

03068

2
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado

EL SISTEMA DE LA VITAMINA D EN RATAS CON
SINDROME NEFROTICO INDUCIDO CON
AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICINA.

T E S I S
Que para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
p r e s e n t a

ROSA ISABEL SIERRA AMOR

México, D. F. TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992



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

RESUMEN.	1
GENERALIDADES: Síndrome Nefrótico.	4
INTRODUCCION. Síntesis y Metabolismo de la vitamina D	6
a) Metabolismo de 25-hidroxivitamina D a 1,25-dihidroxivitamina D.	10
b) Mecanismo de acción de la vitamina D: Efecto biológico de 1,25(OH)2D en el intestino y en el hueso.	12
c) Regulación y metabolismo de la vitamina D: Efecto de hormona paratiroidea.	15
d) Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo.	17
ANTECEDENTES.	23
HIPOTESIS.	26
OBJETIVO.	27
MATERIAL Y METODOS: Animales y Diseño Experimental	28
Procedimientos Analíticos	30
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS.	39
DISCUSION.	69
CONCLUSIONES.	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	79

RESUMEN

El síndrome nefrótico (SN), caracterizado por franca proteinuria y edema presenta también alteraciones en el metabolismo de calcio, fósforo y la vitamina D que no han sido totalmente estudiadas.

En este trabajo se estudió dentro del metabolismo mineral: el sistema de la vitamina D, los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo y el impacto que estas alteraciones tienen sobre el esqueleto en ratas con SN inducido mediante una dosis única (15 mg/100 g) de aminonucleósido de puromicina (ANP).

Los animales del grupo control y con SN se colocaron en jaulas metabólicas durante los 29 días del estudio (3 días antes y 26 días después de la inyección de ANP o de vehículo). Se recolectó la orina de 24 horas y las ratas se sacrificaron secuencialmente los días 2, 6, 12 y 26 para obtener una muestra de sangre y los fémures correspondientes.

Se determinaron en suero las concentraciones de proteínas totales (PT), fósforo (P), creatinina (Cr), fosfatasa alcalina (FA), calcio total (Ca), calcio ionizado (Cai), osteocalcina (OC), el fragmento medio de hormona paratiroidea (PTH-MM) y los metabolitos de la vitamina D (25-hidroxivitamina D (25-OHD) y 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)2D]). En plasma, se determinó el adenosín-mono-fosfato cíclico (AMPC) y en orina se determinaron proteínas totales, calcio, fósforo, creatinina, hidroxiprolina y AMPC.

En los fémures se determinó por densitometría de doble fotón el contenido mineral total (BMC-T) y la densidad de la masa ósea total (BMD-T).

Posterior a la inyección, las ratas con SN desarrollaron franca proteinuria (día 14), hipoproteinemia (día 6), hidroxiprolinuria (día 14) e hipocalcemia (día 6), así como disminución de la actividad de fosfatasa alcalina (día 2), aumento de hormona paratiroidea (PTH) (días 6 y 12) y disminución del contenido mineral total (BMC-T) (días 2, 6, 12 y 26) y de la densidad de la masa ósea total (BMD-T) (días 2, 6 y 26).

El aumento en sangre de PTH los días 6 y 12 del padecimiento parece no estimular a su segundo mensajero el AMPc, el cual no se modifica en sangre ni aumenta su excreción en orina, lo que puede deberse en parte a un defecto de la unión hormona-receptor a nivel de la membrana basal en el túbulo renal.

Así mismo, hay un aumento de la excreción urinaria de hidroxiprolina (OHPr), indicador del metabolismo de la colágena ósea y por lo tanto de la desmineralización del hueso. Los niveles de osteocalcina (OC) aumentan el día 6 del padecimiento únicamente, efecto que puede deberse en parte a la disminución de la función renal que se presenta en el SN.

Por otro lado, la principal acción de PTH es mantener la homeostasis de Ca y P en equilibrio y la única vía para obtener Ca es a través del hueso, mecanismo que favorece la desmineralización y por lo tanto la degradación de la colágena ósea favoreciendo la

excreción de OHPr en la orina. El aumento de PTH a su vez estimula a la 1-alfa-25-hidroxilasa renal, enzima responsable de transformar 25-OHD en 1,25(OH)2D, cuya actividad biológica es favorecer la absorción intestinal de Ca. Sin embargo, este proceso no se observa debido a la disminución de 25-OHD en suero, metabolito precursor de 1,25(OH)2D.

Al día 26, la mayoría de las alteraciones fisiológicas desaparecen y regresan casi a sus niveles basales. Sin embargo, el efecto que estas alteraciones bioquímicas y metabólicas ejercen en el esqueleto resultan ser de gran trascendencia y probablemente no reversibles. Es por ello que la determinación de los marcadores bioquímicos del remodelamiento esquelético, así como del contenido mineral del esqueleto resultan ser un arma útil para identificar el deterioro metabólico y óseo que se presenta en este padecimiento.

GENERALIDADES

SINDROME NEFROTICO (SN): El SN experimentalmente se induce con el Aminonucleósido de Puromicina (ANP), cuyo nombre genérico es el 6-dimetil-aminopurina,3-amino-d-ribosa, el cual es una potente droga nefrotóxica. La Puromicina es un antibiótico que se obtiene a partir del "Actinomyces albonigers", compuesto del cual se deriva el aminonucleósido. Aparentemente es el grupo amino (NH₂) libre en el nucleósido, el que le confiere la potencia como agente nefrotóxico (Fiegelson, E.B. et al. 1957) (Fig. 1).

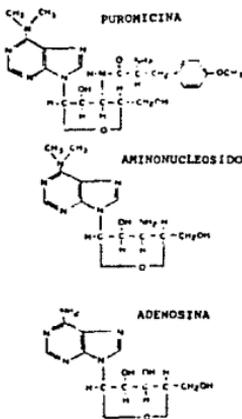


FIG. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA ADENOSINA, EL AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICICINA Y LA PUROMICINA.

El SN se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, edema e hiperlipidemia. Es común que una vez que las concentraciones de Albúmina (Alb) en el suero disminuyen (< 2 mg/dL), se presentan las demás alteraciones que caracterizan al SN. A partir del 60 día del padecimiento, hay dilatación de los túbulos proximal, distal y colector y, a partir del 90 día hay fusión de las células epiteliales con formación de vacuolas y aumento de las células endoteliales. Estos cambios favorecen el aumento de la permeabilidad de la membrana a las proteínas del suero y disminuyen su reabsorción por el túbulo. Conforme aumenta la proteinuria hay alteraciones semejantes a nivel de la mitocondria del túbulo proximal así como disminución de la densidad en el citoplasma (cambios hidrofóbicos) (Vernier, R.L. et al. 1959). Estudios de microscopía electrónica en las biopsias renales de los niños con SN revelan cambios similares en la estructura de las células epiteliales del glomérulo (Schnaper, H.W. et al. 1988).

La enfermedad que se presenta en las ratas es muy similar a la que ocurre en el hombre, por lo que el estudio del SN inducido con ANP nos permite conocer mejor las alteraciones que se presentan en este padecimiento, ocasionadas principalmente por la pérdida de proteínas por la orina, lo que origina un aumento de la excreción urinaria de metales, vitaminas, inmunoglobulinas, lípidos, proteínas transportadoras de hormonas, por citar algunas (Frenk, S. 1955).

I N T R O D U C C I O N

El sistema de la vitamina D está formado por una serie de compuestos derivados del colesterol (Fig. 2) los cuales al ser metabolizados en hígado y en riñón, producen 1,25-Dihidroxicalciferol, comúnmente conocida como 1,25-Dihidroxitamina D [1,25(OH)2D], único metabolito con actividad biológica.

La acción principal de 1,25(OH)2D es aumentar la absorción intestinal de calcio (Ca), favorecer la movilización de Ca del esqueleto e indirectamente aumentar la reabsorción de Ca por el riñón (Fig. 3) y de esa manera, mantener la homeostasis mineral (Hollick, M.F. 1984).

SINTESIS Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D: Una vez que el 7-dehidrocolesterol es transformado en pre-vitamina D (pre-vit. D) por efecto de la luz ultravioleta (290-315 nm) en la piel, se lleva a cabo el proceso de isomerización y se convierte en vitamina D (vit. D). En el hombre, este proceso ocurre durante los dos días posteriores al proceso de isomerización una vez que se adapta completamente a la temperatura del cuerpo (Hollick, M.F. et al. 1980). La vit. D así formada, es transportada a la circulación a través de la proteína acopladora a vitamina D (DBP) (Fig. 4) en las siguientes 3 o 4 horas, hasta llegar al hígado (Ponchon, G. y De Luca, H. 1969). Cada molécula de DBP tiene un sitio de unión específico para vitamina D y sus metabolitos: 25-OHD>24,25(OH)2D>25,26(OH)2D>1,25(OH)2D (Napoli, J.L. y Horst, R.L. 1984).

Sin embargo, DBP no parece ser la responsable de transportarla a los órganos blancos, ya sea para que sean metabolizados o para ejercer su acción biológica (Calston, K. et al. 1985).

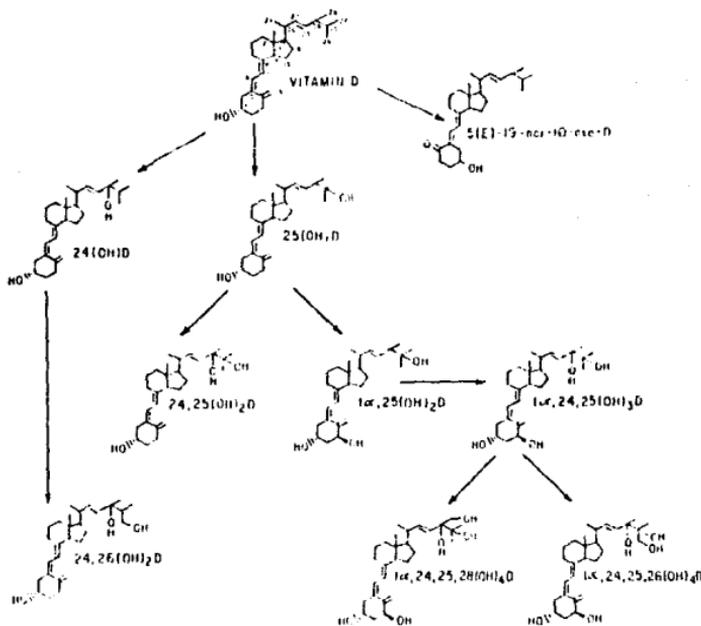


FIG. 2 VIAS METABOLICAS DE LA VITAMINA D (Hollick MF: Vitamina D: Importancia en la Medicina Clínica. Los Angeles, CA. Nichols Institute, 1981).

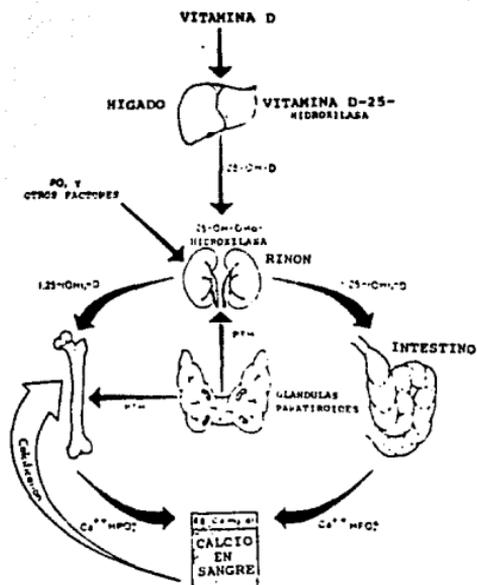


FIG. 3 CONTROL HORMONAL, METABOLISMO Y FUNCION DE LA VITAMINA D. (Hollick MF: Vitamina D: Importancia en la Medicina Clínica. Los Angeles, CA. Nichols Institute, 1981).

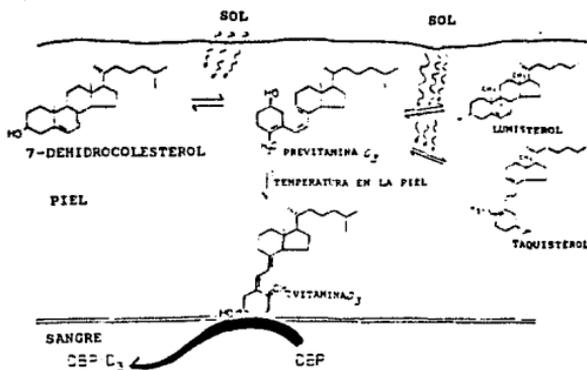


FIG. 4 FORMACION DE VITAMINA D EN LA PIEL DURANTE SU EXPOSICION AL SOL Y A LA ISOMERIZACION TERMICA DE PRE-VITAMINA D₃ A VITAMINA D₃, LA CUAL ES ACARREADA POR LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE VITAMINA D (DBP) A LA CIRCULACION (Hollick MF, MacLaghlin JA, Doppelt DH: Factores que influencian la fotosintesis de pre-vitamina D₃. Science 211: 590-593, 1981).

a) METABOLISMO DE 25-HIDROXIVITAMINA D A 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA D:

En el hombre como en los animales, el sitio principal (si no el único) del metabolismo de 25-OHD a 1,25(OH)2D, es el riñón. La enzima responsable de hidroxilar en posición 1 alfa, a 25-OHD, es la 1 alfa-25-hidroxilasa. Esta es una oxidasa citocromo P-450 mitocondrial que requiere de NADPH y oxígeno molecular para ser activada (Chazarian, J.G. et al. 1973; Suda, T y Kurokawa, K. 1983) (Fig 4A).

La 1 alfa-25-hidroxilasa se localiza en el túbulo contorneado y en la pars recta del túbulo proximal. La enzima localizada en el túbulo contorneado es exclusivamente estimulada por la hormona paratiroidea (PTH), mientras que la presente en la pars recta responde solamente a calcitonina (CT).

La 1,25(OH)2D es aproximadamente 10 veces mas potente que la vitamina D, en favorecer el transporte intestinal de Ca y su movilización del hueso. En la actualidad se considera que 1,25(OH)2D es la responsable de la acción biológica de vitamina D. La vida media de este metabolito en la circulación es de aproximadamente 6 horas.

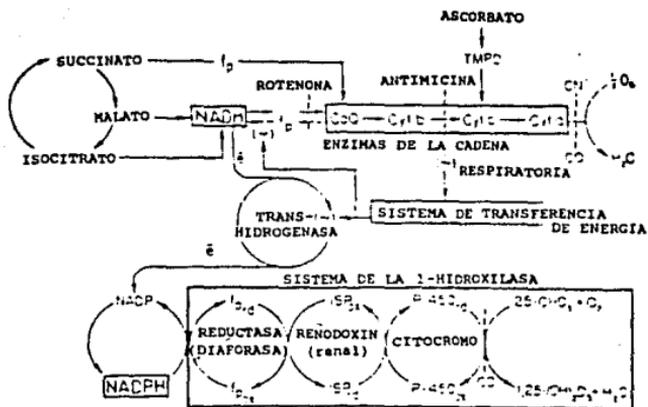


FIG. 4A PRODUCCION DE 1,25-DIHIPOXIVITAMINA D POR LA MITOCONDRIA RENAL DE POLLO (De Luca HF: Metabolismo, Fisiología y Función de la Vitamina D. En Kumar R (ed): Vitamina D: Aspectos Básicos y Clínicos. La Hague, Nijhoff, 1984, pg 1-68).

b) MECANISMO DE ACCION DE LA VITAMINA D: Efecto biológico de 1,25(OH)2D en el intestino y en el hueso: La vitamina D es una de las hormonas que se encargan de regular la homeostasis de Ca, así como de mantener el recambio esquelético e indirectamente favorecer la mineralización del osteoide. Aunque 1,25(OH)2D no parece tener una acción directa sobre la calcificación ósea, favorece la movilización de Ca del hueso, aumentando el número de osteoclastos y por consiguiente la actividad osteoclástica (Reynolds, J.J. et al. 1973; Haltrap, M.E. et al. 1981). La deficiencia de 1,25(OH)2D aumenta el tejido osteoide (matriz ósea no mineralizada), defecto conocido como raquitismo en los niños y osteomalacia en el adulto. Es evidente que hay receptores para 1,25(OH)2D presentes en los osteoblastos, pero no así en los osteoclastos, lo que permite pensar que las células blanco para el metabolito activo de la vitamina D son los osteoblastos.

Por otro lado, los osteoclastos son células multinucleadas con actividad ósea resorptiva, que se forman a partir de la diferenciación y fusión de los osteoclastos progenitores mononucleares derivados a su vez de las células hematopoyéticas. Cuando se administra 1,25(OH)2D a animales deficientes en vitamina D la resorción ósea osteoclástica aumenta, de igual manera el número de osteoclastos. Dos mecanismos diferentes inducen la resorción osteoclástica: la activación de los osteoclastos depositados y la formación de nuevos osteoclastos. Este proceso involucra liberación de enzimas lisosomales, cambio en el tamaño y

el área del núcleo y en la membrana limitofre; hay inhibición de la colágena ósea y el efecto es paralelo a la resorción a nivel del periostio (Stern, P.H. 1990).

A nivel intestinal, el papel principal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es favorecer la absorción de Ca en el intestino delgado, particularmente en el duodeno, suprimir la secreción de PTH posiblemente directa o indirectamente vía el aumento de la concentración de calcio en la circulación. De esa manera provee de suficiente calcio a la matriz ósea de nueva formación.

A nivel celular, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tiene acción directa sobre las concentraciones de Ca, facilitando el transporte y la absorción de este ión en la membrana basolateral renal.

Muchas otras proteínas parecen estar reguladas por la presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en las células óseas. Tal es el caso de la osteocalcina, proteína producida por los osteoblastos y que tiene un papel muy importante en el proceso de mineralización (Price, P.A. 1984; Zerveck, J.E. et al. 1985) (Fig. 5). Esta proteína contiene tres residuos de aminoácidos del ácido carboxiglutámico y representa el 3 % del total de la proteína ósea. Por otro lado, la disminución de uno o más de los metabolitos de la vitamina D origina un defecto en la absorción intestinal de Ca y por lo tanto un aumento en la producción de PTH, cuyo resultado es favorecer la desmineralización ósea para compensar la pérdida de este ion (Goldstein, D.A. et al. 1981).

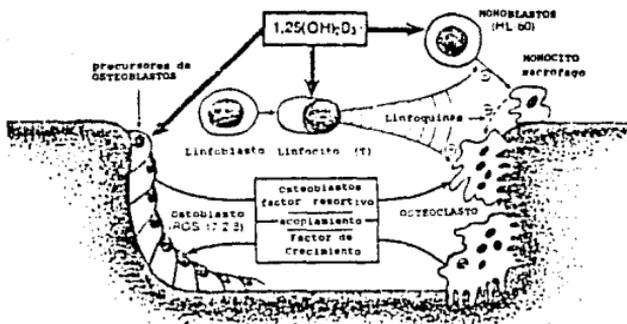


FIG. 5 MECANISMO PROPUESTO DE LA FUNCION DE 1,25(OH)₂D₃ Y SU RECEPTOR EN EL REMODELAMIENTO DEL HUESO (Haussler MR, Donaldson CA, Kelly MA: Funciones y mecanismo de acción del receptor a 1,25(OH)₂D₃. En Norman AW, Schaefer K, Grigoleit H-G, von Herrath D (eds): Vitamina D: Actualización Química, Bioquímica y Clínica. Resúmenes del 6o Taller de Vitamina D, Merano, Italia, 1985. Berlin, Walter de Gruyter Co. 1985, pp 83-92).

c) REGULACION Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D. Efecto de la hormona paratiroidea (PTH): La PTH, la vitamina D [1,25(OH)2D] y la Calcitonina se conocen como las hormonas reguladoras del metabolismo del Ca y P. Sin embargo, la PTH está considerada como la más importante de las tres.

La PTH es una hormona polipeptídica de 84 aminoácidos, secretada por las glándulas paratiroides y que al entrar en la circulación se rompe en dos o más fragmentos, de los cuales, el amino terminal (NH₂) correspondiente al fragmento 1-34 es el único con actividad biológica. En el riñón, una de las principales funciones de PTH es aumentar la absorción de Ca y favorecer la excreción de fosfato (De Luca, H.F. 1984). Por otro lado estimula a la adenilato ciclasa, enzima localizada en el túbulo proximal, cuyo producto final es el adenosin-monofosfato cíclico (AMPc), segundo mensajero de la acción de esta hormona. A su vez, la PTH responde ante cualquier disminución de Ca en la circulación, estimulando a la 1-alfa-25-hidroxilasa renal aumentando la producción de 1,25(OH)2D para favorecer la absorción de Ca en el intestino. Así mismo, un regulador importante de la 1-alfa-25-hidroxilasa es el propio metabolito activo. En general, cuando una enzima se suprime, la 24R-25-hidroxilasa renal se estimula. De hecho, la concentración de 1,25(OH)2D en sangre estimula a la 24R-25-hidroxilasa, aumentando la producción de 24,25(OH)2D. Sin embargo, los mecanismos moleculares del estímulo y la regulación de estas hidroxilasas no son muy claros.

En pacientes con SN, la hipocalcemia y la pérdida de 25-OHD por la orina al ser acarreada por la DBP, pareciera que ejerce un efecto directo sobre la producción de 1,25(OH)₂D. Esta deficiencia pudiera estar influenciada por la falta de sustrato y por otro lado deberse a un defecto en la hidroxilación. Por otro lado, el aumento de PTH que se presenta para compensar la hipocalcemia característica de este síndrome, indirectamente estimula a la 1-alfa-25-hidroxilasa.

Como resultado de ello, los pacientes con SN desarrollan hiperparatiroidismo secundario. Este aumento de PTH en la circulación favorece la desmineralización y la resorción ósea. Paralelamente, algunos autores han encontrado la fracción ionizada de Ca por abajo de los límites normales (Lim, P. et al. 1976).

d) **MARCADORES BIOQUIMICOS DEL METABOLISMO OSEO:** El hueso es un tejido complejo y está constantemente en proceso de remodelamiento, lo cual involucra a muchas sustancias así como a diferentes factores. En teoría, la determinación de la concentración en sangre de estas sustancias o marcadores bioquímicos, permiten tener una mejor idea del metabolismo óseo.

Actualmente se cuenta con una serie de marcadores de la actividad ósea metabólica (Tabla 1) divididos en dos grupos principales: aquellos que permiten detectar la actividad osteoblástica (formación) y los que detectan la actividad osteoclástica (resorción). Debe tenerse en cuenta también, que en las enfermedades donde ambos procesos se llevan a cabo, existe un balance en cual refleja el metabolismo óseo. A su vez, estos marcadores se ven influenciados por otros factores, tales como el remodelamiento esquelético y la depuración metabólica, los cuales deben compararse con mediciones directas de la formación y la resorción ósea como por ejemplo, la histomorfometría, el contenido mineral y la densidad ósea, para tener validez clínica.

La fosfatasa alcalina, la excreción urinaria de hidroxiprolina y la osteocalcina (proteína GLA) son los 3 marcadores del metabolismo óseo más comúnmente usados, cuya determinación permite estimar la escala de mineralización y resorción ósea.

Debido a que el hueso es rico en fosfatasa alcalina (FA) la cual se encuentra en los osteoblastos, su determinación se ha

utilizado como marcador de la formación osteoblástica, aún a pesar de considerarse el menos sensible y específico de los marcadores bioquímicos. En varios estudios se ha demostrado un aumento de la actividad de FA con la edad en mujeres postmenopáusicas, en pacientes con osteoporosis, en la enfermedad de Paget y post tratamiento con calcitonina o difosfonatos y en el caso de recaídas (Delmas, P.D. 1990).

Un aumento significativo en los niveles de fosfatasa alcalina se presentan en los pacientes con osteodistrofia renal, hiperparatiroidismo primario y secundario, hipertiroidismo, metástasis ósea, osteomalacia y durante el restablecimiento de fracturas óseas. A pesar de ello y debido a que en algunos casos el aumento es ligero, el apoyo que puede dar a la interpretación clínica es poco.

La hidroxiprolina (OHPr) total es un buen indicador de la resorción ósea. Los niveles de OHPr en la orina representan cerca del 90 % de la OHPr liberada a partir de la degradación de la colágena de varios tejidos. Principalmente durante el remodelamiento esquelético es excretada a la circulación en su forma libre, filtrada y reabsorbida casi totalmente por el riñón. Cerca del 10 % de la OHPr es liberada en forma de péptidos los cuales son ricos en OHPr filtrados y excretados en la orina finalmente. Parece ser que estos péptidos son derivados de la síntesis de la colágena de novo, por lo cual se les considera no filtrables, marcadores de osteoformación y no de resorción.

En la mayoría de los estudios se ha determinado la OHPr total, la cual principalmente refleja la resorción ósea. Los niveles de OHPr en la orina reflejan el remodelamiento del esqueleto pero también de las proteínas, siendo las proteínas de tipo no colágeno las que constituyen del 5 al 10 % de esta fase orgánica. En plasma, la OHPr circula en varias formas: unida a proteínas, a péptidos y en forma libre; sin embargo, sus niveles son muy bajos y a su vez no resulta ser un índice lo suficientemente sensible del metabolismo óseo, quedando restringida su utilidad a la determinación de los niveles de OHPr excretados en la orina (Delmas, P.D. 1990).

Teóricamente la determinación de osteocalcina es un arma útil para evaluar la mineralización ósea y parece no tener las limitaciones que presenta la determinación de FA (Charles, P. et al. 1985) o la determinación en orina de OHPr, parámetros usados comunmente como índices del recambio esquelético. En el caso de FA, esta enzima es de origen óseo, hepático, gastrointestinal y pulmonar. Mas aún los diferentes factores que afectan la degradación de FA no están totalmente claros. En el caso de OHPr, la determinación colorimétrica no es lo suficientemente sensible para utilizarla como marcador de la resorción ósea. Refleja la ingesta en la dieta de gelatina y al mismo tiempo el recambio de la colágena ósea y no ósea. Una porción de la OHPr presente en la orina se deriva de los péptidos relacionados con la síntesis de la colágena ósea y mucha de la OHPr que contiene péptidos se libera

durante la degradación de la colágena, son metabolizados y por ello no aparecen en la orina.

La osteocalcina (OC) o proteína GLA es un polipéptido de cadena sencilla con un peso molecular de 58 Kdaltones en donde los aminoácidos contienen tres residuos de la vitamina K (el ácido alfa gammacarboxiglutámico) en las posiciones 17, 21 y 24. Estos residuos impiden que la proteína se una al Ca que es el principal constituyente de la fase mineral del hueso. La OC resulta ser la proteína mas abundante de tipo no colágena que se sintetiza en los osteoblastos resultando ser un marcador específico del remodelamiento y formación ósea.

Los niveles de OC se encuentran elevados en una variedad de enfermedades metabólicas. En la rata, los niveles de OC se depuran principalmente por filtración renal y se ha visto que su aumento en la circulación es hasta 8 veces más, después de 4 horas post nefrectomía (Delmas, P.D. et al. 1983). Sin embargo, esto no significa que en pacientes con función renal disminuída, el aumento de OC pudiera reflejar un aumento de la masa ósea o una disminución de la depuración renal, o ambos. La OC correlaciona muy bien con el crecimiento longitudinal del hueso en el metacarpio y a nivel de la metafisis, posiblemente porque refleja la actividad osteoblástica, proceso que ocurre durante la osificación endocondrial.

Densitometría ósea (BMC) o Contenido mineral óseo (BMC): La masa ósea puede medirse de manera exacta, precisa y sin riesgo mediante varios métodos (Tabla 2).

Todos estos métodos calculan la masa ósea en base a la absorción por fotones del tejido, utilizando radionúclidos o un tubo de rayos X.

Los métodos de energía de doble fotón se desarrollaron hace pocos años y se han empleado en la medición de sitios axiales como la espina dorsal y la cadera, donde hay una gran cantidad y variedad de tejidos óseos. Hasta hace poco, los radionúclidos fueron la fuente de fotones empleadas en estos métodos, sin embargo, la utilización de los tubos de rayos X los han sustituido debido al aumento en la precisión y a la disminución del tiempo de conteo. La cuantificación de la masa ósea se expresa en función del contenido mineral (gramos) o en unidades de masa corregidas por el área cuantificada (gramos/cm²).

La densitometría ósea resulta ser un arma útil para detectar e identificar aquellos pacientes que cursan con disminución de la masa ósea. En el hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal o a mala absorción intestinal, resulta ser de gran utilidad la cuantificación de la masa ósea (Johnston, C.C. et al. 1990).

TABLA 1 MARCADORES BIOQUIMICOS DEL REMODELAMIENTO OSEO

FORMACION	RESORCION
SUERO O PLASMA	PLASMA
Fosfatasa alcalina total y ósea	Fosfatasa ácida tartrato-resistente
Osteocalcina o proteína GLA	Acido gamma-carboxi-glutámico libre
Péptidos de procolágena I	ORINA
	Hidroxi-prolina total
	Glucósidos de hidroxilisina
	Enlaces de piridinolina

TABLA 2 TECNICAS PARA MEDIR LA DENSIDAD DE LA MASA OSEA

TECNICA	% PRECISION	% EXACTITUD
Densitometría de un sólo fotón	1 - 3	5
Densitometría de doble fotón	2 - 4	4 - 10
Densitometría de doble fotón-Rayos X	0.5 - 2	3 - 5
Tomografía computarizada	2 - 5	5 - 20

A N T E C E D E N T E S

Se ha demostrado que los pacientes con SN presentan hipocalcemia, hipocalciuria, disminución de la absorción intestinal de Ca, aumento de PTH, osteomalacia y/o hiperparatiroidismo (Goldstein, D.A. et al. 1981; Malluche, H.H. et al. 1979a). A pesar de que al principio, la hipocalcemia se atribuía a la hipoalbuminemia, al estudiar los niveles de Ca ionizado (Malluche, H.H. et al. 1979b; Goldstein, D.A. et al. 1977) se encontró que estaban disminuídos. De manera similar se encontró que los metabolitos de la vitamina D en sangre estaban también disminuídos (Goldstein, D.A. et al. 1981; Malluche, H.H. et al. 1979a; Goldstein, D.A. et al. 1977; Barragry, J.M. et al. 1977). Al encontrarse en orina niveles detectables de los metabolitos de la vitamina D, se pensó que la disminución en sangre se debía a su excreción en orina al ser acarreados por la proteína transportadora de vitamina D (Barragry, J.M. et al. 1977). Posteriormente se encontró que el metabolito biológicamente activo de vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ también estaba disminuído (Lambert, P.W. et al. 1982), aunque no en todos los casos (Freundlich, M. et al. 1986).

Estos hallazgos han atraído la atención de los investigadores en relación al metabolismo de Ca y la vitamina D en el SN y su impacto sobre el esqueleto (Freundlich, M. et al. 1986; Kokor, A. et al. 1983); sin embargo la información que se tiene es aún controvertida.

Aunque la mayoría de los estudios muestran que los niveles de 25-OHD están disminuídos, no es así con respecto a 1,25(OH)2D. Algunos investigadores lo atribuyen a que los métodos para medir 1,25(OH)2D detectan tanto la fracción libre como la unida y es por ello que resulta difícil llegar a una conclusión más concreta, sobretodo si son los niveles de 1,25(OH)2D libre los que tienen importancia fisiológica (Auwerx, J. et al. 1986). Una situación similar se presenta al relacionar los niveles de PTH y Ca ionizado en estos pacientes (Alon, U. y Chan, J.C.M. 1983).

Por consiguiente, el estudio del sistema de la vitamina D y del metabolismo mineral, así como el impacto que estas alteraciones tienen en el esqueleto, resultan ser de gran importancia para conocer mejor la fisiopatología del SN (Fig. 6).

En ratas con SN inducido con suero nefrotóxico hay disminución de los metabolitos de la vitamina D y aumento en la excreción urinaria de la DBP (Chan, Y.G. et al. 1983). Sin embargo, se desconoce cuales son las alteraciones del sistema de la vitamina D y del metabolismo mineral en el SN inducido con ANP y, las consecuencias que esto pueda tener en el esqueleto.

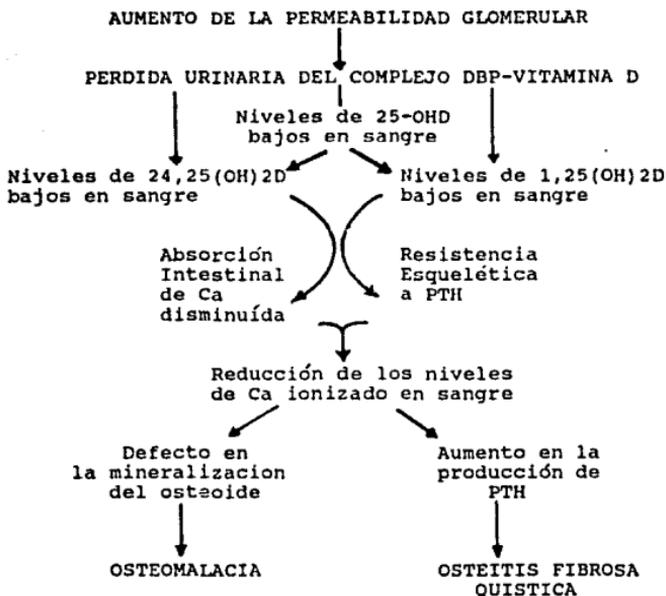


FIG. 6 PATOGENESIS DE LOS DEFECTOS DEL METABOLISMO DEL CALCIO Y LA VITAMINA D EN EL SINDROME NEFROTICO (Bernard, D.B.: 1982. Anormalidades metabólicas en el síndrome nefrótico: patofisiología y complicaciones. Contemporary Issues in Nephrology. 9: 85-119).

H I P O T E S I S

Las alteraciones en el sistema de la vitamina D en las ratas con SN inducido experimentalmente con ANP, pueden conducir a:

I. Alteraciones en el metabolismo mineral

y

II. A un aumento en la desmineralización ósea.

O B J E T I V O

En ratas con SN inducido con ANP:

- I. Estudiar el sistema de la vitamina D y las alteraciones del metabolismo de Ca y P.
- II. Conocer la utilidad que tiene el medir la concentración de los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo y,
- III. Valorar el efecto que estas alteraciones tienen sobre el contenido mineral del esqueleto.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

ANIMALES: En este protocolo, se usaron ratas Wistar macho (n=80) de 120 a 150 g de peso, las cuales se alimentaron con una dieta estándar (Purina chow) y agua al libitum.

DISEÑO EXPERIMENTAL: 80 ratas, 40 control y 40 con SN, se separaron en jaulas metabólicas de acuerdo al siguiente esquema: 8 grupos (cada uno formado por 10 ratas), correspondientes a los días 2, 6, 12 y 26 del estudio. El grupo de ratas apareadas por peso y, en el cual se indujo el SN se inyectó subcutáneamente con una dosis única de ANP (15 mg/100 g de peso) disuelto en solución salina al 2 %, el día 0 (Pedraza-Chaverrí, J. et al. 1990; Amato, D. et al. 1992). Las ratas control recibieron al mismo tiempo, una dosis única de solución salina al 2 % como vehículo.

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas para coleccionar orina de 24 horas en frascos de poliestireno los días 2, 6, 12 y 26 posteriores a la inyección de ANP o del vehículo. El día del sacrificio, las ratas se anestesiaron con éter y su sangre se obtuvo por punción cardíaca. La muestra de orina se centrifugó a temperatura ambiente y se decantó en un tubo cónico graduado en mL. Una vez medido el volumen, una alícuota de la orina se separó y congeló a -20°C. Los fémures se disecaron y se colocaron en frascos con formol y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su medición.

Se determinó la concentración en suero de proteínas totales, fósforo, creatinina y fosfatasa alcalina por colorimetría; Ca por absorción atómica; Ca ionizado por electrodo no selectivo; OC y PTH por radioinmunoanálisis; 25-OHD y 1,25(OH)₂D por acoplamiento a la proteína acarreadora y al receptor, respectivamente y; en plasma, AMPc por radioinmunoanálisis. En la orina, se determinaron por colorimetría, proteínas totales, fósforo, creatinina e hidroxiprolina, Ca por absorción atómica y AMPc por radioinmunoanálisis.

En hueso, se determinó por densitometría de doble fotón el contenido mineral total (BMC-T) y la densidad de la masa ósea total (BMD-T) mediante un Densitómetro Hologic QDR-1000. Igualmente se calcularon estos índices en tres regiones anatómicas, la epífisis, el centro y la diáfisis femoral.

PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.

a) Colorimétricos.

Creatinina (Cr) (Jaffé, J. 1966): mediante un autoanalizador marca Beckman Modelo 2, que posee un sistema de detección óptica con una fuente de luz a 520 nm, un fotodetector y un circuito que mide los cambios en la solución de picrato alcalino por absorbancia. Una vez que se introduce la muestra en la celdilla, inmediatamente se pone en contacto con el reactivo de picrato alcalino; la Cr presente en la muestra se combina con el ácido pícrico en presencia de iones hidroxilo, formando un complejo rojizo. La muestra de suero se lee directamente y la muestra de orina se diluye 1:100 con agua. Los resultados se expresan en mg/dL. En el caso de la orina, el resultado final se calcula en función del volumen urinario en mg/Vol.

Fósforo (P) (Chen, P.S. y Toribara, H.W. 1956): el P inorgánico presente en el suero y en los líquidos corporales, forma fosfomolibdato con el molibdato de sodio. Por reducción con ácido ascórbico, el fosfomolibdato se transforma en azul de molibdeno coloidal, que se mide fotométricamente. La cantidad de azul de molibdeno formado es proporcional a la de P inorgánico presente en la muestra. El suero se desproteíniza primero con ácido tricloroacético al 10 % y la orina se diluye 1:100 con agua. La lectura se efectúa a 830 nm en un espectrofotómetro contra blanco de reactivos. La concentración de P en la muestra se calcula contra una curva estándar (2,4,6,8,10 mg/dL). Los resultados se expresan

en mg/dL (suero) y en mg/Vol (orina).

Hidroxi prolina (OHPr) (Pódenphan, J. et al. 1984): la OHPr, aminoácido que se libera al degradarse la colágena ósea, se determina en orina, previa hidrólisis de la muestra. El complejo formado es oxidado a pirrol por acción de la cloramina T y posteriormente se une al p-dimetilaminobenzaldehído. La interferencia por cromóforos se elimina mediante una reacción ácido-base con subsecuente precipitación del complejo insoluble. La OHPr se extrae con tolueno y ácido clorhídrico. Enseguida se centrifuga la muestra para obtener una correcta separación de las fases orgánica y acuosa. El valor de OHPr se obtiene al interpolar en la curva estándar (6, 12.5, 25, 50 y 100 mg/dL) las lecturas de las muestras. El resultado final se expresa en mg OHPr/mgCr excretada en la muestra analizada.

Proteínas Totales (PT) (Martinek, R.G. y Berry, R.E. 1965): las proteínas y los péptidos, al contrario de otros compuestos nitrogenados como la urea, la creatinina, el ácido úrico, etc., forman en solución alcalina un complejo de color violeta con los iones cobre. La reacción requiere de dos enlaces peptídicos para llevarse a cabo. Las concentraciones de proteínas en suero y en orina (dilución 1:100 con agua) se leen en un espectrofotómetro contra una curva estándar de albúmina sérica bovina (5, 10, 15, 25, 35, 50 $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$). Los resultados se expresan en mg/dL.

b) Enzimáticos.

Fosfatasa Alcalina (FA) (Haussamen, T.U. et al. 1967): las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. Para determinar la FA se utiliza como sustrato el p-nitrofenilfosfato. La variación observada en el valor de extinción por unidad de tiempo es proporcional a la velocidad de transformación del sustrato y, por lo tanto, a la actividad enzimática. La determinación de la actividad de esta enzima se expresa en U/L y es el promedio de la extinción de tres lecturas del suero, cuyo valor se calcula en una tabla de concentración en U/L.

c) Absorción Atómica.

Calcio (Ca) (Manual del espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer Modelo 2830): el Ca se determina por absorción atómica en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer Modelo 2830. El suero y la orina se diluyen con cloruro de lantano para evitar interferencias por proteínas o por aniones. Se emplea una lámpara catódica a una longitud de onda de 422.7 nm. La concentración de Ca en la muestra se calcula contra una curva estándar de carbonato de calcio (2,4,6,8, y 10 mg/dL). El resultado se expresa en mg/dL o en mg/Vol.

d) Ion Selectivo.

Calcio Ionizado (Cai) (Manual del Radiometer ICA I de Radiometer Laboratories, Copenhagen): el Cai se mide en suero mediante un electrodo para Ca ionizado no selectivo de Radiometer Laboratories, Copenhagen. La muestra se debe mantener en atmósfera de CO₂ para evitar cambios en el pH. El equipo se calibra contra un estándar de Cai comercial con una concentración de 5 mg/dL; la concentración inicial de la muestra es corregida por el pH. El resultado se expresa en mg/dL a pH 7.4.

e) Radioinmunoanálisis.

AMP cíclico (AMPC) (De Alba, G. 1984): la determinación de AMPC en plasma y en orina se efectúa por radioinmunoanálisis. La orina se diluye con agua (1:50). La incubación se lleva a cabo en equilibrio y se deja en agitación constante en frío durante 18 horas. La separación de la fracción unida al anticuerpo se obtiene al precipitar la muestra con un complejo de inmunoglobulinas y sulfato de amonio. Después de centrifugar la muestra, el sobrenadante se decanta y el precipitado se cuenta en un contador para radiación gamma MACII (Micromedics). Los valores de AMPC en plasma y en orina se calculan contra una curva estándar (0.25 a 10 pmol/tubo) y los resultados se expresan en pmol/mL y en nmol/mg de creatinina.

Hormona Paratiroidea (PTH) (Mallette, L.E. et al. 1982): mediante radioinmunoanálisis y utilizando un estuche de

la casa comercial INCSTAR, U.S.A., se mide la fracción media de la molécula de la hormona (fragmento 44-68). Simultáneamente, la muestra problema (suero), el antisuero y la hormona marcada con 125-I, se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. La fase de separación es el complejo formado por un segundo antisuero (producido en cabra) y polietilenglicol. El ensayo se centrifuga a 769 x g durante 20 minutos y a temperatura ambiente. El sobrenadante se decanta y el precipitado se cuenta con un contador para radiación gamma MACII (Micromedics); los valores obtenidos se interpolan contra una curva estándar y los resultados se expresan en pg/mL.

Osteocalcina (OC) (Gundberg, C.M. et al, 1985): La OC o proteína GLA, se determina utilizando reactivos de Biomedical Technologies Inc. Stoughton, MA. U.S.A., específicos para rata. Simultáneamente la muestra problema (suero) diluida 1:50 con amortiguador de fosfatos, pH 7.4 y, el antisuero se incuban a 4°C durante toda la noche en agitación constante. El antígeno marcado con 125-I se agrega y se incuba en ensayo nuevamente a 4°C de 18 a 22 horas y en agitación constante. La fase de separación emplea un segundo antisuero en amortiguador de fosfatos y polietilenglicol, posterior a la cual se debe incubar el ensayo nuevamente por 2 horas más a 4°C y en agitación constante. Los tubos se centrifugan a 1500 x g durante 15 minutos en frío. El sobrenadante se decanta y el precipitado se cuenta en un contador para radiación gamma Packard MULTI-PRIAS 4. Los valores obtenidos se interpolan contra una curva estándar y los resultados finales se expresan en ng/mL.

f) Por acoplamiento a la proteína acarreadora.

25-Hidroxivitamina D (25-OHD) (Sierra, R.I. et al. 1989): se cuantifica en suero previa extracción con acetonitrilo y purificación de la muestra mediante cartuchos de sílica C-18 (Millipore de Mexico, S.A. de C.V.). Una vez extraída la muestra se seca mediante atmósfera de nitrógeno (N_2) y se mantiene a $-20^{\circ}C$ hasta que se procesa el ensayo. La cuantificación se realiza en equilibrio y en frío, utilizando un estándar de 25-OHD sintético (UpJohn de Mexico, S.A. de C.V.) en concentraciones variables de 0.25 a 10 ng/mL, 25-OHD marcada con tritio [25-Hidroxil-26(27)-metil- 3H]-colecalfiferol de Amersham, Co. U.K. y suero humano, como proteína acopladora. La muestra se reconstituye con etanol al 95% (0.5 mL, de los cuales 0.25 mL se utilizan para medir recuperación y el resto se procesa en el ensayo). La reacción se lleva a cabo en equilibrio y a $4^{\circ}C$ durante 1 hora; posteriormente se precipita la fracción libre con una suspensión de carbon-dextrán (1% - 0.1%) y se centrifuga por 10 minutos a $4^{\circ}C$ a $760 \times g$. El sobrenadante se decanta en un frasco de centelleo líquido al cual se le agregan 10 mL de líquido de centelleo, para ser detectado por un contador para radiación beta (Packard Instruments); una vez obtenido el valor de 25-OHD en la curva estándar, los resultados se corrigen por la recuperación y la concentración final se expresa en ng/mL.

1,25-Dihidroxivitamina D [1,25(OH)2D] (Seino, Y. et al. 1983): la muestra de suero se extrae con acetonitrilo y se purifica a través de cartuchos de sílica SEP-PAK (Millipore de México, S.A. de C.V.); la muestra se seca bajo atmósfera de nitrógeno (N₂) y en baño de agua a 25 °C. La separación final de este metabolito se efectúa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Beckman Modelo 110 y como fase líquida una mezcla de Hexano-Isopropanol (90:10) y con un flujo de 1 mL/min. Una vez separada la muestra, se cuantifica mediante la unión a un receptor citosólico aislado del duodeno del pollo (Yamasa, Co. Japon) y específico para 1,25(OH)2D. La curva estándar es 1,25(OH)2D sintética (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ) en concentraciones de 1 a 32 pg/mL. El compuesto marcado es 1,25-Dihidroxi-[23,24(n)-³H]-colecalfiferol de Amersham, Co. U.K., que se purifica por HPLC. La muestra se reconstituye con 0.250 mL de etanol al 95 %, 0.125 mL se utilizan para medir recuperación y el resto se procesa en el ensayo. La reacción se lleva a cabo en equilibrio y a 4 °C durante 1 hora. La fracción libre se precipita con una suspensión de carbón-dextrán (1% - 0.1%) mediante centrifugación y a 4 °C durante 10 min y a 760 x g. El sobrenadante se decanta en frascos de centelleo líquido, a los cuales se les agrega 10 mL de líquido de centelleo para ser detectados por un contador para radiación beta (Packard Instruments). El valor de 1,25(OH)2D en la curva estándar se corrige por recuperación y la concentración final se expresa en pg/mL.

g) Densitometría ósea de doble fotón mediante energía de rayos X (Manual HOLOGIC QDR-1000 y 1000/W) (Azria, M. 1989): la densitometría ósea en los fémures derechos de las ratas control y con SN se midió utilizando un colimador de alta resolución integrado a un programa que calcula el contenido mineral total (g) y la densidad de la masa ósea ($g.cm^2$). Los fémures se disecaron y se colocaron en cajas Petri y se cubrieron con agua destilada para su medición. Una vez que el contenido mineral total (BMC-T) y la densidad de la masa ósea total (BMD-T) se midió de acuerdo a la longitud total del fémur, se dividieron éstos en tres regiones anatómicas: la epífisis (L1), el centro (L2) y la diáfisis (L3) (Fig. 6A)

A N A L I S I S E S T A D I S T I C O

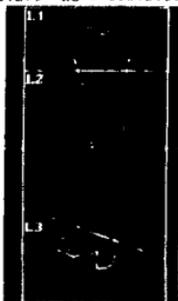
Todos los resultados se expresan como promedio más menos el error estandar del número de sujetos.

Los datos se analizaron por la prueba de Bartlett. Cuando las varianzas fueron homogéneas, los datos de ambos grupos de ratas se analizaron por la prueba de t de Student no pareada; por el contrario si las varianzas no fueron homogéneas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

Se aceptó que los valores son diferentes cuando $p < 0.05$ en la curva de dos colas.

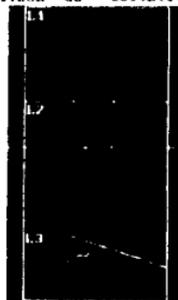
CHILDRENS' HOSPITAL C.P.C.

k = 1.379 d0 = 198.0(1.888H)



Dec 9 18:07 1991 (125 x 142)
 Hologic QDR-1000/U (S/M 876)
 Ultra High U4 26

k = 1.302 d0 = 109.2(1.888H)



Dec 9 11:26 1991 (125 x 141)
 Hologic QDR-1000/U (S/M 876)
 Ultra High U4 26

212899101 Mon Dec 9 09:58 1991
 Name: Rat Fenur
 Comment: control 1 day 12
 I.D.: Sex:
 S.S.#: - - Ethnic:
 ZIPCode: Height: cm
 Scan Code: Weight: kg
 BirthDate: / / Age:
 Physician: SIERRA

TOTAL BMD CV FOR L1 - L4 1.8x

C.F. 0.999 1.868 1.888

Region	Area (cm ²)	BMC (grams)	BMD (gms/cm ²)
L1	0.3836	0.8546	0.1797
L2	0.8288	0.1241	0.1498
L3	0.1819	0.8267	0.1478
TOTAL	1.3142	0.2854	0.1563

21289910A Mon Dec 9 11:19 1991
 Name: Rat Fenur
 Comment: nephrotic syn 1 day 12
 I.D.: Sex:
 S.S.#: - - Ethnic:
 ZIPCode: Height: cm
 Scan Code: Weight: kg
 BirthDate: / / Age:
 Physician: SIERRA

TOTAL BMD CV FOR L1 - L4 1.8x

C.F. 0.999 1.868 1.888

Region	Area (cm ²)	BMC (grams)	BMD (gms/cm ²)
L1	0.2787	0.8474	0.1752
L2	0.5614	0.8885	0.1434
L3	0.1292	0.8178	0.1374
TOTAL	0.9613	0.1457	0.1515

FIG. 6A DENSITOMETRIA OSEA DE DOBLE FOTON MEDIANTE ENERGIA DE RAYOS X (HOLOGIC QDR-1000/W).

R E S U L T A D O S

La sintomatología que acompaña al SN, caracterizada por edema, aumento del volumen urinario (Fig. 7) y franca proteinuria (Fig. 8), se pudo observar en este modelo experimental inducido en ratas Wistar macho empleando una dosis única de ANP.

La proteinuria presenta su máxima excreción el día 14, a pesar de que el aumento de proteínas en la orina tiene lugar desde el día 6, al mismo tiempo que las proteínas en la sangre disminuyen (Fig. 9). Una vez que la fase aguda se presenta, el fenómeno es reversible y para el día 26, la concentración de proteínas en la orina (Fig. 8) y en el suero (Fig. 9) regresan a valores normales.

La disminución de Ca en la circulación sanguínea es diferente significativamente el día 6 del padecimiento (Fig. 10), efecto que se ve favorecido por la excreción urinaria de proteínas y por la hipoproteinemia que acompaña al SN. El mecanismo de defensa del organismo, para compensar la pérdida de Ca es evitar la pérdida del mismo por orina, favoreciendo su reabsorción renal. En este modelo experimental, la concentración de Ca en orina disminuye el día 12 (Fig. 12) del padecimiento, efecto contrario a lo que pudiese esperarse con respecto al aumento de PTH en circulación a partir del día 6 (Fig. 15).

VOLUMEN URINARIO (mL)

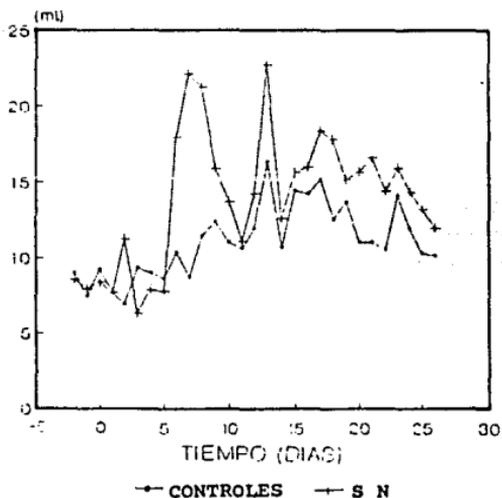


FIG. 7 Volumen urinario (mL) de las ratas control (-*-) y con SN (-+*) durante los 29 días del estudio (3 días antes y 26 días después de la inyección única de ANP).

PROTEINA TOTAL URINARIA (mg/vol)

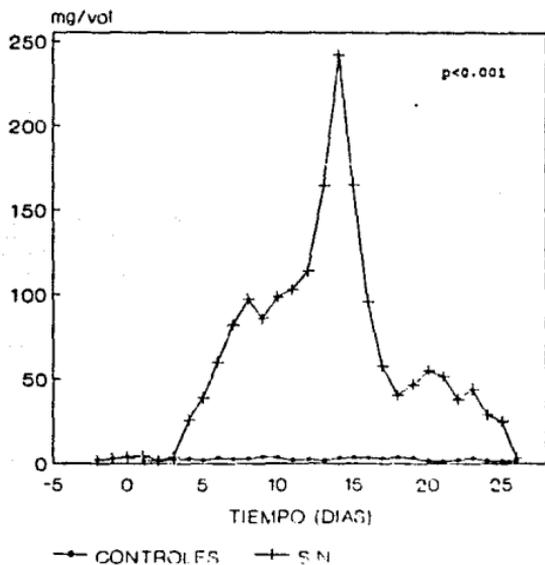


FIG. 8 Niveles de proteínas en la orina de las ratas control (---) y con SN (---) durante los 29 días del estudio (3 días antes y 26 días después de la inyección única de ANP).

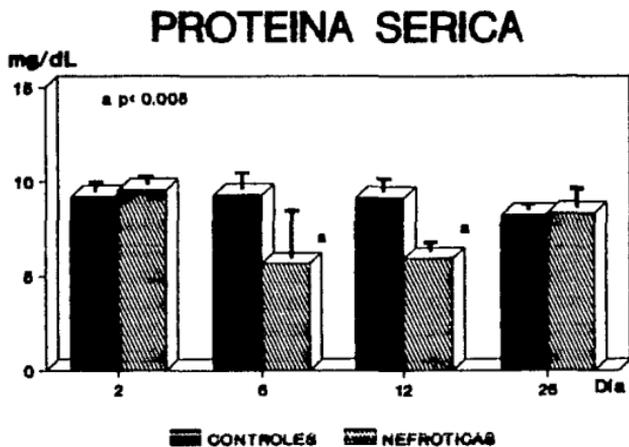


FIG. 9 Niveles de proteínas en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

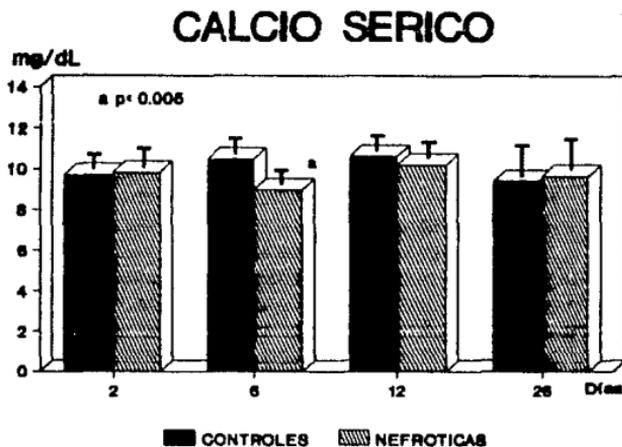


FIG. 10 Niveles de calcio en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

CALCIO URINARIO mg/vol

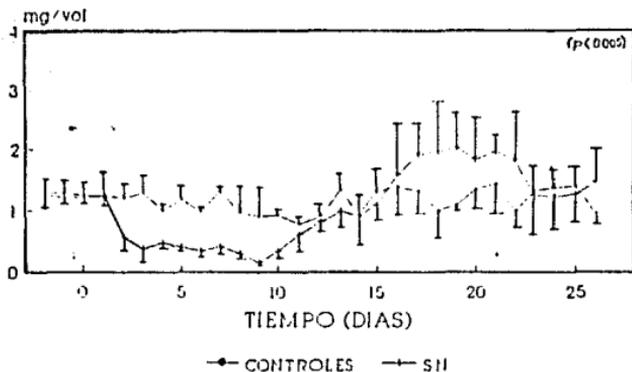


FIG. 11 Niveles de calcio en la orina de las ratas control (—●—) y con SN (---○---) durante los 29 días del estudio (3 días antes y 26 días después de la inyección única de ANP).

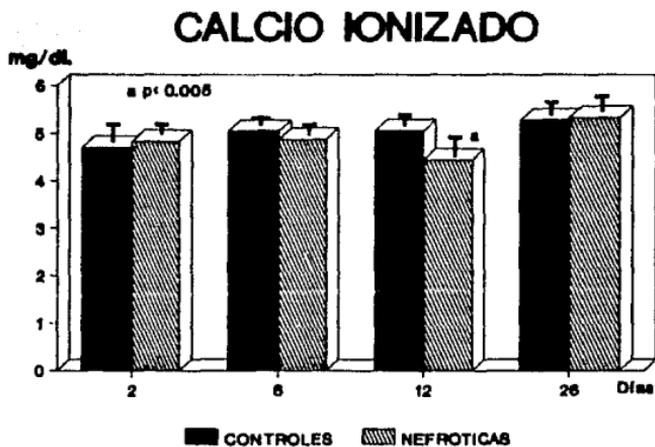


FIG. 12 Niveles de calcio ionizado en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

FOSFORO URINARIO (mg/vol)

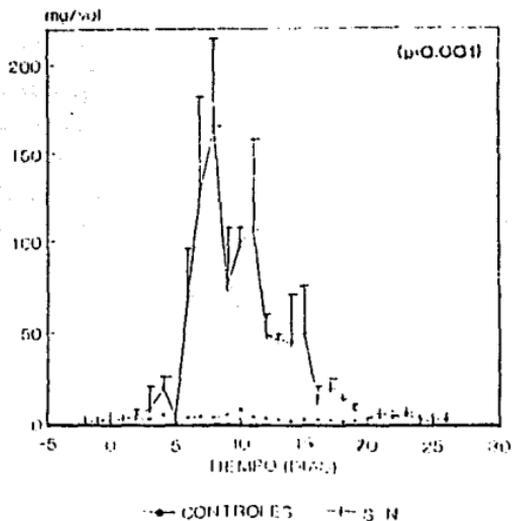


FIG. 13 Niveles de fósforo en la orina de las ratas control (---) y con SN (+-) durante los 29 días del estudio (3 días antes y 26 días después de la inyección única de ANP).

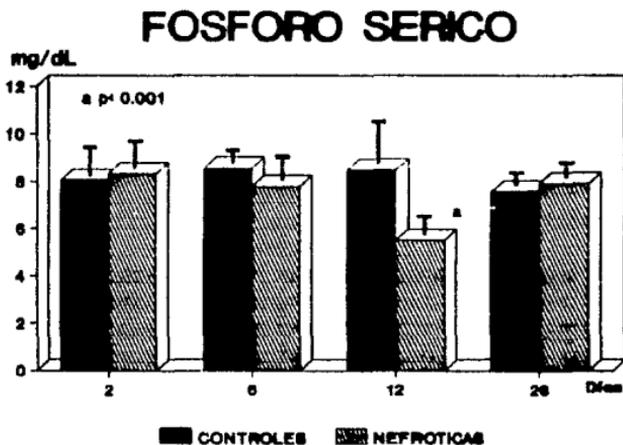


FIG. 14 Niveles de fósforo en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

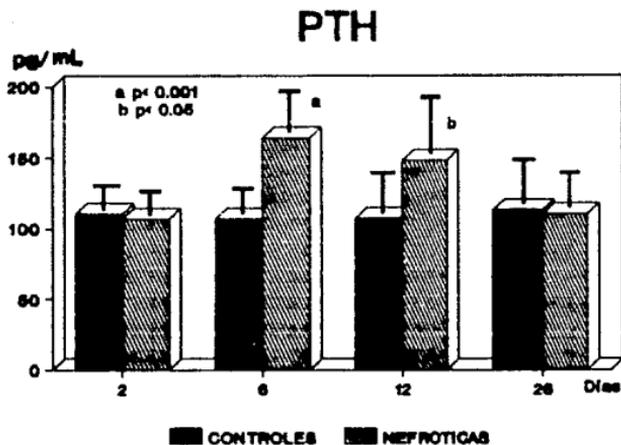


FIG. 15 Niveles de hormona paratiroidea en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

La excreción urinaria de fósforo (Fig. 13) también comienza a aumentar en el día 6 y presenta su fase aguda el día 8, la cual regresa a sus valores basales el día 26. En sangre y posterior a la hipocalcemia, hay disminución de los niveles de fósforo, los cuales presentan un pico máximo el día 12 (Fig. 14) y son estadísticamente diferentes del resto de los otros días.

En la circulación, la homeostasis mineral se mantiene a través de la relación Ca/P (1:1), y son las hormonas reguladoras del metabolismo de estos minerales, quienes mantienen este equilibrio. La pérdida de Ca (total y ionizado) estimula a PTH desencadenando un aumento de los niveles circulantes de esta hormona en la sangre durante los días 6 y 12 (Fig. 15), efecto que favorece la desmineralización del esqueleto y restablece de esa manera los niveles de Ca a la normalidad.

El segundo mensajero de la acción de PTH es el AMP cíclico nefrogénico, que resulta de la diferencia entre la concentración de este nucleótido en la sangre y su excreción total en la orina. En nuestro modelo experimental los niveles de AMPc en plasma no se encontraron aumentados (Fig. 16) a lo largo del síndrome, ni tampoco los de AMPc en la orina (Fig. 16A), lo que sugiere que la respuesta que ejerce la unión hormona-receptor a nivel de la membrana basal está alterada y que esto puede ser debido al daño tubular renal presente en el SN.

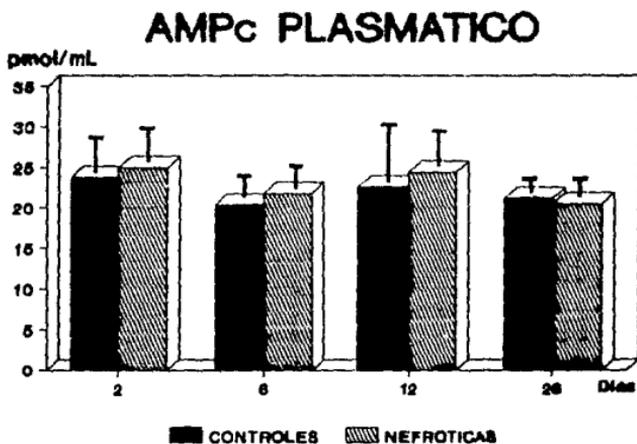


FIG. 16 Niveles de AMP cíclico en el plasma de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

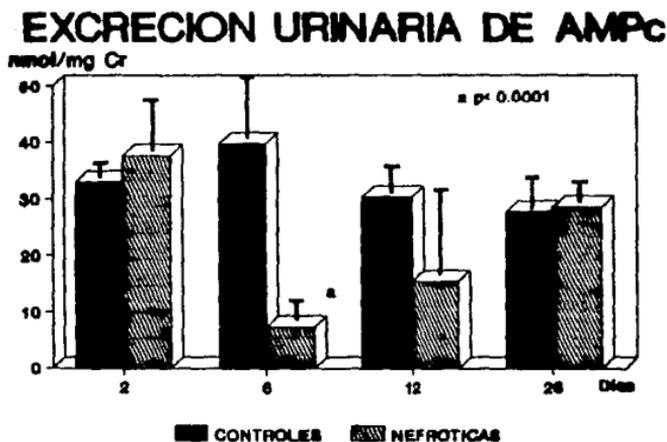


FIG. 16 A Niveles de AMP cíclico en la orina de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

Los metabolitos de la vitamina D, 25-OHD y 1,25(OH)2D se encuentran disminuidos significativamente a lo largo del padecimiento. Los niveles de 25-OHD disminuyen a valores indetectables el día 6, detectables pero significativamente diferentes con respecto al grupo control los días 12 y 26 del síndrome (Fig. 17). Este metabolito es el precursor de 1,25(OH)2D y al mismo tiempo, resulta ser el que tiene mayor afinidad por la proteína acopladora de vitamina D (DBP), la cual al ser excretada por la orina favorece la excreción urinaria de 25-OHD. En consecuencia, los niveles de 1,25(OH)2D son indetectables el día 6, así como significativamente diferentes los días 12 y 26 (Fig. 18).

Los resultados muestran que la máxima excreción de OHPr, aminoácido que se libera al degradarse la colágena ósea, tuvo lugar el día 12 (Fig. 19) y, regresa a los valores basales el día 26, de manera semejante a la proteinuria.

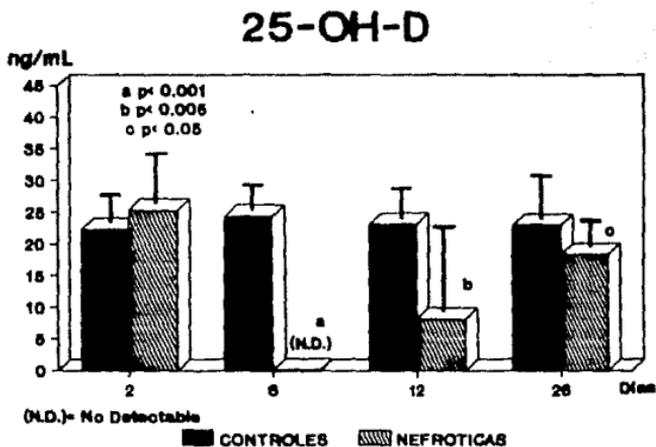


FIG. 17 Niveles de 25-hidroxivitamina D (25-OHD) en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2,6,12 y 26 del estudio.

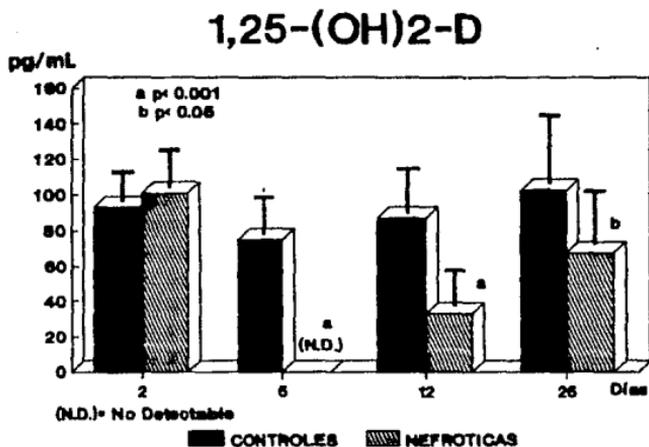


FIG. 18 Niveles de 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)₂D] en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2,6,12 y 26 del estudio.

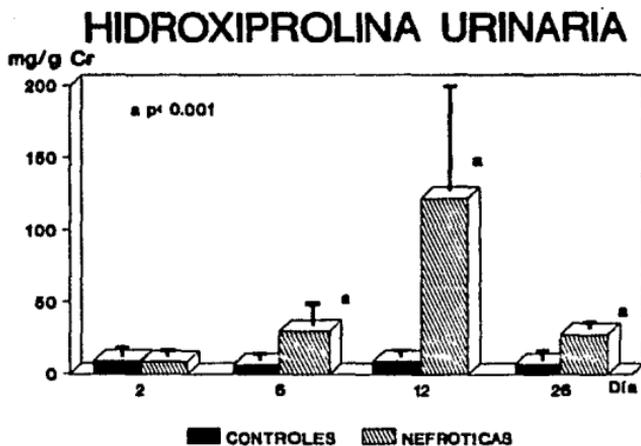


FIG. 19 Niveles de hidroxiprolina en la orina de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

La fosfatasa alcalina, uno de los marcadores bioquímicos de la actividad osteoblástica, se encuentra disminuída desde el día 2 y se mantiene igual durante el resto del padecimiento (Fig. 20). Aunado a lo anterior, los niveles de osteocalcina en sangre no se modifican a excepción del día 6, cuando aumentan significativamente con respecto al grupo control (Fig. 21). La concentración de creatinina en suero sólo aumenta el día 6 del padecimiento (Fig. 22).

Hasta ahora, no se había estudiado en este modelo experimental de SN inducido en ratas con ANP, el contenido mineral del hueso. Para ello, los fémures derechos de los animales control y con SN se disecaron y se les midió el contenido mineral óseo total (BMC-T) y la densidad de la masa ósea total (BMD-T) mediante un densitómetro de energía de doble fotón (Rayos X) Hologic QDR-1000. El BMC-T se encontró francamente disminuído a lo largo de los 26 días del padecimiento (Fig. 23) mientras que la BMD-T, solo mostro diferencia significativa los días 2, 6, y 26 (Fig. 24). Resulta interesante comentar el que no se encontró diferencia entre ambos grupos el día 12 en lo que respecta a BMD-T, lo que puede sugerir que el aumento de osteocalcina en sangre el día 6 pudiese compensar la desmineralización ósea que tiene lugar el día 12 del padecimiento. De ser así, este efecto representaría entonces un aumento de la actividad osteoblástica y no una disminución de la depuración renal de esta proteína.

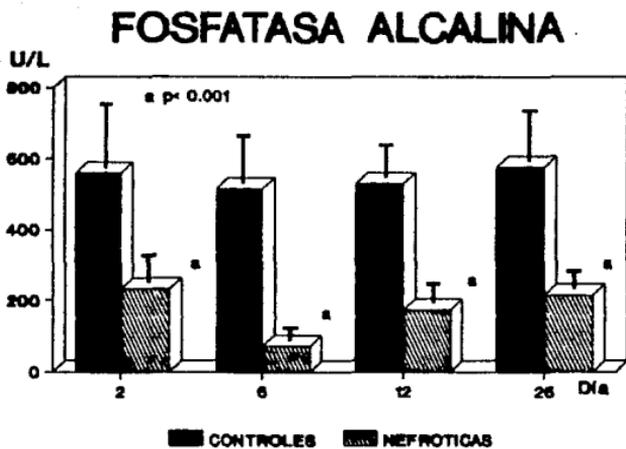


FIG. 20 Niveles de fosfatasa alcalina en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

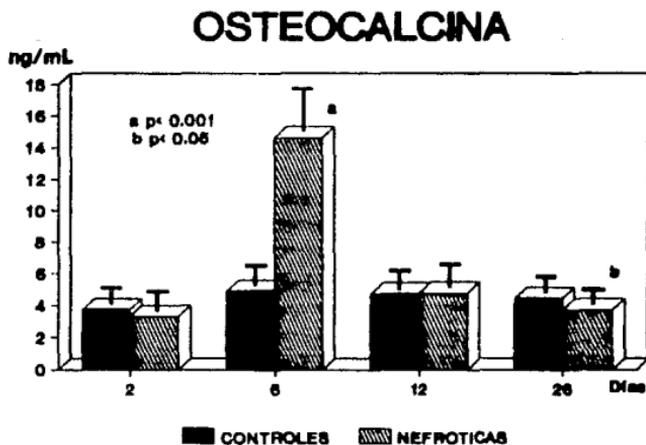


FIG. 21 Niveles de osteocalcina en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

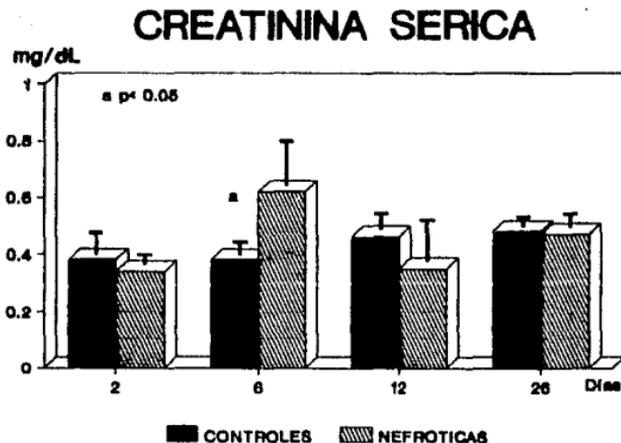


FIG. 22 Niveles de creatinina en el suero de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

Con respecto a las tres regiones del fémur (epífisis, centro y diáfisis) estudiadas mediante BMC y BMD, se encontró que de acuerdo al contenido mineral del hueso (BMC-T), la zona más afectada a nivel óseo en este síndrome fueron el centro (Región L2) y la diáfisis (Region L3) (Fig. 26 y 27). Por el contrario, la epífisis (Región L1) no muestra desmineralización durante los primeros días del padecimiento (Fig. 25).

Con respecto a la BMD en la epífisis (Region L1) y en la diáfisis (Region L3) no se encontró diferencia significativa en el día 12 del SN (Fig. 28 y 30). Por el contrario la zona central (Region L2) sí fué estadísticamente diferente con respecto al grupo control el día 12 (Fig. 29). Lo anterior sugiere pensar, que ésta es la parte más vulnerable del hueso a la acción de PTH, misma que está formada principalmente por hueso cortical.

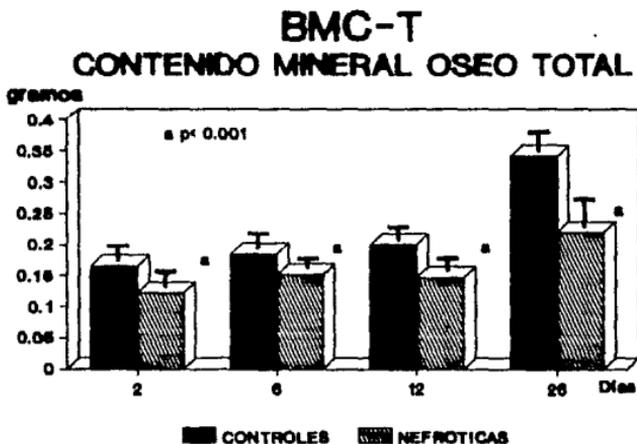


FIG. 23 Contenido mineral óseo total (BMC-T) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

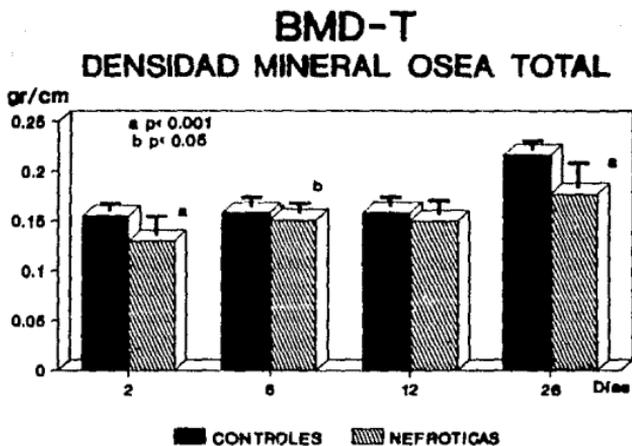


FIG. 24 Densidad mineral ósea total (BMD-T) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

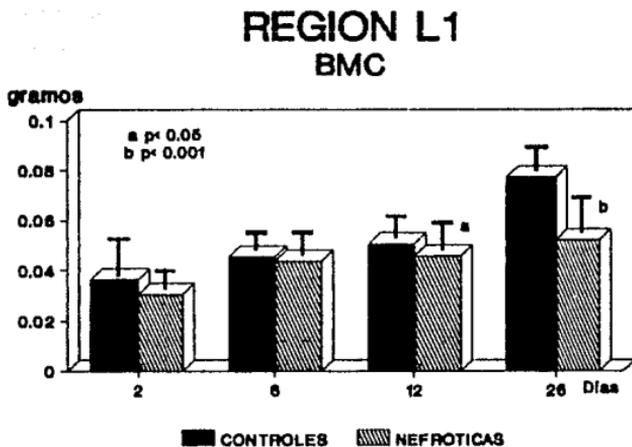


FIG. 25 Contenido mineral óseo (Región L1) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

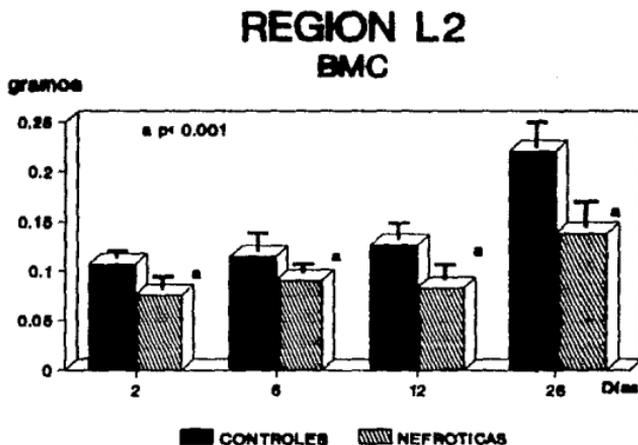


FIG. 26 Contenido mineral óseo (Región L2) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

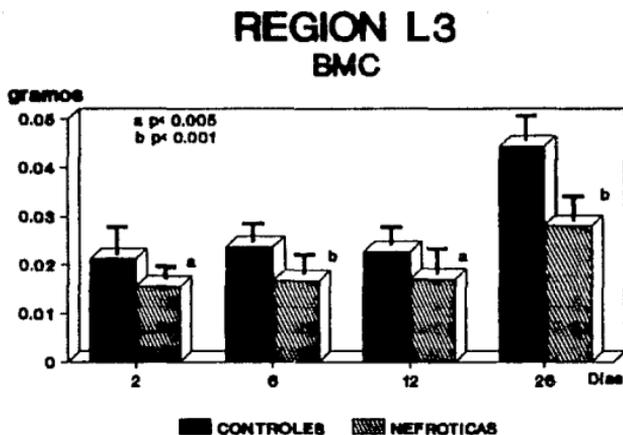


FIG. 27 Contenido mineral óseo (Región L3) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

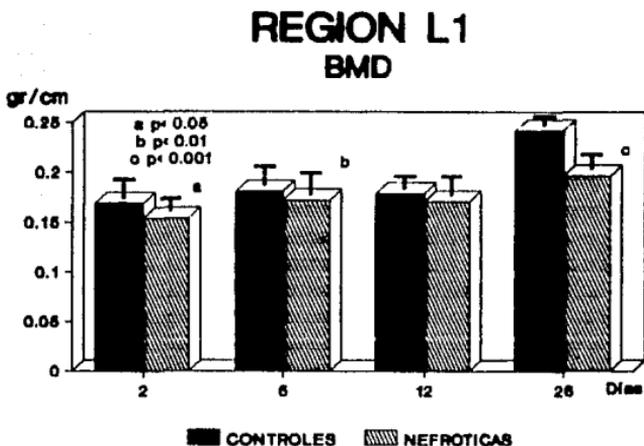


FIG. 28 Densidad mineral ósea (Región L1) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

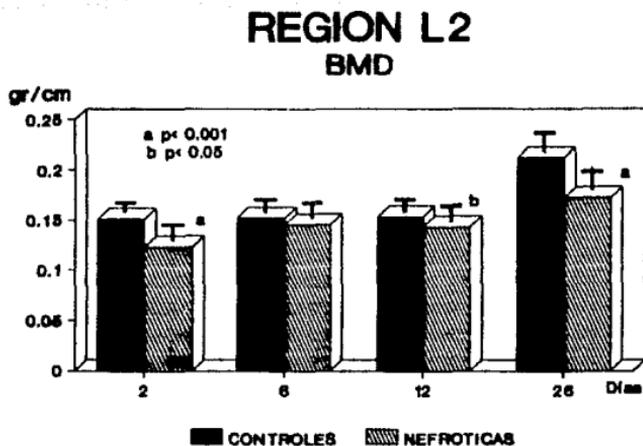


FIG. 29 Densidad mineral ósea (Región L2) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

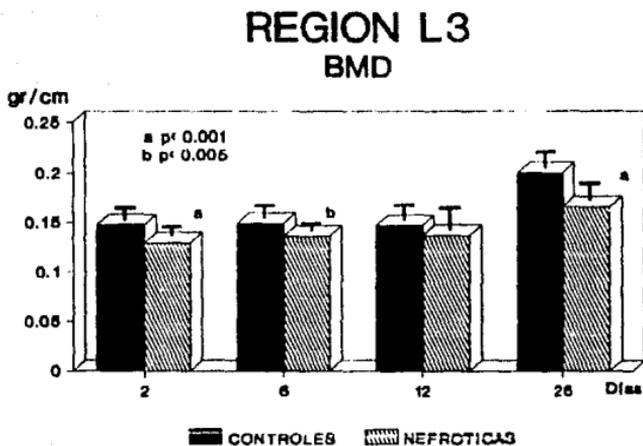


FIG. 30 Densidad mineral ósea (Región L3) de los fémures de las ratas control (■) y con SN (▨) los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

D I S C U S I O N

Durante la decada pasada, el descubrimiento de la vía metabólica de la vitamina D así como el advenimiento de nuevas técnicas para la determinación de Ca ionizado, hormona paratiroidea y los metabolitos de la vitamina D han permitido reiniciar el interés en este tema.

Hasta hace poco, la hipocalcemia que se presenta en el SN sólo se había relacionado con la disminución de la proteína unida al calcio, debido a la franca proteinuria que se presenta en este síndrome. No se pensaba que la fracción ionizada de Ca estuviera afectada, y por lo tanto, la hipocalcemia del SN no se consideraba de importancia patológica. En 1976, Lim et al. lograron demostrar que en los pacientes con SN, las concentraciones de Ca total (Ca unido a la albúmina) no reflejaban exactamente las concentraciones de Ca ionizado, aún después de corregirse por la concentración de proteínas en el suero. Estudios posteriores demostraron que la disminución de la concentración de Ca en el suero no solo se observa en la fracción unida a proteínas sino también en la fracción ionizada, lo que generalmente se acompaña por el aumento de PTH en sangre. En algunos pacientes, hay evidencia radiológica e histológica de descalcificación y aumento en la resorción ósea. En el SN, este fenomeno es reversible y los valores de Ca ionizado regresan a su concentración normal. Es importante notar que estos cambios no se atribuyen a una falla de la función renal, ya que la

mayoría de los pacientes con alteraciones del metabolismo mineral tienen función renal normal o ligeramente disminuída (Malluche, H.H. et al. 1979b; Goldstein, D.A. et al. 1977; Goldstein, D.A. et al. 1981; Freudlinch, M. et al. 1983; Alon, U. y Chan, J.C.M. 1983). En el SN, la pérdida por orina de proteínas, en este caso, de la proteína transportadora de vitamina D, da como resultado una disminución en la circulación de los metabolitos de la vitamina D. La disminución de la concentración de 25-OHD en suero esta directamente relacionada con el grado de proteinuria y con la concentración de albúmina en suero. La administración de 3H-vitamina D ha permitido observar que la vida media de este metabolito en la circulación está significativamente reducida en el SN y que la excreción urinaria de 3H-25-OHD está francamente aumentada con respecto a su excreción normal. Estos estudios han permitido observar que los metabolitos de la vitamina D, específicamente 25-OHD circulan en el suero unido a una globulina llamada proteína acopladora a vitamina D (DBP). El peso molecular del complejo vitD-BP es de 58,000 daltones, menor que la albúmina (69,000 daltones) lo que facilita su excreción por la orina (Goldstein, D.A. et al. 1977; Barragry, J.M. et al. 1977).

La disminución del metabolito activo de la vitamina D, 1,25(OH)2D puede deberse en parte a la pérdida por orina de su sustrato (25-OHD) y, por otro lado posiblemente a una disminución en la actividad de la 1-alfa-25-hidroxilasa renal debido al daño tubular renal característico del SN (Mizokuchi, M. et al. 1991).

Al mismo tiempo que hay una reducción en la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, la fracción libre (no unida a la DBP) que no es más del 1% del total de la hormona, pero la fisiológicamente más importante, posiblemente no se modifique y se mantenga en concentración normal, lo que explicaría en parte el que el metabolismo mineral no estuviera alterado. A pesar de ello, por el momento parece ser que sólo se está de acuerdo en que la disminución en suero de la concentración de 25-OHD total y de la DBP se deba a su excreción y pérdida por la orina.

La deficiencia en la circulación de los metabolitos de la vitamina D se acompaña de una disminución de la absorción intestinal de Ca y por consiguiente una disminución de los niveles de Ca ionizado en suero, lo que estimula la secreción de PTH al torrente circulatorio y la reabsorción de Ca por el riñón, lo que disminuye su excreción por la orina.

En algunos casos, estos cambios afectan la estructura del hueso, específicamente aumentando la actividad osteoclastica y favoreciendo la desmineralización ósea. A su vez, la normalización de la proteinuria y de las concentraciones en suero de los metabolitos de la vitamina favorecen el restablecimiento de las alteraciones del metabolismo mineral que se presentan en el SN.

El hecho de que algunos autores reporten cambios en el Ca, PTH y en los metabolitos de la vitamina D, y que otros no parecen hacer caso de ello, nos lleva a pensar en la posibilidad de que esto se deba a otros factores, como la edad, la duración de la

enfermedad, el tratamiento con corticosteroides, el grado de disfunción renal, la proteinuria y la disminución en suero de albúmina. Se ha propuesto también que en padecimientos de larga duración hay una disminución más acentuada de los niveles de albúmina y 25-OHD y esto, sea la causa de los cambios observados en la homeostasis de Ca y vitamina D.

En nuestro modelo experimental de SN inducido con ANP se presentó el cuadro clásico de las alteraciones metabólicas de este padecimiento: aumento del volumen urinario, proteinuria, hipoproteinemia, hipocalcemia, fosfaturia e hipofosfatemia. Lo anterior desencadenó un desequilibrio en la homeostasis mineral y por consiguiente en el sistema endócrino que regula este mecanismo.

Como es bien sabido, la hormona responsable de mantener los niveles de Ca circulantes en equilibrio es la PTH y, es el esqueleto cuyo contenido de Ca es del 90 %, quien resulta ser el órgano blanco ideal para suministrar tan codiciado mineral y, restablecer así el equilibrio. A su vez, la PTH estimula a la enzima responsable de convertir a 25-OHD en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, metabolito biológicamente activo y cuya acción principal es aumentar la absorción intestinal de Ca. Sin embargo, este mecanismo se ve francamente alterado en el SN, debido principalmente a la deficiencia del metabolito precursor de la vitamina D (25-OHD) y responsable de suministrarlo a la circulación.

Resulta interesante observar que aún a pesar de encontrarse

aumentada la concentración en suero de PTH la cual debe estimular a la 1-alfa-25-hidroxilasa renal, este efecto no se presenta y puede deberse principalmente a la deficiencia de 25-OHD. El aumento en la circulación de PTH durante el día 12, parece no estimular tampoco a la adenilato ciclasa renal y por consiguiente esto no se observa a través de la producción y excreción de AMPc, segundo mensajero de la acción de esta hormona. Esto permite pensar que la respuesta hormona-receptor en el SN se encuentra francamente disminuída y que esto se deba en parte a una alteración de la membrana basolateral a nivel del túbulo renal.

Por otro lado, debe recordarse que los marcadores bioquímicos del remodelamiento esquelético presentes en la circulación, reflejan la actividad total de todo el esqueleto, incluyendo el hueso cortical, subcortical y trabecular, el cual tiene diferentes escalas de remodelamiento en los estados normales y anormales. Sin embargo, estos marcadores bioquímicos no detectan defectos o alteraciones específicas de la actividad celular ósea si no hay un remodelamiento óseo al mismo tiempo. Por ello es ideal determinar el nivel de estos marcadores en sangre (FA, OC) y en orina (OHPr) y correlacionarlos con métodos tales como la densitometría de la masa y del contenido mineral óseo, así como con la histomorfometría. Estos métodos no invasivos, se limitan a detectar áreas específicas del esqueleto y permiten detectar defectos a nivel celular (osteoclastos). Esto aunado a las diferencias que se presentan al analizar partes del hueso (cortical como trabecular)

deben de tomarse en cuenta al establecer el diagnóstico.

Los estudios más complejos sobre el efecto de 1,25(OH)2D en hueso han sido en colágena, donde se han encontrado efectos catabólicos y anabólicos. La diferencia en la respuesta puede reflejar el estado de diferenciación de la célula ósea. Esto se debe a que los osteoblastos poseen receptores para 1,25(OH)2D, los cuales responden ante su efecto favoreciendo la síntesis de osteocalcina.

Por otra parte, 1,25(OH)2D influencia la actividad de fosfatasa alcalina y de 25-hidroxi-24-hidroxilasa en hueso. Los últimos estudios con análogos de la vitamina D, sugieren que la estimulación sobre la resorción ósea puede estar disociada del efecto de diferenciación celular sobre la línea de monocitos; por lo que se puede pensar que 1,25(OH)2D ejerza su efecto directamente sobre los osteoblastos, y estos a su vez activen a los osteoclastos o células óseas maduras.

En este modelo experimental, se encontró también que la excreción urinaria de OHP_r estaba francamente aumentada, hallazgo que apoya importantemente la hipótesis de nuestro trabajo. Se confirma entonces que hay degradación de la colágena ósea, desmineralización del osteoide y que este efecto esta influenciado por el aumento de PTH en sangre. Por otra parte, la actividad osteoblástica no aumenta en circulación a excepción del día 6, lo que permite pensar que su aumento en parte se deba a la disminución de la depuración de esta proteína por el riñón. Tampoco hay

aumento de FA en sangre, marcador bioquímico de remodelamiento esquelético junto con OC, indicando con ello, que el proceso de formación ósea está disminuido en el SN.

Mediante la densitometría de la masa ósea, pudimos observar que existe un grado importante de desmineralización y retardo del crecimiento del hueso. La parte más afectada resulta ser la región central (L2) del fémur, la cual está constituido por hueso cortical principalmente. Este efecto se presenta durante toda la fase aguda del padecimiento, lo que nos permite apoyar el hecho de que durante el SN hay una franca desmineralización, debido en parte al aumento de PTH como resultado de la hipocalcemia que se presenta durante la fase aguda del síndrome; este aumento de PTH conlleva al aumento de la actividad osteoclástica y disminución del contenido mineral y de la densidad de la masa ósea. En respuesta a este efecto, las ratas desarrollan hiperparatiroidismo secundario durante la fase aguda del padecimiento, lo que confirma nuevamente nuestra hipótesis.

En este modelo experimental donde se indujo el SN en ratas con una inyección única de ANP, se confirman los hallazgos encontrados por otros investigadores en donde el SN se indujo con suero nefrotóxico, así como las alteraciones del metabolismo mineral que se presentan en los pacientes (niños y adultos) que cursan con este padecimiento. Por otra parte, es la primera vez que se determinan los niveles de osteocalcina y del contenido mineral y de la masa ósea mediante densitometría de doble fotón, así como la región del hueso de mayor actividad osteoclástica y, por lo

tanto de desmineralización esquelética (Fig. 31).

Resulta interesante postular el que en el SN son varios los mecanismos que se encuentran alterados en el sistema de la vitamina D y del metabolismo mineral. Por otro lado, el aumento de la permeabilidad de la membrana renal a las proteínas, minerales, hormonas, vitaminas, lípidos y proteínas transportadoras de hormonas, por citar algunos, es más complejo de lo que parece y requiere de estudios más profundos para poder evaluarlos. Aparentemente el mecanismo que involucra la respuesta hormona-receptor, como es el caso de PTH-adenilato ciclasa y PTH-1-alfa-25-hidroxilasa pareciera que también está alterado en el SN.

Aunado a ello, los hallazgos encontrados en nuestro modelo experimental de SN en ratas inducido con ANP, nos permitió valorar el grado de desmineralización del osteoide a través de los estudios de densitometría de la masa ósea y del contenido mineral. Por otra parte, la determinación en sangre y en orina de los marcadores bioquímicos del remodelamiento esquelético (formación y resorción) servirán de apoyo a la investigación clínica en la identificación temprana de las alteraciones que caracterizan a este síndrome en el humano.

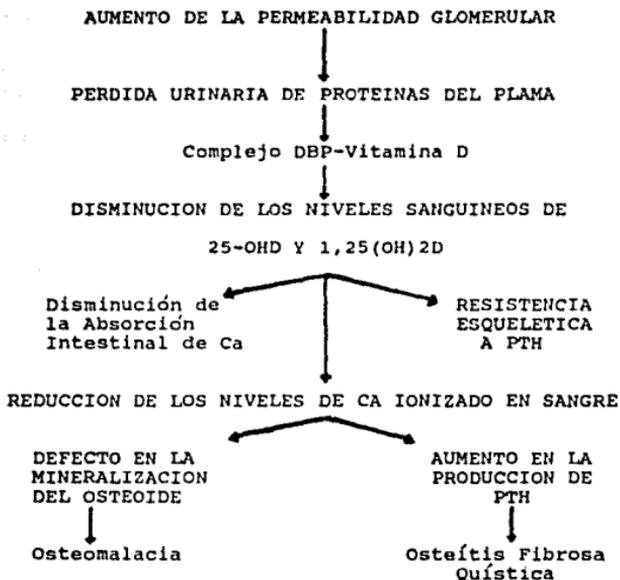


FIG. 31 ALTERACIONES DEL SISTEMA DE LA VITAMINA D EN EL SINDROME NEFROTICO EN RATAS INDUCIDO EXPERIMENTALMENTE CON ANP.

C O N C L U S I O N E S

1. Las alteraciones en el sistema de la vitamina D en las ratas con SN inducido experimentalmente con ANP, condujeron a alteraciones en el metabolismo mineral y en el sistema endócrino que regula la homeostasis de Ca y P.

2. El desequilibrio homeostático y hormonal que se presenta en este padecimiento desencadenó un deterioro irreversible de la masa ósea así como del contenido mineral del esqueleto, considerado como la vía principal de obtención de estos minerales.

3. La determinación de los marcadores bioquímicos del remodelamiento esquelético, específicamente osteocalcina, indicador de la actividad osteoblástica (formación), determinados por primera vez en este modelo experimental, permitió valorar la actividad ósea metabólica y su efecto sobre el esqueleto.

4. Gracias a la utilización de la densitometría ósea de doble fotón se pudo estimar el grado de deterioro esquelético y la zona de mayor desmineralización del osteoide.

5. Se puede concluir entonces que los hallazgos encontrados por otros investigadores en un modelo similar en donde se indujo experimentalmente el SN con suero nefrotóxico, se confirman.

LIBRERIA
UNIVERSITARIA
DE
BIBLIOTECA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alon, U y Chan, J.C. M.: 1983. Calcium and vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. *Int. J. Pediatr. Nephrol.* 4:115-118.

Amato, D., Pedraza-Chaverri, J. y Herrera-Acosta, J. : Fisiología del Síndrome Nefrótico. En: *Nefrología* Martínez-Maldonado, M., Rodicio-Díaz, J.L. y Herrera-Acosta, J. (Eds.). En prensa, 1992.

Auwerx, J., De Keyeser, L., Bouillon, R. y De Moor, P. : 1986. Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with nephrotic syndrome. *Nephron.* 42: 231-235.

Azria, M.: 1989. Value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. *Calcif. Tissue Int.* 45: 7-11.

Barragry, J.M., France, M.W., Carte, N.D., Auton, J.A., Beer, M., Boucher, B.J. y Cohen, R.D.: 1977. Vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. *Lancet.* 2: 229-232.

Bernard, D.B.: 1982. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. *Contemporary Issues in Nephrology.* 9: 85-119.

Calston, K., Williams, N.J. y Cleeve, H.J.W.: 1985. Studies on vitamin D binding protein in nephrotic syndrome. *Clin. Chem.* 31: 718- 721.

Chan, Y.L., Mason, R.S., Parmentier, M. Savdie, E., Lissner, D. y Posen, S.: 1983. Vitamin D metabolism in nephrotic rats.

Kidney Int. 24: 336-341.

Charles, P., Poser, J.W., Mosekilde, L. y Jensen, F.T.:1985. Estimation of bone turnover evaluated by ⁴⁷Ca-kinetics. J.Clin.Investi. 76: 2254-2258.

Chazarian, J.G., Schaes, H.K. y De Luca, H.F. : 1973. Mechanism of 25-hydroxycalciferol 1 hydroxylation. Biochem J. 12: 2555-2558.

Chen, P.S. Jr. y Toribara, H.W.: 1956. Microdetermination of phosphorous. Anal. Chem. 28: 250-254.

De Alba, G.: 1984. Tesis de Licenciatura: Determinación de AMPc por radioinmunoanálisis. Universidad Motolinía, Inc. a la U.N.A.M.

De Luca, H.F.: 1984. The metabolism, physiology and function of vitamin D. Kumar Ed.: Vitamin D, basic and clinical aspects. The Hague, Nijhoff, pp. 1-8.

Delmas, P.D., Wilson, D.M., Mann, K.G. y Riggs, B.L.: 1983. Effect of renal function on plasma levels of bone GLA-protein. J. Clin.Endocr.Metab. 57: 1028-1030.

Delmas, P.D.: 1990. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assesment of metabolic bone disease. Endocr.Metab.Clin.North America. 19:1:1-19.

Fiegelson, E.B., Drake, T.W. y Recant, L.: 1957. Experimental nephrosis in rats. J.Lab.Clin.Med. 40: 437-446.

Frenk, S.: 1955. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte

composition. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 89: 424-427.

Freundlinch, M., Jacob, A.I., Canterbury, J.M., Zilleruelo, G., Gorman, H., Bourgoignie, J.J. y Strauss, J. : 1983. Altered mineral homeostasis in children with nephrotic syndrome and normal renal function. *Kindney Int.* 23: 100-104.

Freundlinch, M., Bourgoignie, J.J., Zilleruelo, G. Abitol, C., Canterbury, J.M. y Strauss, J. : 1986. Calcium and vitamin D metabolism in children with nephrotic syndrome. *J.Pediatr.* 108: 383-387.

Goldstein, D.A., Oda, Y., Kurokawa, K. y Massry, S.G.: 1977. Blood levels of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. *Studies in 26 patients.* *Ann. Intern.Med.* 87: 664-667.

Goldstein, D.A., Haldiman, B., Sherman, D., Norman, A.W. y Massry, S.G.: 1981. Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J. Clin. Endocr.Metab.* 52: 116-121.

Gundberg, C.M., Wilson, P.S., Gallop, P.M. y Parfitt, A.M.: 1985. Determination of osteocalcin in human serum: Results with two kits compared with those by a well characterize assay. *Clin. Chem.* 31: 1720-1723.

Haltrap, M.E., Cox, K.A. y Clark, M.B.: 1981. 1,25-dihydroxyvitamin D stimulates osteoblastin rat bones in absence of parathyroid hormone. *Endocrinology.* 108: 2293-2301.

Haussemen, T.A., Rick, W., Gro, W. y Helger, R.: 1987. Nephrotic syndrome and vitamin D. *Clin.Chim.Acta.* 15: 421-423.

Hausler, M.R., Donaldson, C.A. y Kelly, M.A.: 1985. Functions and mechanism of actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. En: Norman, A.W., Shaefec, Grigoliet, H.G. y Von Herrath (Eds.). VITAMIN D, Chemical, biochemical and clinical update. Berlin, Walter de Gruyter. pp. 85-92.

Hollick, M.F., MacLaughlin, J.A., Clark, M.B.: 1980. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and physiological consequences. Science. 210: 203-205.

Hollick, M.F., MacLaughlin, J.A. y Doppett, D.H.: 1981. Factores que influncian la fotosintesis de previtamina D. Science. 211: 590-593.

Hollick, M.F.: 1984. Metabolism of Vitamin D. Endocrinology. Ed. Leslie & Groot. 2nd. Ed. 56: 902-926.

Hollick, M.F.: 1981. Importancia en la Medicina Clinica. Los Angeles, CA. Nichols Institute.

Jaffé, J.: 1966. Manual del autoanalizador Beckman 2.

Johnston, C.C., Slemenda, C.W. y Melton, L.J.: 1990. Clinical use of bone densitometry. Current Concepts. 16: 1105-1109.

Korkor, A., Schwarts, J., Bergfeld, M., Teitelbaum, S., Avioli, L.V., Klarhr, S. y Slatopolsky, E.: 1983. Abscence of metabolic bone disease in adult patients with nephrotic syndrome and normal renal function. J.Clin.Endocrin.Metab. 56: 498-500.

Lambert, P.W., DeOreo, P.B., Fu, I.Y., Kaetzel, D.M., Von Ahn, K., Hollis, B.W. y Ross, B.A.: 1982. Urinary and plasma vitamin D₃ metabolism in the nephrotic syndrome.

Metab.Bone.Dis.Res. 4: 7-15.

Lin, P., Jacob, E., Chio, L.F. y Pwee, H.S.: 1976. Serum ionized calcium in nephrotic syndrome. Orth.J.Med. 45: 421-426.

Mallette, L.E., Tuma, S.N., Berger, R.E. y Kirland, J.L.: 1982. Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone using an homologous antiserum with a carboxy-terminal fragment of bovine parathyroid hormone as radioligand. J.Clin.Endocr.Metab. 54: 1017-1021.

Malluche, H.H., Goldstein, D.A. y Massry, S.G.: 1979a. Blood levels of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. J.Clin.Invest. 63: 494-500.

Malluche, H.H., Goldstein, D.A. y Massry, S.G.: 1979b. Osteomalacia and hyperparathyroid bone disease in patients with nephrotic syndrome. J.Clin.Invest. 63: 501-505.

Manual del Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer Modelo 2830.

Manual del Radiometer ICA I de Radiometer Laboratories, Copenhagen.

Manual del Densitómetro Oseo HOLOGIC QDR-1000 Y 1000/W.

Martinek, R.G. y Berry, R.E.: 1965.

Clin. Chem. 11: 10.

Mizokuchi, M., Kubota, M., Tomino, Y. u Koide, H.: 1991. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. Contr.Nephrol. 90: 139-143.

Napoli, J.L. y Horst, R.L.: 1984. Vitamin D metabolism. En: Kumar, R. (Ed.). Vitamin D, basic and clinical aspects. The Hague,

Nijhoff Ed. pp. 91-123.

Pedraza-Chaverrí, J., Cruz, C., Ibarra-Rubio, M.E., Chávez, M.T., Calleja, C., Tapia, E., Uribe, M.C. Romero, L. y Peña, J.C.: 1990. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I: The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensine-aldosterone system on sodium retention. Rev.Invest.Clín. 42: (1) : 29-38.

Ponchon, G. y De Luca, H.F.: 1969. The role of liver in the metabolism of vitamin D. J.Clin.Invest. 48: 1273-1279.

Pødenphan, J., Larse, N.E. y Christiansen, C.: 1984. An easy and reliable method for determination of urinary hydroxyproline. Clin.Chem.Acta. 124: 45-48.

Price, P.A.: 1984. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the synthesis of the vitamin D dependant protein of bone. En: Kumar, R. (Ed.). Vitamin D, basic and clinical aspects. The Hague, Nijhoff Ed. pp. 397-410.

Reynolds, J.J., Habick, M.F. y De Luca, H.F.: 1973. The role of vitamin D metabolites in bone resorption. Cal.Tiss.Res. 12: 295-301.

Schnaper, H.W. y Robson, A.M.: 1988. Nephrotic syndrome: Mineral changes disease. Focal Glomerulosclerosis and related disorders: Diseases of the Kidney. Vol II, pp 1949. 4o. edition. Ed. by Robert W. Shaffer, Car. W. Gottschalk. Little, Kraw and Germany.

Seino, Y., Sierra, R.I., Sonn, Y.M., Jafari, A., Birge, S. y

Avioli, L.V.: 1983. The duodenal 1-alpha-25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rats with experimental induced diabetes. *Endocrinology*. 113: 1721-1723.

Sierra, R.I., Sotres, A., Tamayo, J. y Peña, J.C.: 1989. Seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D in serum in Mexico City. Abstracts of the 1st Join Meeting of ASBMR & ICCRH. Montreal, CAN.

Stern, P.H.: 1990. Vitamin D and bone. *Kidney Int.* 38: S17-S21.

Suda, T. y Kurokawa, K.: 1983. Characteristic localization fo 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase along the fetal nephron. En: Hollie, M.F., Gray, T.K., Anast, C.S. Ed.: *Perinatal Calcium and phosphorous metabolism*. Amsterdam, Elsevier. pp. 57-59.

Vernier, R.L., Papermaster, B. y Good, R.A.: 1959. Aminonucleoside nephrosis. I. Electron Microscopic study in renal lesions in rats. *J.Exp.Med.* 109: 115-126.

Zerveck, J.E., Sakhie, K. y Pack, C.Y.C.: 1985. Short term 1,25-dihydroxyvitamin D₃ administration raises serum osteocalcin in patients with postmenopausal osteoporosis. *Clin.Endocr.Metab.* 60: 615-617.