en el metabolismo de las proteínas plasmáticas (4,15,19,29,30). Por otra parte, el patrón electroforético de proteínas en suero está claramente alterado (23,24,37,38).

Se han establecido diferencias en el patrón electroforético de proteínas séricas en la nefrosis experimental y nefrosis humana.

En la nefrosis humana se ha observado que las fracciones alfa-2 y beta globulinas se incrementan en suero y la fracción alfa-1 no se altera (11,36,37). En la nefrosis experimental en ratas tratadas con ANP se ha encontrado que las fracciones globulina alfa-1 aumenta (23,38) y la globulina gamma descienden en suero (23) y las fracciones de globulinas alfa-2 y beta no cambian (23) o se incrementan (24). Sin embargo, estos dos trabajos (23,24) en la nefrosis experimental los resultados sobre el patrón electroforético de proteínas séricas no son consistentes. En ambos estudios existen diferencias en los niveles de las fracciones de globulinas alfa-2 y beta (23,24).

En ratas con SN inducido con ANP se ha visto que en suero aumenta la proteína alfa-1 macroglobulina y aparece la proteína alfa-2 macroglobulina que es considerada una proteína de fase aguda ya que también se incrementa en la respuesta

inflamatoria en el modelo en ratas con respuesta de fase aguda inducido con turpentina (38).

Esto ha conducido a postular que en ratas nefroticas inducidas con ANP ocurre un cambio similar en las proteínas de fase aguda al observado en enfermedades inflamatorias como el caso de ratas con absceso provocado por turpentina(38). En estas ratas con respuesta inflamatoria se ha observado que la albúmina, las globulinas alfa-1 y gamma descienden, y que las globulinas alfa-2 y beta aumentan (39,40).

Por otro lado se ha visto que la proteína glucoproteína ácida alfa-1 incrementa sus niveles en circulación durante la respuesta de fase aguda y decrece en ratas nefróticas (38). Ya que no se ha descrito el cambio secuencial de los niveles de las fracciones de proteínas séricas y urinarias durante todo el periodo del SN dentro del modelo agudo, no se tiene un patrón de electroforésis de proteínas definido para el SN que muestre el cambio paulatino en estos perfiles. De tal manera se ha realizado en este estudio un análisis electroforético secuencial de los cambios en los niveles de fracciones de proteínas (albúmina, globulinas alfa-1, alfa-2, beta y gamma) tanto en suero como en orina de ratas con SN inducidas con ANP durante todo el periodo de la nefrosis, para determinar si el patrón electroforético de ratas con SN inducido con ANP es similar a los patrones de perfiles electroforéticos de proteínas reportados en humanos y en ratas con respuesta de fase aguda.

III OBJETIVOS

Analizar los cambios secuenciales en los perfiles de fracciones electroforéticas de proteínas en suero y orina en ratas con SN inducido con ANP.

Determinar si el patrón electroforético de ratas con SN inducido con ANP es similar o no a los perfiles electroforéticos de proteínas previamente reportados para la nefrosis humana y para las ratas con respuesta de fase aguda inducida con turpentina.

IV MATERIAL Y METODOS

IV.1 REACTIVOS:

Se usaron los siguientes reactivos:

Carbonato de sodio, hidróxido de sodio, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre, ácido tricloroacético, metanol absoluto, ácido acético glacial (J.T. Baker de México).

Aminonucleósido de puromicina (6 dimetilamino-9-(3 amino-3-desoxi-D-beta-ribofuranosil) purina), reactivo de folín-fenol, albúmina sérica de bovino, ácido tricloroacético (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo).

Amortiguador HR (tris barbital-sodio barbital), solución rojo Ponceau-S (solución acuosa sulfosalicílico y ácido tricloroacético) de Helena Laboratories Texas, USA.

IV.2 EQUIPO:

En este estudio se uso el siguiente equipo:

- Decapitador para animales pequeños de Harvard Co. (catálogo 35-0012).

- Jaulas metabólicas de fabricación nacional para recolectar orina de rata libre de heces, que constan de una malla metálica (que permite el paso de la orina y retiene las heces), un cono colector para que escurra la orina hacia un recipiente, comederos y bebederos.

- Balanza granataria Ohaus 700 (capacidad 2610 g).
- Gradillas de acrílico.
- Centrifuga refrigerada Damon/IEC División modelo PR-6000.
- Vortex de Scientific Products SB 200.
- Congelador Revco (-80 ° C).
- Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II.
- Balanza analítica Mettler tipo H-15.
- Papel filtro Whatman No. 42 sw 11 cm de diámetro.
- Agitador magnético Corning PC-353.
- Cámara de electroforesis y accesorios (Helena Laboratories, Texas USA).
- Densitómetro (Hoefer Scientific Instrument) GS-300-115 V San Francisco, Cal, USA.
- Fuente de poder PS 1500 (Hoefer Scientific Instrument).
- Graficador (Kipp-Zonen Holland) tipo III.

IV.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se usaron 100 ratas macho de la cepa Wistar de un peso corporal de 180-310 g.

Las ratas se dividieron en 2 grupos: control y experimental. A las ratas del grupo control (n=10) se les administró solución salina estéril, y al grupo experimental (n=90) se le administró ANP en solución al 2% a una dosis de 15 mg/100 g para inducir el SN. Las ratas se alimentaron ad libitum, tuvieron libre acceso al agua y permanecieron en jaulas metabólicas para la recolección de la orina de 24 h hasta el día de su sacrificio.

Las ratas del grupo experimental se sacrificaron secuencialmente por decapitación (n=10 cada día), los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 30 después de la inyección de ANP. La sangre se recolectó en tubos de plástico y después de la retracción del coágulo se centrifugaron a 2000 rpm por 20 min para posteriormente separar el suero.

Las muestras de suero y orina se guardaron congeladas en alícuotas 1 ml hasta la realización de la electroforésis de proteínas y la determinación de proteínas totales.

IV.6 METODOS ANALITICOS

IV.6.1 DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN SUERO.

La determinación de proteínas totales en suero de rata se realizó por el método colorimétrico de Lowry et. al. modificado por Hartree. (26).

Reactivos:

Solución A: Carbonato de sodio al 2%.

Hidróxido de sodio al 0.4%

Tartrato de sodio y potasio al 0.2%

Solución B: Sulfato de cobre al 0.5%

Solución C: 50 ml de solución A + 1 ml de solución B.

Solución D: Folin 1 N. Se prepara a partir de una solución 2N

Solución E: Solución patrón de Albúmina sérica de bovino 0.05%
1 mg/ml.

Procedimiento:

Elaborar una curva estándar de 5 a 50 ug en un volumen final de 200 ul de ASB al 0.05%.

a) Colocar la muestra ó la albúmina patrón en un volumen final de 0.2 ml a cada tubo.

b) Agregar a cada tubo 1 ml de solución C, dejando reposar 10 min.

c) Adicionar 100 ul de la solución D agitando continuamente y se dejó transcurrir 30 min, al final de los cuales se determinó la D O a 660 nm.

IV.6.2 DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN ORINA.

La determinación de la concentración de proteínas totales en orina de 24 h, se realizó con el método anteriormente descrito, después de precipitarlas con ácido tricloroacético y resuspenderlas en hidróxido de sodio.

Reactivos:

- Acido tricloroacético al 10%.
- 0.1 ml de orina de 24 h.
- Hidróxido de Sodio al 0.5 M.

Procedimiento:

Precipitar 0.1 ml de orina con 1 ml de ácido tricloroacético al 10 %.

Centrifugar a 2000 rpm por 10 min.

El precipitado lavar 2 ó 3 veces con ácido tricloroacético al 10%, se resuspendió el precipitado en hidróxido de sodio.

Se usaron 200 ul de diferentes diluciones 1:200 o 1:100.

Por último medir la concentración de proteínas totales por el mismo método que para suero (pasos a,b,c,d).

IV.6.3 ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA.

a) PRINCIPIO

Las proteínas están formadas por residuos de aminoácidos unidos covalentemente, pueden ser polares o no polares, es decir, tienen una carga eléctrica.

El movimiento de cada proteína a través de un campo eléctrico es llamado electroforesis. Las diferentes proteínas pueden ser separadas si tienen diferentes velocidades en un campo eléctrico, éste es aplicado en una solución (amortiguador) situado en los electrodos de carga opuesta a la de las proteínas. Así cada proteína se mueve hacia el electrodo contrario a su carga eléctrica; dependiendo el amortiguador usado, será la velocidad para cada proteína, además del tipo de matriz usado de soporte para la electroforesis.

Para las proteínas el pH generalmente usado es el rango de 7-9; las soluciones amortiguadoras mantienen este pH y así la carga neta de las proteínas en el proceso de la electroforesis.

El soporte utilizado en esta técnica es el acetato de celulosa, en el que la carga neta de las proteínas es la responsable casi exclusivamente de la separación de las proteínas.

En esta técnica las proteínas que se encuentran en el suero y orina, se fraccionan y se separan de acuerdo a su carga eléctrica y a un particular pH (8.6-8.9) en las siguientes

fracciones de proteína: Albúmina, proteína con carga eléctrica negativa, es la que más distancia recorre en el gel hacia el ánodo y es la más prominente en suero; posteriormente las fracciones ALFA-1, ALFA-2, BETA y GAMMA globulinas .

Estas 5 fracciones de proteína tiene diferente movilidad electroforética, y en cada fracción se encuentran agrupadas otras proteínas (18).

La separación a través del uso del gel acetato de celulosa hace posible realizar mucho más rápido el análisis usando volúmenes de muestra pequeños.

La determinación de estas fracciones de proteína se realiza para obtener su concentración y cuando sus niveles se encuentran alterados pueden indicar diferentes estados patológicos (15).

b) METODOLOGIA.

La determinación y separación de proteínas séricas y urinarias se realizó en placas de acetato de celulosa de 60 x 76 mm (TITAN III).

Preparación de reactivos:

- Amortiguador "HR". Se disuelve 1 sobre de (Tris Barbitol-Sodio Barbitol) en 1 litro de agua destilada a pH 8.6-8.9 y se guarda en refrigeración hasta su uso.
- Solución para desteñir. Se prepara 1 l de ácido acético al 5% en agua destilada.
- Solución aclaradora. Se preparan 100 ml de ácido acético glacial y metanol en una proporción 1:4 (para uso diario y desechando el sobrante en cada uso).
- Solución colorante de Rojo Ponceau-S. Un volumen de 300 ml de Solución al 0.5 % de Ponceau-S en una solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3.5 % y de ácido tricloroacético al 3.5 %.

Procedimiento:

1) Hidratación de las membranas de acetato de celulosa: Se depositaron 500 ml de amortiguador HR en un recipiente y se tomaron las placas TITAN III, previamente marcadas con lápiz duro en el ángulo superior derecho del lado duro o plástico.

Las membranas se colocaron en una gradilla porta-placas la

cual se sumergió lentamente en el amortiguador, para que no se formaran burbujas. El tiempo mínimo para que las placas se humedecieran fué de 20 minutos y el máximo de 8 horas (Figura 2a), en este estudio se hidrataron las placas un tiempo de 30 minutos.

2) Preparación de la cámara de electroforesis: Se colocó un mínimo de 100 ml de amortiguador HR en cada uno de los compartimientos externos de la cámara, con este amortiguador y se colocaron 2 tiras de papel filtro a lo largo de los puentes de la cámara, con estas tiras se estableció un contacto entre el amortiguador y las membranas de acetato de celulosa. La cámara de quedó cerrada hasta que el amortiguador tomara una temperatura ambiente (Figura 2b).

3) Colocación de las muestras; con un sistema de aplicación de muestras (Super Z), formado por 2 bases tomamuestras con 8 pozos marcados cada uno, una base de alineación y el aplicador super Z. Se depositaron 10 ul de cada una de las muestras en cada pozo de la base tomamuestra; se taparon con un cubreobjetos para evitar su evaporación (Figura 2c).

4) Se sacaron las membranas de gel acetato de celulosa del amortiguador y se secaron uniformemente con papel filtro. Inmediatamente después se colocó una de las placas en una base de alineación con el lado del gel hacia arriba de tal manera que la marca de la placa quedara hacia marca de orientación del cátodo y del lado izquierdo superior en donde se colocó la muestra número 1 (Figura 2d).

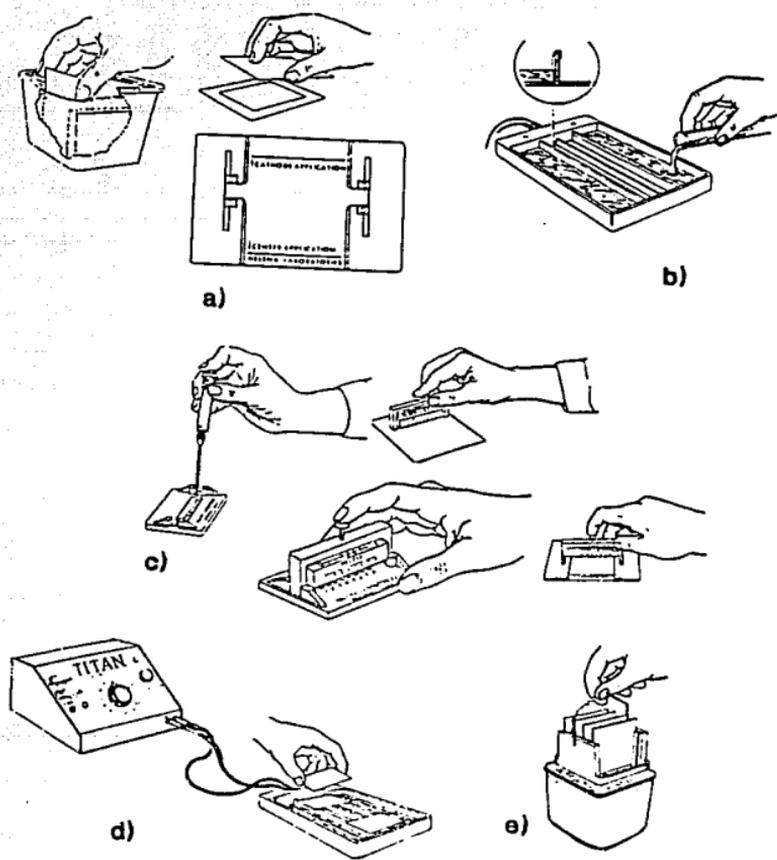


FIGURA 2). Procedimiento de electroforesis. a) Humedecimiento de membranas de acetato de celulosa, b) Preparación de la cámara de electroforesis, c) colocación y aplicación de las muestras, d) tinción y corrimiento de las muestras y e) aclaración de las membranas.

5) Preparación del aplicador super Z: Se alineó el aplicador en la base tomamuestras y se sumergieron los dientecillos 2 veces en las muestras, la primera carga se depositó sobre un papel absorbente limpio para verificar si los dientecillos funcionaban correctamente. Nuevamente se cargó el aplicador y se colocó sobre la membrana aplicando las muestras una sola vez haciendo presión uniforme y manteniendola por 10 segundos (Figura 2d).

6) Se quitó el aplicador de la membrana y esta se sacó cuidadosamente y se colocó en la cámara de electroforesis con el plástico hacia arriba, orientado el lado de la aplicación de las muestras hacia el catodo de la cámara. Se colocó un portaobjetos sobre la membrana para asegurar que ésta hiciera contacto con el papel filtro en los electrodos (Figura 2d), la cámara se adaptó a una fuente de voltaje y se realizó la electroforesis a 200 V y corriente constante durante 25 minutos para muestras de suero y 30 minutos para muestras de orina.

7) Una vez terminado este tiempo, las membranas se pusieron a teñir durante 3 minutos en rojo de Ponceau-S, se sacaron del colorante, el exceso que no se fijó a las proteínas se eliminó en un primer lavado con ácido acético al 5 % durante 4 minutos, con agitación ocasional y cuidadosa. Se paso a otros 2 lavados de 4 minutos cada uno en ácido acético al 5%.

8) Las membranas se deshidrataron en 2 lavados sucesivos de metanol absoluto en un tiempo de 10 minutos por baño. Se

pasaron a un baño final de una mezcla de solución aclaradora de metanol-ácido acético por 5 minutos.

9) Las membranas se secaron en un horno a una temperatura de 50 a 60°C por un tiempo de 3 minutos. Inmediatamente después se hizo el trazo densitométrico.

10) Una vez terminada la electroforesis de las muestras en suero y orina de ratas nefroticas tratadas con ANP y de muestras de ratas control, se identificaron cada una de las bandas de cada muestra en la membrana de acetato de celulosa, comparandolas con los picos de las curvas en los trazos densitométricos de cada una de las 5 fracciones de proteína correspondientes.

c) DENSITOMETRÍA DE LAS ELECTROFORESIS

Una vez terminada la electroforesis las placas se montaron en un densitómetro (Hoefer Scientific Instruments). El aparato se calibró a cero en la posición de transmitancia. El densitómetro se conectó a un registrador gráfico el cual también se calibró a cero. Se hizo la densitometría empleando una sensibilidad de registro de 0.5 V con una ganancia de 70 y una velocidad del papel de 10 mm/seg.

Se obtuvieron los trazos densitométricos de cada una de las muestras de suero y de orina durante los días del estudio secuencial.

En el papel graficador se obtuvieron curvas donde cada pico

representó una de las cinco fracciones diferentes de proteínas (Albumina, Alfa-1, Alfa-2, beta y Gamma), mismas que se identificaron a través de un patrón de trazo densitométrico de referencia para electroforesis en acetato de celulosa anexo en el manual de la técnica de electroforesis de proteínas en gel (Figura 3).

Del trazo densitométrico se obtuvo la concentración de cada muestra de las 5 fracciones de proteína diferentes en una muestra, esto se hizo a través de una cuantificación indirecta, pesando el papel del área bajo cada una de las fracciones, esto es, tomando en cuenta el peso de todas las fracciones y el peso de cada una de ellas, se calculó el porcentaje respectivo. Con este dato y con el de la concentración total de proteína se obtuvo la concentración de proteína de cada una de las fracciones.

IV.6.4 ANALISIS ESTADISTICOS

Los datos de las gráficas están expresados como la media \pm el error estándar. Las comparaciones contra el control se hicieron por medio de comparaciones por comparaciones múltiples de acuerdo al método de Dunnet (28).

Un valor de $P \leq$ de 0.05 se consideró significativo.

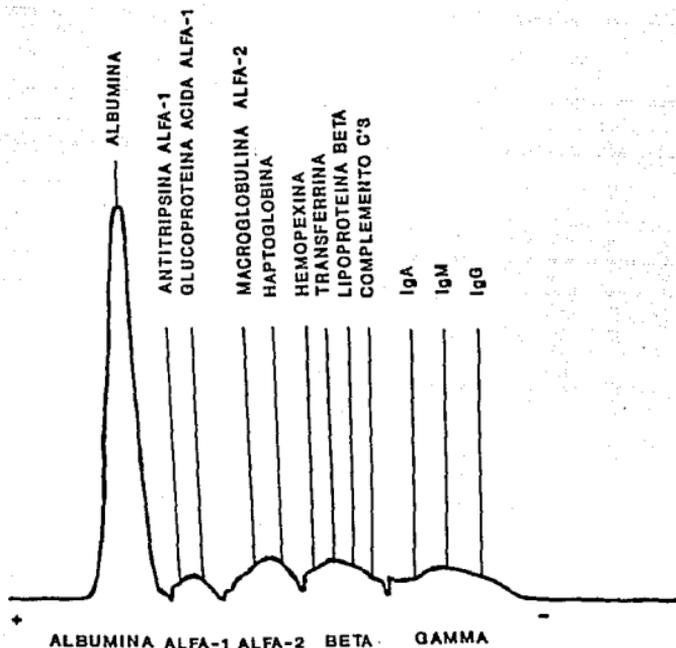


FIGURA 3). Patrón de localización de proteínas en suero. Cada pico de la curva representa la movilidad electroforética de cada fracción de proteína (albúmina, globulinas alfa-1, alfa-2, beta y gamma) cada fracción agrupa diferentes proteínas.

V. RESULTADOS

V.1 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN SUERO

En la figura 4, se observan los cambios en cada una de las 5 fracciones electroforéticas durante todo el estudio secuencial, en las muestras de suero de ratas nefróticas inducidas con ANP y de ratas control.

Los días 8, 10 y 12 se después de la inyección única de ANP las fracciones albúmina, globulina beta y gamma se hacen menos aparentes con respecto a las correspondiente en la muestra control; la fracción globulinas alfa-1 en éstos días es la más ancha que en el control y la fracción globulina alfa-2 se mantiene cualitativamente similar a la correspondiente en la muestra control.

V.2 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIAS

En la figura 5, se observan las diferentes muestras de electroforesis de proteínas en orina del día 10 correspondiente a la máxima proteinuria, se presentaron las 5 fracciones electroforéticas en bandas más anchas.

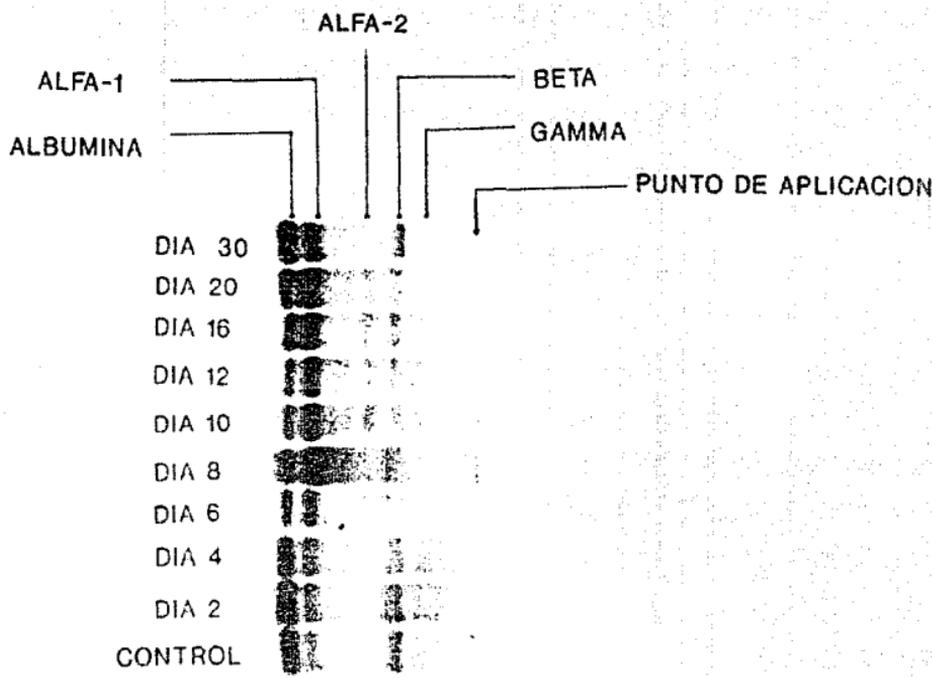


FIGURA 4). Electroforesis de proteínas en suero. Se observan las muestras que corresponden a cada uno de los días del estudio secuencial en ratas inducidas con ANP y ratas control (C). En cada muestra se definen 5 bandas correspondientes a cada una de las fracciones electroforeticas de proteína.

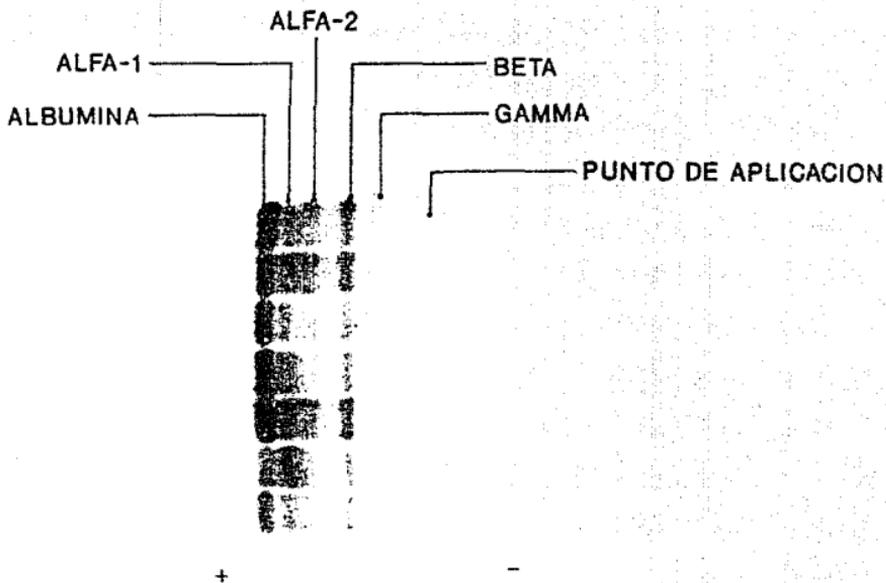


FIGURA 5). Electroforesis de proteínas urinarias. Se observan diferentes muestras del día 10 del estudio (máxima proteinuria) de ratas inducidas con ANP. En cada muestra se definen 5 bandas de cada una de las fracciones electroforéticas de proteína.

V.3 TRAZOS DENSITOMETRICOS DE LAS ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN SUERO.

En la figura 6, se obtuvieron los trazos densitométricos, donde cada curva representa las 5 fracciones de proteína de las diferentes muestras después de la inyección única de ANP, anteriores a la máxima proteinuria (día 10) y de ratas control; los picos de cada curva muestran la cantidad individual de cada fracción de proteína presente en suero; que cada fracción desciende con respecto a las fracciones de la muestra control; excepto el pico de la fracción alfa-1 continua siendo mayor que el correspondiente en la muestra control.

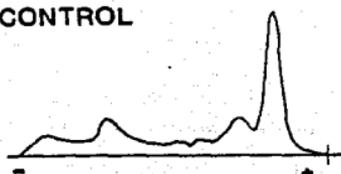
En la figura 7, se muestran los trazos densitométricos de fracciones de proteínas presentes en suero del día 10 al 30, de ratas nefróticas inducidas con ANP, las curvas del trazo del día 10 corresponden a una marcada hipoproteïnemia, a partir del cual se observa una tendencia a recuperar los niveles de las fracciones de proteínas en las curvas de manera similar a la curva del trazo densitométrico de la muestra control.

V.4 TRAZO DENSITOMETRICO DE LAS ELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIAS.

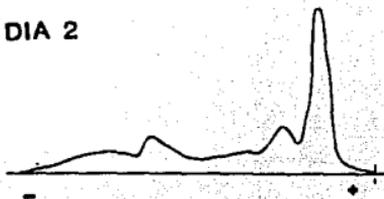
En la figura 8, se muestra el trazo densitométrico de una sola muestra de orina representativa del día 10 donde se observan claramente las 5 fracciones de proteínas que

SUEROS

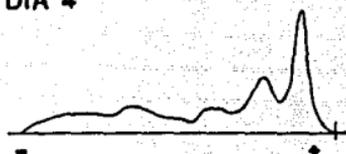
CONTROL



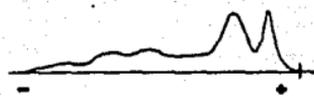
DIA 2



DIA 4



DIA 6



DIA 8

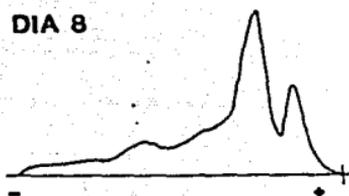


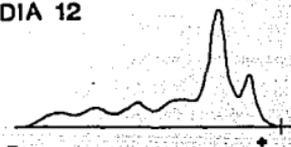
FIGURA 6). Trazos densitométricos de las electroforesis de suero de ratas nefróticas sacrificadas en diferentes días. Cada gráfica representa una sólo rata. Del día 2 al 8 son previos a la máxima proteinuria.

SUEROS

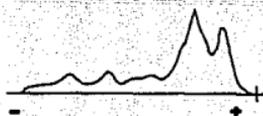
DIA 10



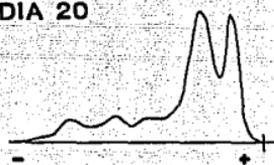
DIA 12



DIA 16



DIA 20



DIA 30

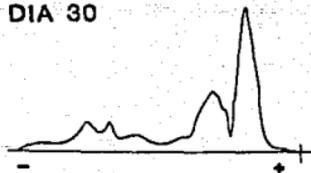


FIGURA 7). Trazos densitométricos de las electroforesis en suero. El día 10 representa la máxima proteinuria, los días 12 al 30 son posteriores a la miama.

ORINA

DIA 10

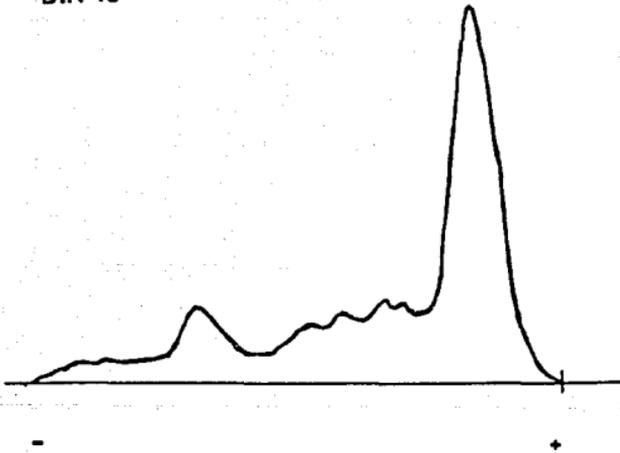


FIGURA 8). Trazo densitométrico de la electroforésis de - proteínas en orina de ratas inducidas con ANP del día 10.

corresponden a la máxima proteinuria.

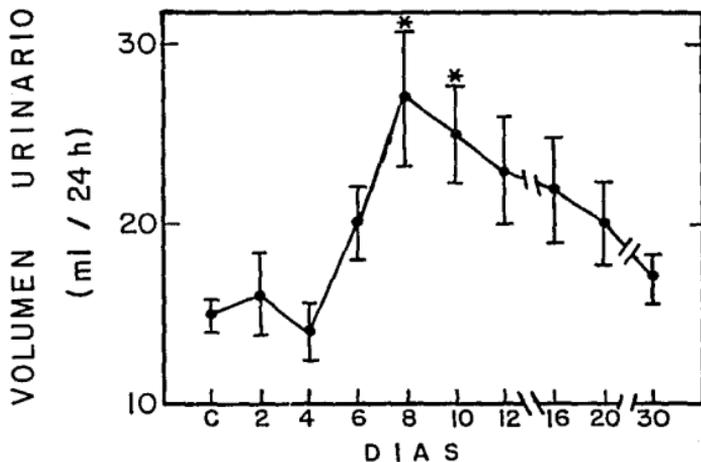
V.5 VOLUMEN URINARIO.

En la gráfica 1, se muestra el volumen urinario de 24 h, que aumenta significativamente los días 8 y 10 con un valor de 27 ± 13 ml y 25 ± 8.6 ml h respectivamente, para regresar lentamente a valores cercanos al control (15 ± 3 ml) el día 30.

V.6 PROTEINAS TOTALES.

En la gráfica 2a), se muestran los cambios en la concentración de proteínas totales en suero durante todo el estudio. En el suero de ratas controles fue de 7.3 ± 0.2 g/dl, disminuyó notoriamente hasta alcanzar el valor más bajo el día 6 con 3.9 ± 0.2 g/dl, y posteriormente aumentó a valores normales en el día 20.

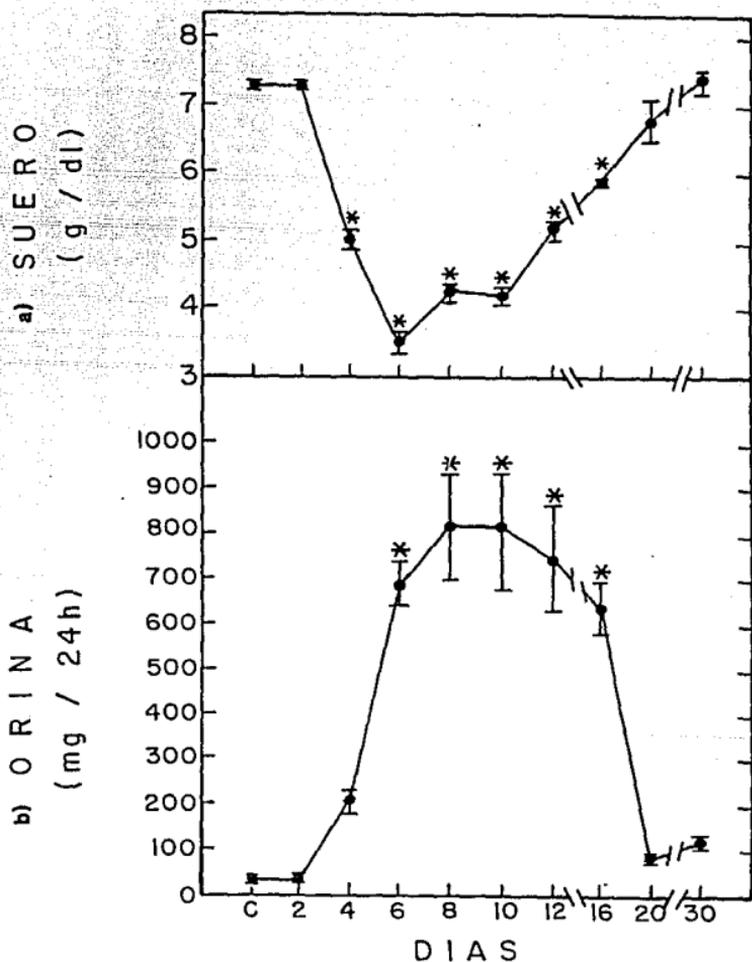
La excreción urinaria de proteínas totales (gráfica 2b), aumentó significativamente de 37 ± 3.5 mg/24h en el control a 210 ± 23.4 mg/24 h en el día 4, alcanza valores máximos los días 8 y 10 (de 820 ± 125 y 810 ± 138.3 mg/24 h respectivamente) y disminuye a valores cercanos a los normales en el día 30 (120 ± 16.4 mg/24h).



GRAFICA 1). Volumen urinario de 24 horas, de ratas inducidas con ANP en diferentes días del estudio y ratas control (C).

* $P \leq 0.05$.

PROTEINAS TOTALES



GRAFICA 2). a) Determinación de proteínas totales en suero y b) en orina de ratas inducidas con ANP y ratas control (C).
* $p \leq 0.05$.

V.7 FRACCION ALBUMINA.

Los perfiles de albúmina sérica se muestran en la gráfica 3a). En el grupo control fué de 3.11 ± 0.1 g/dl, se observó una hipoalbuminemia significativa desde el día 4, siendo más notoria en los días 8 y 10 con concentraciones de 0.45 ± 0.06 y 0.59 ± 0.07 g/dl respectivamente, incrementandose después a valores normales el día 20.

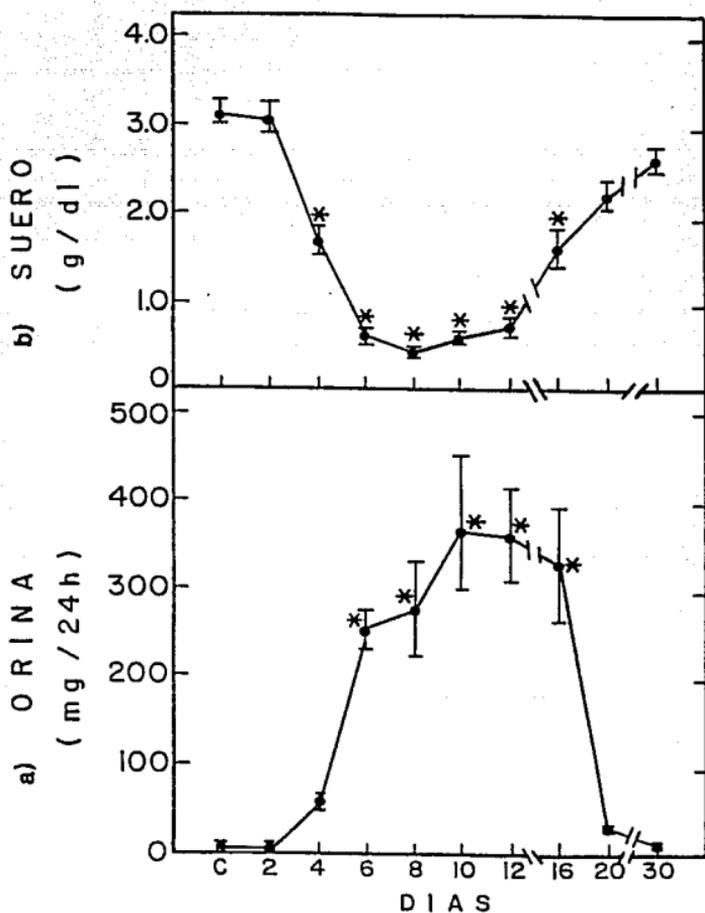
La excreción urinaria de albúmina (gráfica 3b) aumenta desde el día 4 (59 ± 7.37 mg/24 h), alcanzó su valor máximo de 364 ± 94.33 mg/24 h en el día 10 y regresó a valores no diferentes de los normales el día 20.

V.8 FRACCION GLOBULINA ALFA - 1.

La concentración de esta fracción disminuyó ligeramente en suero de 1.09 ± 0.05 g/dl en el grupo control, a 0.94 ± 0.04 g/dl en los días 2 y 4. Posteriormente aumentó constantemente hasta llegar a su máximo de 2.74 ± 0.15 g/dl en el día 12 a partir del cual disminuyó, pero se mantuvo significativamente alto al final del estudio respecto al control (gráfica 4a).

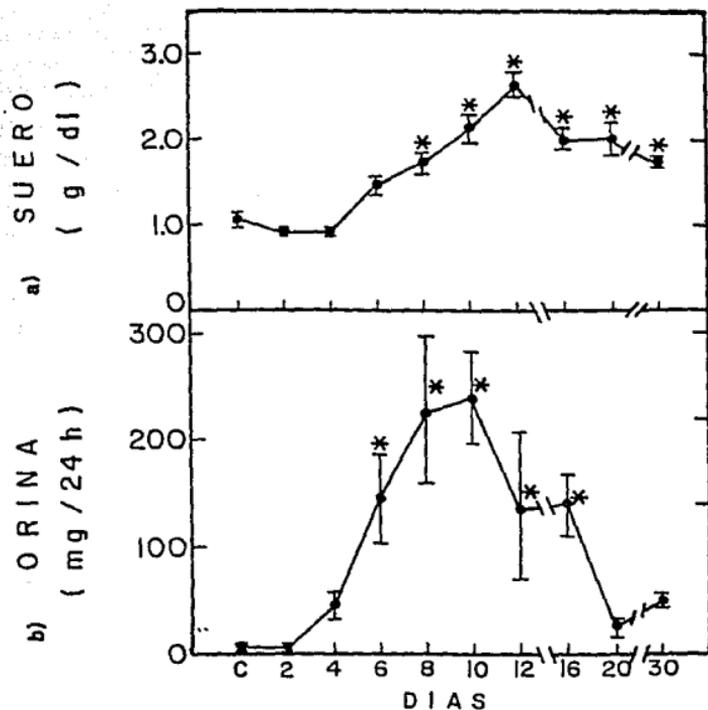
En la gráfica 4b), se observa que la excreción urinaria de la fracción alfa-1 aumentó a partir del día 4, alcanzó su máxima excreción en el día 10 (240 ± 42.1 mg/24 h) y paulatinamente disminuyó a valores cercanos a los normales con respecto a la excreción del grupo control de 7.3 ± 0.85 mg/24 h.

ALBUMINA



GRAFICA 3). Perfil de albúmina. a) suero y b) en orina, de ratas inducidas con ANP y ratas control (C).
 * $p \leq 0.05$.

FRACCION GLOBULINA ALFA-1



GRAFICA 4). Perfil de la fraccion globulina alfa-1. a) en suero y b) en orina de ratas inducidas con ANP y ratas control (C).
 • $p \leq 0.05$.

V.9 FRACCION GLOBULINA ALFA - 2.

La fracción globulina alfa-2 disminuyó significativamente en suero el día 6 (0.53 ± 0.04 g/dl); los días 2, 4, 10, 12, 16, 20 y 30 no cambiaron significativamente con respecto al grupo control (0.87 ± 0.06 g/dl) (Gráfica 5a).

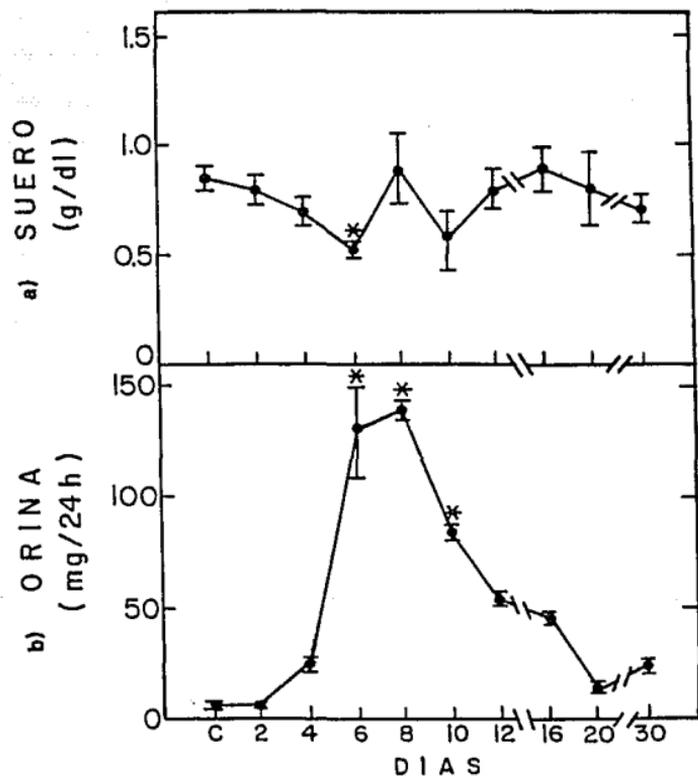
En orina la excreción de esta fracción fue significativa el día 6 con 131 ± 21.51 mg/vol. 24 h con respecto al control de 7.5 ± 1.22 mg/24 h; la máxima excreción fue de 142 ± 40.44 mg/24 h en el día 8 y disminuye lentamente a valores cercanos a los normales al final del estudio (Gráfica 5b).

V.10 FRACCION GLOBULINA - BETA.

Está presente en suero de ratas control en una concentración de 1.33 ± 0.11 g/dl. Después de la inyección de ANP su concentración disminuyó en forma significativa hasta un mínimo de 0.48 ± 0.03 g/dl en el día 10, y después se incrementó ligeramente para alcanzar valores normales con respecto al control el día 30 (Gráfica 6a).

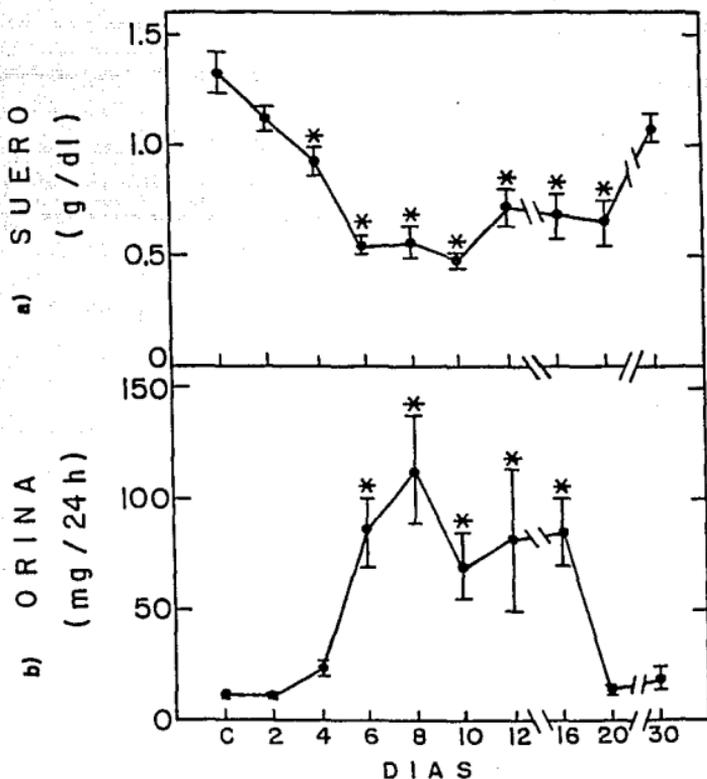
La excreción urinaria de la fracción globulina-beta aumenta de una concentración en los controles de 120 ± 0.45 mg/24 h a una excreción máxima en el día 8 de 114 ± 24.10 mg/24 h para regresar posteriormente a valores normales el día 20 (Gráfica 6b).

FRACCION GLOBULINA ALFA-2



GRAFICA 5). Perfil de la fracción globulina alfa-2. a) en suero y b) en orina de ratas inducidas con ANP y ratas control (C).
 * $p \leq 0.05$.

FRACCION GLOBULINA BETA



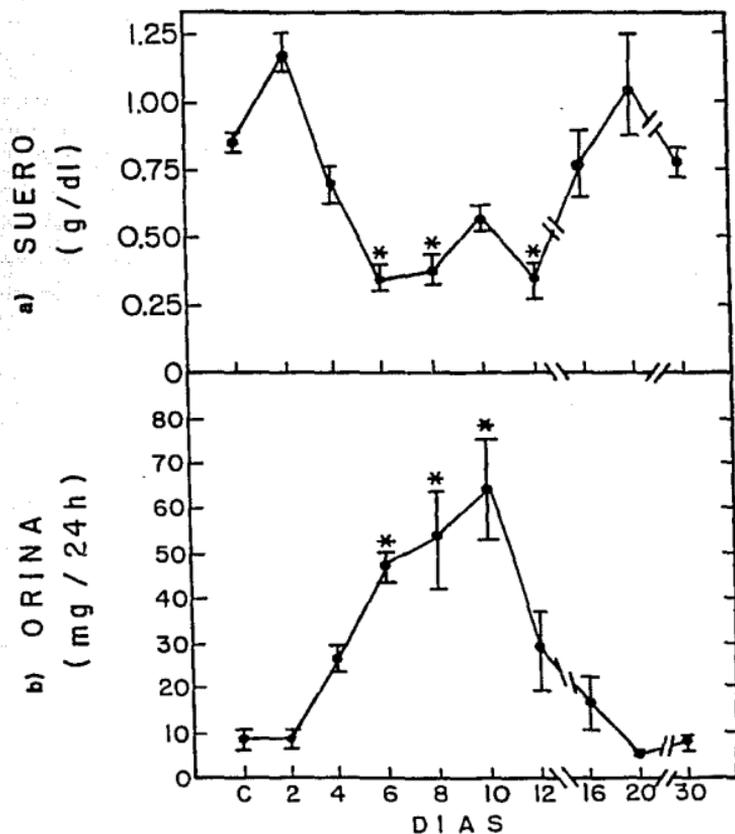
GRAFICA B). Perfil de la fracción globulina beta. a) en suero y b) en orina de ratas inducidas con ANP y ratas control (C).
 * $p \leq 0.05$.

V.11 FRACCION GLOBULINA - GAMMA.

La fracción globulina-gamma en suero aumentó en el día 2 a 1.19 ± 0.08 g/dl con respecto al valor en el grupo control de 0.85 ± 0.05 g/dl. Sin embargo, este aumento no fue significativamente diferente. El día 4 no fué diferente y los días 6, 8 y 12 disminuyó significativamente, para regresar nuevamente a valores normales el día 16 (Grafica 7a).

La excreción urinaria de esta fracción aumentó desde el día 4 alcanzó significancia estadística el día 6 y el día 10 llegó a su valor máximo (64 ± 11.42 mg/24 h). Regresó a valores normales en orina el día 12 (Gráfica 7b).

FRACCION GLOBULINA GAMMA



GRÁFICA 7). Perfil de la fracción globulina gamma. a) en suero y b) en orina de ratas inducidas con ANP y ratas control (C).

* $p \leq 0.05$.

VI. DISCUSION

La cuantificación de las diferentes fracciones electroforéticas de proteínas (albúmina, globulinas alfa-1, alfa-2, beta y gamma) mediante la técnica de electroforesis en gel de acetato de celulosa, muestra que existen cambios en la concentración de las fracciones de proteínas en suero y orina en ratas con SN inducido con ANP.

Se encontraron cambios en la concentración de proteínas totales en suero y orina, así como en cada una de las fracciones de proteína analizadas en este modelo de nefrosis, observando diferencias entre una fracción de proteína y otra.

Los resultados obtenidos sobre la pérdida en orina de todas las fracciones electroforéticas sugiere que esta pérdida no es selectiva, y hace evidente que existe una alteración morfológica en la BFG, de hecho se ha observado en estudios previos sobre la fusión de podocitos debidos a la destrucción de la arquitectura de las células epiteliales de la BFG en la nefrosis inducida por ANP.

Además el análisis electroforético secuencial mostró que para cada fracción de proteína hay una alteración máxima (día 8 al 12) en su concentración tanto en suero como en orina, obteniendo para cada una de las fracciones electroforéticas su concentración y su perfil conforme al tiempo transcurrido después de la inyección única de ANP, además dentro de este modelo agudo se observó que las ratas tienden a recuperarse de la nefrosis; ya que las proteínas totales en suero y orina

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

regresan a niveles basales siguiendo la remisión del SN; aunque la mayoría tiene el mismo patrón, cuantitativamente son diferentes, es decir varían en su concentración.

El perfil electroforético de proteínas en suero de ratas nefróticas inducidas con ANP muestra una clara alteración en la concentración de las fracciones de proteína donde la albúmina y globulinas beta y gamma disminuyen, aunque siguen el mismo perfil tienen diferencias cualitativas y cuantitativas, sin embargo regresan a sus niveles basales en los días 16-30. La fracción globulina alfa-1 aumenta permaneciendo elevada en suero hasta el final del estudio y la globulina alfa-2 cambia ligeramente; estos hallazgos sugieren que la concentración de las diferentes fracciones de proteína en suero de las ratas con SN se regula independientemente a pesar de que todas se pierden en orina.

En contraste, los perfiles de fracciones de proteína en orina se incrementan con un pico máximo los días 8 y 10; donde la globulina alfa-1 incrementa su concentración y también en suero.

La concentración de una proteína en suero es el resultado de un número de variables: síntesis, degradación, pérdida y/o cambios en el volumen plasmático.

La pérdida urinaria de albúmina y globulinas beta y gamma puede estar relacionada con el descenso de estas fracciones en suero. También se ha descrito en estas ratas nefróticas que la síntesis (11,16,27,29,41) y degradación (16) de la albúmina aumenta y que la degradación de la IgG se incrementa (30).

La fracción globulina alfa-1 aumenta en suero a pesar de su

Pérdida urinaria; esto sugiere que puede estar incrementada su síntesis ó disminuida su tasa de degradación de tal manera que alcance a compensar su pérdida urinaria.

Existen algunas proteínas que pueden contribuir a explicar los cambios que se observan en cada fracción de proteína para cada patrón reportado (nefrosis humana, nefrosis experimental y en ratas con respuesta de fase aguda).

Se ha visto que la proteína glicoproteína ácida alfa-1 incrementa sus niveles en circulación durante la respuesta de fase aguda en ratas (38) y decrece en ratas con SN (22,31), esta proteína sigue el mismo patrón que las fracciones globulina beta y gamma en el SN (descienden en suero y se incrementan en orina (31,32,33) (figura 9).

A diferencia de las ratas con SN, en la nefrosis humana las fracciones de proteínas globulinas alfa-2 y beta incrementan su concentración en suero (27,28,36,37). Las diferencias observadas en los niveles de fracciones globulinas alfa-1 y alfa-2 en nefrosis humana y ratas nefróticas tratadas con ANP se pueden deber al aumento de macroglobulina alfa-1 en suero de ratas nefróticas inducidas con ANP y al aumento de la macroglobulina alfa-2 (39) en la nefrosis humana (figura 9).

El descenso de la fracción globulina gamma en suero puede explicar la alta susceptibilidad a infecciones observadas durante el SN (16).

A diferencia de las ratas nefróticas, en las ratas con respuesta inflamatoria inducida con turpentina las fracciones globulina alfa-2 y beta aumentan (39).

FRACCION:	SNH	SNRANP		RFA
	(S)	(S)	(O)	(S)
ALBUMINA		↓	↑	↓
G. ALFA-1 <i>Macroglobulina alfa-1</i> <i>Glucoproteina ácida alfa-1</i>	no cambió	↑ ↑ ↓	↑	↓ ↑
G. ALFA-2 <i>Macroglobulina alfa-2</i>	↑ ↑	no cambió ↑	↑	↑ ↑
G. BETA	↑	↓	↑	↑
G. GAMMA	↓	↓	↑	↓

FIGURA 9. Patrones electroforéticos. Comparación entre los diferentes patrones electroforéticos de proteínas en SNH - (síndrome nefrótico humano), RFA (respuesta de fase aguda en ratas inducidas con turpentina) y SNRANP (síndrome nefrótico en ratas inducidas con ANP).

↑ aumento y ↓ disminución de una proteína.
(s) en suero (o) en orina.

Se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos de proteínas en suero en ratas nefróticas inducidas con ANP y los reportados para nefrosis humana y ratas con respuesta de fase aguda por turpentina (34,35,36) de tal manera que en ratas con SN inducido con ANP no ocurre una respuesta típica de fase aguda (figura 9).

VII CONCLUSIONES

El patrón electroforético de proteínas séricas y urinarias en ratas con síndrome nefrótico inducido con ANP está claramente alterado.

Todas las fracciones electroforéticas, de proteína se pierden en la orina de ratas con SN inducido con ANP, lo que indica que la proteinuria no es selectiva.

Las diferencias en los perfiles de las fracciones de proteína en suero, indica que estas son reguladas independientemente.

En las ratas con SN inducido con ANP no ocurre una respuesta de fase aguda típica.

VIII BIBLIOGRAFIA

1. Heymann W, Lund HZ. The nephrotic syndrome in rats. *Pediatrics* 1951;7:691-698.
2. Skorecki KL, Nadler SP, Badr KF, Brenner BM. Renal and systemic manifestations of glomerular disease. In: Brenner BM, Rector FC, eds. *The Kidney*. Philadelphia: WB Saunders, Co. 1986:891-928.
3. 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 edicion, Vol. II. Boston/Toronto: Little Brown, 1988:1949-2004.
4. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Activity of serum enzymes in puromycin aminonucleoside induced nephrotic syndrome. *Renal Failure*, en prensa.
5. Frenk S, Antonowics VM, Craig JM, Metcoff J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427,1955.
6. Marsh BJ, Drabkin DL. Metabolic channeling in experimental nephrosis. *Lipid metabolism*. *J Biol Chem*. 1955;212: 633-639, 1955.
7. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thous Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB. Adriamycin induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab. Invest*. 1982;46: 16-23.
8. Weening JJ, Rennke HG. Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney Int* 1983;24:152-159.
9. Morisaki N, Matsuola N, Saito Y, Kumagai A. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism* 1984;33: 405-410.
10. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J Lab Clin Med*.

1957;50:437-446.

11. Bernard DB: Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: Pathophysiology and complications. En: Brenner BM, Stein JH (eds); The nephrotic syndrome. Contemporary issues in nephrology, vol 9. New York, Churchill Livingstone, 1982, pp 85-119.

12. Chávez-Ponce MT. Caracterización del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome nefrótico experimental. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, pp. 21-27 1988.

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

14. Mohos SC, Skoza L. Histochemical demonstration and localization of sialoproteins in the glomerulus. Exp Mol Pathol. 1970;12:316-323.

15. Bernard DB: Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. Kidney Int 1988;33:1184-1202.

16. Mc Vicar M, Chandra, M. Pathogenic mechanisms in the nephrotic syndrome of childhood. Adv Pediatric 32: 269-286,1965.

17. Peter L, Miller and Timothy W. Meyer. Plasma. protein concentration and colloid osmotic pressure in nephrotic rats. Kidney Int. 1988;34:220-223.

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

19. Mainero A, Cruz C, y Pedraza-Chaverri J. Serum and urinary ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome. Clin Invest Med, en prensa.

20. Jerome P. Kassier, Jhon T Harrington. Diseases of the kidney. ed. RW Schrier, CW. Gottschalk CW. Little Brown, Boston. fourth edition. 393-429, 1988.

21. Ibarra R. ME. Niveles hepáticos del ARNm de diferentes

proteínas plasmáticas en el síndrome nefrótico experimental.
Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, 1990.

22. Glasscock RJ, Adler SG, Word H J, Cohen A H. Primary glomerular disease En: Brenner BM, Rector Fc, eds The kidney, Philadelphia: WB Saunders, 1986: 929-1013

23. Marsh JB, Sparks CE. Lipoprotein in experimental nephrosis: Plasma levels and composition. Metabolism. 1979;28:1040-1045.

24. Hoch-Ligeti C. Sequence of tissue, serum and urine changes in rats treated with aminonucleoside. Br J Exp Pathol 1960;41:119-129.

25. Ground J, Weening JJ, Elema JD. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Lab. Invest. 51: 277-285, 1984.

26. Lowry OA, Rosenbrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements whit the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-275.

27. Manual de electroforesis. Titan gel serum proteins system. Helena Laboratories. Cat. No. 3041. Beaumont, Texas USA.

28. Zar JH: Biostatistical Analysis. 2nd. ed New York: Prentice Hall, 1984.

29. Lewandowski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kent JD, Jefferson LS. Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. Am J Physiol 1988;254:634-C642.

30. Steines WJ, Mehl JW: The evaluation of alpha-2 macroglobulina and trypsin-binding activity in nephrosis. J Lab Clin Med 1966;67:559-566.

31. Pedraza-Chaverrí J, Huberman A. Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin-mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats. Nephron 1991;59:648-650.

32. Beam M, Oldfield S, MacIennan ICM, Michael J, Adu D: Hipogammaglobulinaemia in nephrotic rats attributable to

hypercatabolism of IgG. Clin Exp Immunol 1988;74:425-430.

33. Davies RW, Staprans I, Hutchison FN, Kaysen GA: Proteinuria, not altered albumin metabolism, affects hyperlipidemia in the nephrotic rat. J Clin Invest 1990;86:600-605.

34. 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-aldosterone system on sodium retention. Rev Invest Clin 1990;42:29-38.

35. 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 II. In vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. Rev Invest Clin 1990;42:120-126.

36. Longsworth LG, MacInnes DA: An electrophoretic study of nephrotic sera and urin. J Exp Med 1940;71:77-82.

37. Jensen, H: Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. Acta Med Scand 1967;182:465-473.

38. Housley J, Jones L, Harvey A: Serum alfa-macroglobulins in rat aminonucleoside nephrosis. Clin Chim Acta 1968;21:85-90.

39. Kushner I: The acute phase response: an overview, Methods Enzymol. 1988;163:373-383.

40. Weimer, HE, Benjamin DC: Immunochemical detection of an acute-phase protein in rat serum. Am J Physiol 1965;209:736-744.

41. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber, S.S. Regulation of albumin metabolism. Ann Rev Med 26:91, 1975.