

12  
2oj.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"



## ESTUDIO DEL METABOLISMO MINERAL Y DEL SISTEMA DE LA VITAMINA D EN RATAS CON SINDROME NEFROTICO (SN) INDUCIDO CON AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICINA ( ANP )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
PEDRO CRUZ SANCHEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	1
I. RESUMEN.....	1
II. GENERALIDADES.....	3
2.1. SINDROME NEFROTICO (SN).....	3
2.1.1. MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR SN.....	4
2.2. VITAMINA D Y SN.....	8
2.2.1. METABOLISMO DE LA VITAMINA D.....	8
2.3. HORMONA PARATIROIDEA (PTH) Y ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO (AMPc).....	12
2.3.1. PTH.....	12
2.3.2. AMPc.....	13
2.3.3. MECANISMO DE ACCION DEL AMPc.....	13
2.3.4. EL AMPc COMO PARAMETRO DE FUNCION PARATIROIDEA.....	15
2.4. HIDROXIPROLINA (OHpr).....	17
2.4.1. FALLAS GENERALES.....	17
2.4.2. ENFERMEDADES ACOMPAÑADAS POR ALTERACION EN LA EXCRECION DE OHpr.....	18
2.5. FOSFATASA ALCALINA (Palk).....	20
III. ANTECEDENTES.....	23
IV. HIPOTESIS.....	24
V. OBJETIVOS.....	25
VI. MATERIAL Y METODOS.....	26
6.1. REACTIVOS.....	26
6.2. EQUIPO.....	28
6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
6.4. DETERMINACIONES.....	30

6.5. TECNICAS.....	31
6.6. ANALISIS ESTADISTICO.....	43
6.7. PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD.....	43
VII. RESULTADOS.....	44
VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.....	58
IX. CONCLUSIONES.....	61
X. REFERENCIAS.....	62

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AE	Actividad especifica
AH	Acido hipúrico
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
ANDEVA	Análisis de varianza
Ang I	Angiotensina I
ANP	Aminonucleósido de puromicina
ASB	Albumina sérica bovina
°C	Grados centigrados
Ci	Curies
Colo.	Colaboradores
C-terminal	Carboxilo terminal
DD	Densidad optica
DBP	Proteina acopladora a vitamina D (D Binding Protein)
EDTA	Acido etilendiamino-tetra-acetico
et.al.	Y colaboradores
Fig.	Figura
g	Gramo (s)
hr.	Hora (s)
KDa	Kilodaltones
l	Litro (s)
M	Molaridad
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
µl	Microlitro (s)

mU	Miliunidad (es)
N	Normal (normalidad)
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanometro (s)
N-terminal	Aminoterminal
OHpr	Hidroxiprolina
PalK	Fosfatasa alcalina
PM	Peso molecular
PTH	Hormona paratiroides
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Síndrome nefrótico
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25 dihidroxi-vitamina D <sub>3</sub> ó calcitriol
25(OH)D	25 hidroxí-vitamina D ó calcidiol

#### AMINOACIDOS

ALA	Alanina
Asp	Acido aspártico
Gli	Glicina
Glu	Glutamina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tir	Tirosina

# I.RESUMEN



## I. RESUMEN

Se indujo síndrome nefrótico (SN) en ratas macho de la cepa Wistar, de 135-180 g, con una inyección única de aminonucleósido de puromicina (ANP) y se estudiaron en un período comprendido de 28 días, dos días antes de la inyección y 26 días después. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- \* Las ratas presentaron proteinuria del día 4 al 25 con pico máximo de excreción el día 14.
- \* Hipoproteinemia (días 6 y 12), hipocalcemia (día 6) e hipofosfatemia (día 12); éstos se normalizaron el día 26 del estudio.
- \* La actividad sérica de la fosfatasa alcalina disminuyó desde el día 2 y permaneció baja hasta el día 26 del estudio.
- \* Los niveles plásmaticos de AMPc no se modificaron a lo largo del estudio.
- \* La concentración de 25 (OH)D disminuyó los días 6 y 12, volviendo a valores normales para el día 26.
- \* Se presentó fosfaturia con excreción máxima el día 8.
- \* La hipocalciuria se observó desde el día 2 hasta el 12 con un pico de excreción mínima el día 9.
- \* Aumento en la excreción urinaria de hidroxiprolina alcanzando un valor máximo en el día 14 y permaneciendo elevada al final del estudio.

Estos datos indican que las ratas estaban en un período

intensamente nefrótico y que tienen alteraciones muy importantes en el metabolismo mineral y en el sistema de la vitamina D.

El aumento en la excreción urinaria de hidroxiprolina sugiere que las alteraciones en el metabolismo mineral tienen fuerte impacto sobre el esqueleto, ya que esta última es un marcador importante en la degradación de la colagena ósea.

## II. GENERALIDADES



## II. GENERALIDADES

### 2.1. SINDROME NEFROTICO

El síndrome nefrótico (SN), es una enfermedad que se presenta en humanos de todas las edades, en los niños generalmente es idiopático ( de origen desconocido), pero en los adultos puede ser secundario a una glomerulonefritis o a una intoxicación .

En ratas se puede inducir experimentalmente .

Se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, albuminuria, disminución de la presión coloidosmótica, ascitis, edema, lipiduria, retención de sodio, hipercolesterolemia e hiperlipoproteinemia. Ver esquema A (1-5).

El aumento en la permeabilidad glomerular a las proteínas plásmaticas inicia las alteraciones sistémicas metabólicas que caracterizan al SN. La hipoalbuminemia en SN es secundaria a un aumento en el catabolismo, y a la pérdida de albúmina por orina. Las consecuencias de hipoalbuminemia son muchas (1), entre ellas destacan:

a) Hiperlipidemia: La hipoalbuminemia produce una disminución en la presión oncótica, lo que a su vez estimula la producción de lipoproteínas a nivel hepático. Este aumento, junto con una disminución en el catabolismo de las lipoproteínas, produce hiperlipoproteinemia.

b) Edema: La disminución en la presión oncótica, favorece el movimiento de fluidos del comportamiento vascular al intersticial causando edema y ascitis.

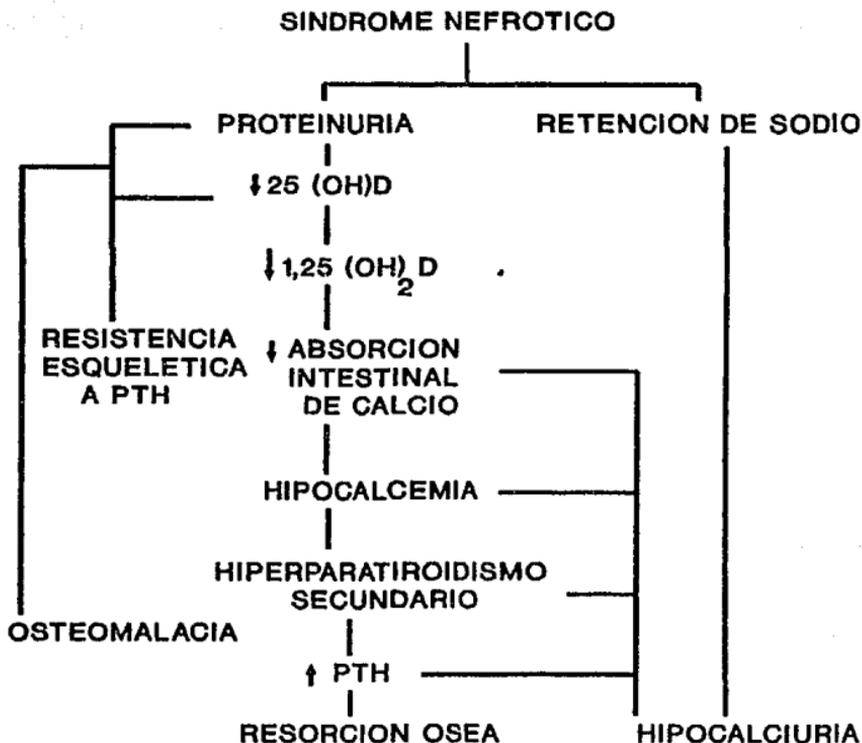
El aumento en la filtración de las proteínas trae como consecuencia:

- a) Disminución en la inmunidad humoral. Esto es secundario a la disminución en el nivel de las inmunoglobulinas producida por pérdida de ellas en la orina y a una disminución en su síntesis, y a que el factor B del complemento disminuye. Al alterarse la inmunidad humoral, se modifica la inmunidad celular debido a la interacción de ambos procesos lo cual lleva a un aumento en la susceptibilidad a infecciones por organismos oportunistas (p.e. neumococos que son causa de muerte en SN).
- b) Deficiencia en elementos traza (Cu,Fe,Zn) que se pierden por la orina.
- c) Alteraciones en el metabolismo hormonal, pues se pierden por orina proteínas acarreadoras tales como la globulina transportadora de tiroxina.
- d) Deficiencia de calcio y vitamina D.
- e) Estado hipercoagulable, secundario a alteraciones en casi todos los factores de la coagulación.

#### 2.1.1. MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR SN

Los modelos experimentales usados para estudiar el SN son los producidos por la inyección de:

- a) suero antirriñón
- b) aminonucleósido de puromicina (ANP)
- c) adriamicina
- d) daunomicina



**ESQUEMA A.**

**REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PATOGENESIS DE LAS ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DE CALCIO EN PACIENTES CON SINDROME NEFROTICO (Am J Clin Nutr 1978;31:1672-80).**

Debido a que el SN inducido en ratas con ANP se parece mucho al síndrome con lesiones mínimas encontrado en humanos, se ha utilizado como uno de los modelos para estudiar SN.

Se han descrito dos variantes de la nefrosis inducida por ANP, el modelo agudo y el modelo crónico (6). El modelo agudo, se induce por una o varias inyecciones subcutáneas o intraperitoneales que van de 50 a 150 mg/Kg de peso corporal total, estas inyecciones desencadenan una proteinuria masiva y SN al término de 7 a 14 días después de su aplicación; alrededor de 3 semanas, la proteinuria disminuye y desaparece a las 6 semanas; este modelo es reversible.

El modelo crónico se induce por una o varias inyecciones intravenosas a bajas dosis (5 mg/ 100 g) y se encuentra asociado a proteinuria crónica y daño irreversible.

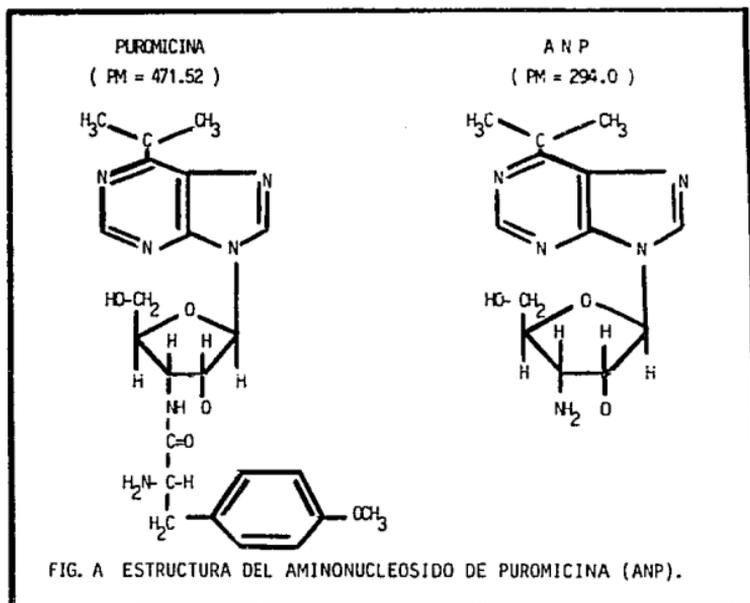
El ANP es producido por la hidrólisis del residuo p-metoxitirosil que se encuentra unido al grupo amino del residuo aminorribosa del antibiótico puromicina y está relacionado estructuralmente a la adenosina. Cuando se acetila el grupo amino del residuo aminorribosa pierde su nefrototoxicidad y se excreta sin cambio en la orina. No se metaboliza in vivo ni in vitro.

Esto sugiere que el grupo amino es muy importante para producir el efecto nefrotóxico, ver figura A (6).

Hasta ahora, el mecanismo por el cual el ANP produce

daño renal se desconoce, sin embargo, hay evidencias que el metabolismo del ANP es indispensable para producir el daño renal. Se piensa que los radicales libres, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido e hidroxilo, producidos durante el metabolismo del ANP son los responsables del daño.

El ANP produce una reducción en la densidad de carga de las células epiteliales debido a que se pierden sialoproteínas y heparán sulfato proteoglicanos, que como se sabe, participan de manera importante en la función de la filtración de proteínas plásmicas aniónicas (6).



## 2.2.VITAMINA D Y SN

### 2.2.1.METABOLISMO DE LA VITAMINA D.

El sistema de la vitamina D está formado por una serie de compuestos derivados del colesterol que al ser metabolizados en hígado y en riñón producen 1,25 dihidroxicalciferol, metabolito con actividad biológica cuya acción primaria es favorecer la absorción intestinal de calcio, y de esta manera mantener en equilibrio la homeostasis mineral (7).

Una vez que el 7 dihidrocolesterol es transformado en previtamina D por efecto de la luz ultravioleta (290-315 nm) en la piel, se equilibra térmicamente a vitamina D proceso que ocurre de dos a tres días al adaptarse completamente a la temperatura del cuerpo (8). Es entonces transportada a la circulación por la proteína acopladora de vitamina D hasta llegar al hígado dentro de las siguientes horas (9). Aquí sufre una primera hidroxilación en el carbón 25, en presencia de la 25 hidroxilasa microsomal dependiente de NADPH, de oxígeno molecular y de iones Mg, transformándose en 25 hidroxivitamina D. La vida media de este metabolito en la circulación es de 2 a 3 semanas y es de 2 a 5 veces más potente que su precursor, la vitamina D (fig. B).

Aunque la 25(OH)D, como 1,25(OH)<sub>2</sub>D sufren múltiples hidroxilaciones y oxidaciones, sin embargo, en ambos casos su actividad es nula. A la fecha, más de 22 metabolitos se encuentran presentes en estado de

intoxicación y sin efecto fisiológico o que actúan como sustrato de varias enzimas para producir los derivados hidroxilados en la posición 1.

La vitamina D es una de las hormonas reguladoras de la homeostasis de calcio y responsable de mantener al hueso saludable; aunque  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no parece tener una acción directa en la calcificación oséa, sí se sabe perfectamente que favorece la movilización de calcio de hueso aumentando en número de osteoclastos y por consiguiente la actividad osteoclástica (10). En el intestino (duodeno), favorece la absorción intestinal de calcio (Ca) y fósforo (P) ingerida en la dieta, a través de 1) aumento de la entrada de Ca y de P a través de la membrana plásmatica del intestino, 2) movimiento de Ca en el citoplasma y 3) transporte de Ca de la membrana basolateral a la circulación. En hueso la actividad osteoclástica a través de los monocitos periféricos, también se conoce que aumentan los niveles circulantes de osteocalcina (11,12). Se conoce que la hormona paratiroidea (PTH) estimula la actividad de la adenilato ciclasa en el túbulo proximal desencadenando una serie de eventos que concluye con un aumento de la absorción tubular de Ca lo que estimula la secreción de fosfato en la orina y aumento en la producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (13).

En los pacientes con SN, se pierde  $25(\text{OH})\text{D}$  en la orina, por lo que su concentración en sangre disminuye. Sin embargo, no se sabe si este ejerce algún efecto sobre

la disminución de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  y de  $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ ; estos pacientes también cursan con hiperparatiroidismo secundario y por ello aumentan la desmineralización y la resorción ósea. A pesar de tener niveles de PTH elevados, tienen calcio ionizado bajo. Frecuentemente una deficiencia de uno o más metabolitos de vitamina D trae como consecuencia un defecto en la absorción intestinal de Ca y/o una respuesta a la calcemia en el esqueleto debido a PTH (fig. C) (14).

Por lo tanto los pacientes con SN parecen tener una deficiencia de vitamina D, lo cual compete a los tres metabolitos más activos. Una disminución en los niveles de  $25(\text{OH})\text{D}$  precursor de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , en pacientes con SN se han encontrado niveles normales y bajos. Por lo anteriormente expuesto, podría no corresponder sin embargo, si existe una pérdida de este metabolito en la orina y/o una disminución de su producción en el riñón. Por otro lado, es posible también la pérdida de estos metabolitos en la misma.

La deficiencia de uno o más de estos metabolitos entonces esta asociada a un defecto en la mineralización del osteoide lo cual con lleva a la osteomalacia, una disminución en la absorción intestinal de Ca y una disminución en la respuesta calcémica a PTH. Esto origina una caída en los niveles de calcio ionizado, lo cual estimula la actividad de las glándulas paratiroides y por consiguiente un aumento en los niveles de PTH



## 2.3.HORMONA PARATIROIDEA (PTH) Y ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO (AMPc).

### 2.3.1.HORMONA PARATIROIDEA (PTH)

Las glándulas paratiroides producen una hormona que controla los niveles de calcio en el plasma (15). Se consideró que la acción principal de esta hormona era liberar el calcio y el fósforo del hueso vertiéndolos al torrente circulatorio.

Se pensó que la acción que ejercía la hormona era principalmente sobre el riñón, ya que aumentaba la excreción de fósforo urinario y como consecuencia disminuía su concentración sérica lo que daba lugar a un aumento en los niveles de calcio plásmatico.

Ahora está claro que la hormona paratiroidea (PTH) controla el transporte de calcio y una parte del transporte de fósforo en el riñón, el intestino y el hueso. También se concluyó que una segunda hormona estaba involucrada en la homeostasis del calcio sérico. Esta hormona, calcitonina (CT), es producida en el hombre en las células C de las glándulas tiroides. Su secreción se estimula con la hipercalcemia y tiende a disminuir los niveles séricos de calcio a través de la modificación en el transporte de este ión en el hueso, el riñón y probablemente el intestino. En resumen la PTH actúa específicamente sobre los receptores de las células tubulares de la corteza del riñón y también sobre las células óseas.

### 2.3.2. ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO (AMPC).

Se ha postulado el concepto del segundo mensajero en el mecanismo de acción hormonal. La hormona constituye el primer mensajero, el segundo mensajero es una sustancia producida en las células blanco en respuesta a la estimulación hormonal y que es la encargada de desencadenar la respuesta metabólica característica del órgano blanco y de la hormona estimulante en cuestión.

El AMPC es uno de los compuestos que satisface el concepto de segundo mensajero hormonal, lo cual se apoya en lo siguiente:

- a) La estimulación hormonal produce cambios medibles en la concentración de AMPC.
- b) Los cambios de concentración de este nucleótido preceden a un aumento o disminución en la función característica del órgano blanco en respuesta a un estímulo hormonal determinado.
- c) La acción de la hormona puede potencializarse usando agentes inhibidores de la enzima fosfodiesterasa.
- d) In vitro, la adición de AMPC a un cultivo celular origina una respuesta semejante a la que se produce por estimulación hormonal en el organismo.

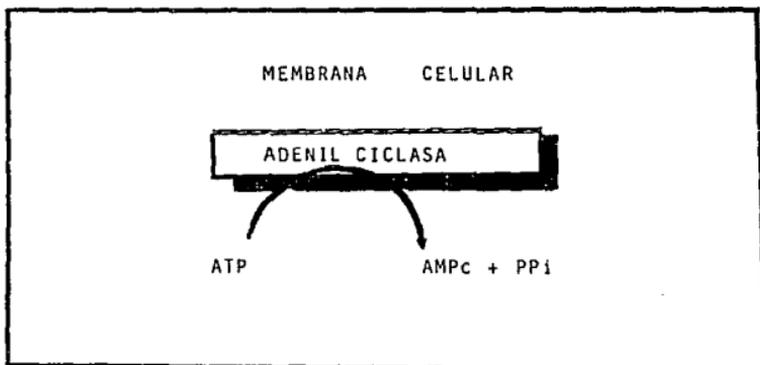
### 2.3.3. MECANISMO DE ACCION DEL AMPC.

El mecanismo de acción del AMPC como segundo

mensajero hormonal es el mismo para todas las hormonas.

La diferencia en la respuesta producida por cada una de ellas se debe a la presencia de receptores hormonales específicos en los órganos blanco, la presencia de ciertos iones en el medio circulante, la naturaleza misma del órgano blanco, y otros factores que no están plenamente establecidos.

Para llevar a cabo su función, la hormona se une a receptores correspondientes en la membrana celular del órgano blanco lo cual activa la producción del AMPc a través de la enzima adenilciclase que se localiza también en la membrana celular y actúa sobre el ATP produciendo AMPc y dejando en libertad al pirofosfato inorgánico en una reacción dependiente de iones magnesio (fig. D). El AMPc así formado es responsable de los cambios metabólicos subsecuentes a la estimulación hormonal.



#### 2.3.4. EL AMPc COMO PARAMETRO DE LA FUNCION PARATIROIDEA

Primeramente, la determinación del nucleótido tanto en plasma como en orina de sujetos aparentemente sanos y bajo condiciones basales permitió establecer que la concentración plásmatica de AMPc se mantiene en niveles constantes, producto de la acción hormonal en diversos tejidos mientras que la concentración urinaria es el resultado de la filtración glomerular del AMPc plasmático y de adición de una fracción de AMPc producido directamente por el riñón y que se denominó fracción nefrógena (16).

En resumen puede establecerse que:

El AMPc plasmático es producto de la economía de diversos tejidos dotados con la enzima adenilciclasa.

El AMPc urinario es la suma de la filtración glomerular de AMPc plasmático y de la fracción nefrógena excretada directamente a la orina por el riñón.

A pesar de que varios agentes pueden estimular la producción de AMPc por el riñón, ésta depende únicamente de la acción que ejerce la PTH sobre el mismo.

La concentración del AMPc urinario puede considerarse como parámetro de la función paratiroidea que refleja fielmente la acción de la PTH sobre el riñón.

Después de que el AMPc ha cumplido su función, es rápidamente transformado, por la enzima fosfodiesterasa, la cual cataliza la hidrólisis de este nucleótido en la

posición 3' produciéndose adenosín 5 fosfato; esta reacción es dependiente de iones magnesio y se lleva a cabo en el citosol.

## 2.4.HIDROXIPROLINA

El mayor componente orgánico óseo es la colágena, y es conocido que la regulación de esta síntesis y degradación es crítica para un buen funcionamiento del remodelamiento óseo. Debido a que la hidroxiprolina se encuentra exclusivamente en la molécula de colágena se pueden hacer determinaciones adecuadas para examinar los cambios en la degradación de la colágena (17-19).

### 2.4.1. FALLAS GENERALES

De la clase de aminoácidos que se encuentran en las proteínas, la prolina y la hidroxiprolina son dos miembros que contienen el anillo pirrólico y tienen propiedades químicas y metabólicas conferidas por un grupo amino secundario más que por un grupo amino primario.

La L-prolina además de que forma parte de las proteínas, y se encuentra como un aminoácido libre en los fluidos y en los tejidos de plantas, animales y de bacterias.

El metabolismo de la hidroxiprolina en los humanos, ocurre en el riñón. La hidroxiprolina es convertida a glicina y serina; el sitio de este metabolismo es en el túbulo proximal (17), la hidroxiprolina es considerada como un marcador de osteodestrucción, en cambio la PTH se considera como un regulador del remodelamiento óseo.

#### 2.4.2. ENFERMEDADES ACOMPAÑADAS POR ALTERACION EN LA EXCRECION DE HIDROXIPROLINA URINARIA.

Los análisis indican que algunas enfermedades se acompañan por alteraciones del metabolismo de la colágena,

colágena, entonces ocurren cambios en la excreción de hidroxiprolina. Se ha visto que los valores de hidroxiprolina se ven afectados en condiciones que alteren el metabolismo de la colágena en el organismo, como enfermedades endócrinas, y en desordenes que involucren la colágena ósea. No se ha observado que pequeños cambios locales en tejido conectivo, como infarto al miocardio o úlceras de pierna, causen un cambio significativo en la excreción de hidroxiprolina.

En el hipoparatiroidismo marcado es la única enfermedad en la que se conoce una caída severa en la excreción de hidroxiprolina (20,21).

La administración de cortisona produce disminución en la excreción urinaria de hidroxiprolina.

El incremento en la excreción urinaria de hidroxiprolina (cuadro A) puede observarse en pacientes con acromegalia, hiperparatiroidismo, síndrome de Turner, enfermedad de Paget, metástasis ósea, fracturas de hueso, leucemia mieloide, mieloma múltiple, osteomalacia, artritis reumatoide, escleroderma, en casos de enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Marfan, colitis ulcerativa, etc (22).

## CUADRO A.

### CONDICIONES ASOCIADAS CON CONCENTRACIONES ELEVADAS DE OHpr URINARIA

ENFERMEDAD DE PAGET	ACROMEGALIA
ARTRITIS REUMATOIDE	OSTEOMALACIA
ENFERMEDAD NEOPLASICA OSEA	OSTEOPOROSIS
HIPERTIROIDISMO	OSTEOMIELITIS
INSUFICIENCIA RENAL CRONICA	QUEMADURAS
NECROSIS ASEPTICA OSEA	

## 2.5. FOSFATASA ALCALINA (Palk).

En la práctica clínica, por la determinación de fosfatasa alcalina mide un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de fosfato en un medio alcalino. La Palk es producida por varios tejidos (cuadro B), únicamente la porción producida por hueso e hígado son detectadas en suero de personas sanas. También puede originarse en intestino y placenta.

Las causas de concentraciones anormales en suero de fosfatasa alcalina "osea" se enlistan en cuadro C. La fosfatasa alcalina es producida por osteoblastos y, como se discutió previamente hay bajos niveles oseos de pirofosfato los cuales facilitan la mineralización. La síntesis de Palk es deficiente en hipofosfatasa, una rara consecuencia hereditaria asociada con baja mineralización ósea, fracturas patológicas y acondroplasia, como desordenes inherentes de crecimiento óseo endocondrial.

La producción de OHpr también disminuye en la malnutrición y en el escorbuto, lo más común es que se encuentren concentraciones disminuidas como enfermedades asociadas que tienen Palk sérica elevada. Los valores altos significan un incremento de la actividad osteoblástica, y puede verse en sarcoma osteoblástico, fracturas en infantes (rickets), enfermedad de Paget y acromegalia.

Los niveles elevados se asocian con hiperparatiroidismo,

resultado de una mineralización ósea así como de PTH que induce actividad osteoclástica. los niveles altos de Palk "hepática" reflejan la obstrucción biliar y no se está exento de tener una enfermedad hepatocelular.

**CUADRO B.**

<b>FUENTES DE PaIk</b>
<b>OSTEOBLASTOS CELULAS DEL CANICULO BILIAR PLACENTA LEUCOCITOS CELULAS DEL TUBULO PROXIMAL RENAL GLANDULA MAMARIA ACTIVA</b>

**CUADRO C.**

<b>ENFERMEDADES OSEAS ASOCIADAS CON CONCENTRACIONES ANORMALES DE PaIk SERICA</b>	
<b>DEFICIENCIA</b>	<b>ACONDROPLASIA MALNUTRICION SEVERA ESCORBUTO</b>
<b>EXCESO</b>	<b>HIPOFOSFATASIA SARCOMA OSTEOLASTICO OSTEOMALACIA EMFERMEDAD DE PAGET ACROMEGALIA HIPERPARATIROIDISMO NIROS EN EDAD DE CRECIMIENTO</b>

### III. ANTECEDENTES



### III. ANTECEDENTES

En humanos con síndrome nefrótico existen alteraciones en el metabolismo de calcio, fósforo y de la vitamina D.

Sin embargo, estas alteraciones no están caracterizadas secuencialmente en el modelo experimental inducido por aminonucleósido de puromicina (ANP) ni tampoco se conoce el impacto de estas alteraciones sobre el esqueleto, por lo que se hace importante el conocimiento de este mecanismo bioquímico.

## IV. HIPOTESIS



#### **IV. HIPOTESIS**

**El metabolismo mineral y del sistema de la vitamina D están alterados en ratas con síndrome nefrótico inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP).**

## V. OBJETIVOS



## V. OBJETIVOS

- Estudiar las alteraciones en el metabolismo de la vitamina D y calcio y su impacto en el esqueleto en ratas con SN inducido con ANP midiendo:
  - \* Concentraciones séricas de creatinina, proteínas totales, fosfatasa alcalina, calcio, fósforo, 25 (OH)D.
  - \* Concentraciones urinarias de creatinina, proteínas totales, calcio, fósforo.
  - \* Excreción urinaria de hidroxiprolina (OHpr).
  - \* Concentración en plasma y en orina de AMPc.
  
- Evaluar si los cambios en el sistema de la vitamina D son reversibles.

# VI. MATERIAL Y METODOS



## MATERIAL Y METODOS

### 6.1. REACTIVOS

#### CREATININA (664180 Creatinine Reagent Kit)

Amortiguador alcalino	0-188 M de hidróxido de sodio. Amortiguador con borato y fosfato de sodio.
Solución pícrica	0.05 M de ácido pícrico.
Patrón calibrado	5.0 mg/dl (0.44 mmol/l, 440 $\mu$ mol/l) creatinina en 0.1 N HCl.

#### FOSFORO (34)

##### Acido ascórbico al 10%

Reactivo B	Molibdato de amonio 4.2 g Acido sulfúrico conc. 23.7ml
------------	---

##### Acido tricloroacético al 10%

Solución stock	fosfato de potasio 0.4392 g/100 ml.
----------------	-------------------------------------

#### FOSFATASA ALCALINA (Monotest B, optimada, Lakeside)

(4B)

Amortiguador	Dietanolamina 1 mol/l; pH 9.8 Cloruro de magnesio 0.5 mmol/l.
Sustrato	p-nitrofenil fosfato 10 mol/l

**HIDROXIPROLINA (49)**

Amortiguador de boratos 0.1 M, pH 9.1

Amortiguador de acetato citrato	AcONa 3H <sub>2</sub> O	14.2 g
	Citrato de sodio	9.32g
	Acido citrico	1.37g
	H <sub>2</sub> O c.b.p.	250 ml
Estandar	5 mg hidroxiprolina + 10 ml	
	agua desionizada	
	(almacenar a -30°C)	

**AMPc**

IgG

Sulfato de amonio sobresaturado

Trietilamina (TEA)

Suero cero ("0")

**PROTEINAS TOTALES (47)**

Solución A

Carbonato de sodio 2%

Hidróxido de sodio 0.4%

Tartrato de sodio

Sulfato de cobre al 0.5%

Reactivo de Folin Ciocalteu

Patrón de albúmina sérica bovina (ASB) 50mg/100ml

**25-HIDROXI-VITAMINA D3**

Acetonitrilo (HPLC)

Cartuchos C18 Sep Pack (Waters)

Estandar de 25 (OH)D3 sintética (Up John)

25-hidróxi (26,27-metil-3H) vitamina D3 (Amersham U.N)

9Ci/mmol.

Carbón dextrán (1/0.1%)

CALCIO (38).

Carbonato de calcio

Acido clorhídrico concentrado

Oxido de lantano

## 6.2. EQUIPO

- \* Auto analizador para creatinina, automatizado Beckman Mod. 2
- \* Radioinmunoanálisis, contador para radiación gamma MAC II. Micromedics.
- \* Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2830
- \* Cromatógrafo HPLC Beckman mod. 110 A
- \* Colorímetro Bauch & Lomb
- \* Colorímetro Spectronic 20
- \* Espectrofotómetro Beckman mod. 42

## 6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se usarón ratas macho, cepa Wistar, de 135-180 g. El SN se indujó por una inyección única subcutanea de ANP (15 mg/100 g de peso corporal total) en solución salina al 2 %; el grupo control recibió vehiculo (solución salina) en el mismo volúmen que para el grupo que se recibió ANP.

Las ratas se colocarán en jaulas metabólicas para la

recolección de orina de 24 horas, durante 28 días, con libre acceso de alimento y agua.

Posteriormente se sacrificaron por decapitación los días 2,6,12 y 26, días que sirvieron para recolectar suero y plasma.

Las orinas recolectadas día por día se almacenaron en dos alícuotas de 3 ml, en tubos de plástico, cada una y se acidificaron al 1.5% con ácido clorhídrico concentrado.

Una de estas alícuotas se almacenó a 4°C (uso diario) y la otra se almacenó a -35°C para confirmar los datos obtenidos con la alícuota de 4°C.

Después de que las ratas se sacrificaron la sangre se recolectó en un tubo de plástico con ayuda de un embudo del mismo material y otra porción (800 µl) se recolectó en un tubo Eppendorf, conteniendo 2 gotas de EDTA al 10 % . Del tubo de plástico se obtuvo suero y del tubo Eppendorf se obtuvo plasma ( agitar suavemente por inversión). Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 minutos se separaron y se repartieron en alícuotas y se almacenaron a -35°C.

NOTA: ES SUMAMENTE IMPORTANTE PROCESAR LAS MUESTRAS SERICAS DE INMEDIATO, ya que como en el caso de fosfatasa alcalina, estas pueden perder actividad.

#### **6.4. DETERMINACIONES**

##### **i) En orina:**

**Hidroxi prolina; colorimétrico**

**AMPC-UT; RIA**

**Creatinina; autoanalizador**

**Calcio total; Absorción atómica**

**Proteínas totales; colorimétrico**

**Fósforo; colorimétrico**

##### **ii) En suero:**

**Fosfatasa alcalina; colorimétrico**

**25(OH)D3; HPLC**

**Creatinina; autoanalizador**

**Calcio total; absorción atómica**

**Proteínas totales; colorimétrico**

**Fósforo; colorimétrico**

##### **iii) En plasma:**

**AMPC; RIA**

## 6.5. TECNICAS

### DETERMINACION DE FOSFORO

#### i) REACTIVOS

- A. Acido ascórbico al 10%
- B. Heptamolibdato de amonio 4.2 g  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado 22.7 ml
- C. Acido tricloroacético al 10%
- D. Solución stock de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:  
0.4392 g /100 ml
- E. Solución Standard:  
1 ml stock/ 100 ml H<sub>2</sub>O

#### CURVA STANDARD

CONCENTRACION (mg)	SOLUCION STD (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)
1	0.5	4.5
2	1.0	4.0
3	1.5	3.5
4	2.0	3.0
6	3.0	2.0

#### ii) MUESTRAS

##### ORINA

100 µl orina + 9900 µl agua

##### SUERO

-100 µl suero + 900 µl TCA al 10%

-se agitó en vortex

-centrifugación por 10 min. a 2200 rpm. a T ambiente

## PROCEDIMIENTO

- Se colocó de cada punto de la curva Standard 0.5 ml (para el blanco agregar 0.5 ml de agua) + 1.0 ml de agua + 2.5 ml de mezcla D.
- para las muestras problema colocar de la dilución 0.5 ml + 0.5 ml de agua + 2.5 ml de mezcla D.
- agitar en vortex
- incubar a 37°C por 1 hora
- leer a 830 nm

## DETERMINACION DE FOSFATASA ALCALINA (Palk).

(Monotest B, Lakeside)

### i) REACTIVOS

#### A. Amortiguador

dietanolamina	1mol/l, pH 9.8
Cloruro de magnesio	0.05 mmol/l

#### B. Sustrato

p-nitrofenilfosfato	10 mmol/l
---------------------	-----------

## PROCEDIMIENTO

- Se disolvió una tableta del frasco B con 3 ml del frasco A.
- Longitud de onda Hg 405 nm (400-420 nm)
- celdilla 1 cm de paso
- Temperatura 25 °C
- Se pipetearon a la solución reactiva 0.05 ml de la prueba

- Se mezclaron y se disparó simultaneamente el crónometro.  
Se repitieron las lecturas exactamente a 1,2 y 3 minutos después.
- Se determinó el cambio de extinción promedio por minuto ( E/min).
- Si el cambio de extinción excedía 0.250 para mediciones tomadas durante 3 min., se diluía a 0.1 ml de prueba con 0.9 ml de solución salina al 0.9% y se repetía la determinación (resultado por 10).

#### CALCULO

Los valores para la actividad de la fosfatasa alcalina en suero se calcularón :

$$E_{405} \text{ nm/min} \times 3300 = \text{U/l}$$

#### DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA

##### i) REACTIVOS

a. Amortiguador de boratos 0.1 M, pH 9.1

(se preparó cada semana)

mortiguador de acetato-citrato, pH 6.0

(se conservó en refrigeración y en envase plástico)

acetato de sodio 3 H <sub>2</sub> O	14.2 gr
citrato de sodio 2 H <sub>2</sub> O	2.37 gr
ácido cítrico	1.37 gr
agua desionizada c.b.p.	250.0 ml

c. Hidróxido de bario saturado 250.0 ml

d. Acido clorhídrico, 1 M

e. Acido clorhídrico, 0.003 M

f. Hidróxido de sodio, 6M, 100 ml

g. Tolueno concentrado

h. 2-propanol

i. Reactivo de Erlich's

(se preparó el mismo día)

PDAB (Paradimetilaminobenzaldehido) 3.125 gr

HCl conc 3.825 ml

2-propano l 20.0 ml

j. Cloramina T (Cl-T) al 7% en proporción 1:5

(se preparó para uso inmediato)

0.7 g de Cl-T en 10 ml de agua

se tomó 1 ml + 4 ml de amortiguador acetato- citrato

se mantuvo en la obscuridad , cubierto con papel aluminio.

k. Preparación del standar.

STOCK

5 mg de OHpr + 10 ml de agua desionizada

se almacenó a 30°C en un tubo Eppendorf

OHpr (Sigma Chemical STD Lavis)

1:5 10 mg - 1000 ml

ii) CURVA STANDARD

dilución 1:1

concentración

a. 2 ml Stock aforar a 10 ml con agua 100 mg/l

b. 5 ml de a + 5 ml de agua 50 "

c. 5ml de b + 5 ml de agua 25 "

d. 5 ml de c + 5 ml de agua 12.5 "

e. 5 ml de d + 5 ml de agua 6.25 "

- Se pasó a tubos de 13 X 100 y se agitó en rotor 10 min. a velocidad máxima
- Se centrifugó a 2500 rpm. durante 5 min.
- En tubos por separado de 13 X 100 se agregó 2.0 ml de HCl 0.003 M y se le adiciono 2.0 ml del sobrenadante de los tubos anteriores.
- Se agitó en vortex y se centrifugó a 2500 rpm., 10 min.
- Se separó la fase orgánica (tolueno) y se leyó la fase acuosa a 550 nm.

#### DETERMINACION DE AMPc

##### EN PLASMA:

##### i) REACTIVOS

A. Amortiguador MES, pH 6.19

0.976 g en 250 ml de agua desionizada, ajustar pH con NaOH 5 N.

##### ii) CURVA STD

	To	5	10	20	40	80	120	200
MES	400	395	390	380	360	320	280	200
SUERO "D"	100	100	100	100	100	100	100	100
STD	-	5	10	20	40	80	120	200

Suero "D" y muestras, se realizó dilución 1:50

40 µl de plasma + 1960 µl MES

Dilución del STD, 1:10

100 µl del STD + 900 µl MES

Dilución del anticuerpo, 1: 250

Frasco : 60 µl para disolver en 15 ml de MES

Es recomendable realizar el cálculo para los mililitros que se van a utilizar.

1 :  
125

Frasco: 241 µl para disolver en 60 ml de MES

Es recomendable realizar los cálculos correspondientes para el número total de tubos, cada uno lleva 240 µl.

Acetilación: (tiene una vida media de dos horas y de debe preparar al momento de usarse)

Cada tubo 25 µl.

TEA (trietilamina) 1000 µl

AnhAc (anhidrido acético) 500 µl

Se preparó en proporción 2:1

### iii) PROCEDIMIENTO

#### TECNICA DE RIA.

1. Se realizó curva STD con volumen final de 500 µl y se acetiló con 25 µl.
2. Preparación de muestras, suero "O" y controles normales de AMPc plásmatico con dilución 1:50 de MES.  
1960 µl MES + 40 µl de plasma = vol. final 2000 µl
3. De cada una de las soluciones anteriores se tomarán 500 µl y se pasaron a tubos previamente rotulados, se

acetiló con 25 µl de TEA, se agitó.

4. Ya acetilado transferir 100 µl a tubos borosilicados para realizar el ensayo como sigue:

	TUBO	BUFFER	MUESTRA	Ac	*	INCUB	IgG	cpm
1	TC	1	-	-	-	200	-	
2	TC	2	-	-	-		-	
3	TC	3	-	-	-		-	
4	TC	4	-	-	-		-	
5	TC	5	-	-	-		-	
-----								
6	CO	1	300	-	-		100µl	
7	CO	2	300	-	-		IgG	
8	CO	3	300	-	-		+	
-----								
9	TO	1	100	100	100	4	2.5 ml	
10	TO	2	100	100	100		(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> SD <sub>4</sub>	
11	TO	3	100	100	100	QC	al 60%	
-----								
12			5					
13			5					
14			10					
15			10					
16			20					
17			20					
18			40					
19			40					
20			80					
21			80					
22			120					
23			120					
24			200					
25			200					
-----								
26	C	1						
27	C	1						
28	C	2						
29	C	2						
30	C	3						
31	C	3						
32	P							
33	P							

TC= CUENTAS TOTALES

CO=

TO= BLANCO

C = CONTROLES

P = PROBLEMAS

## DETERMINACION DE PROTEINAS SERICAS

### i) REACTIVOS

- A. Carbonato de sodio                    2%  
       NaOH                                    4%  
       Tartrato de sodio y  
       potasio                                0.02%
- B. Sulfato de cobre                    0.5 %
- C. 50 ml de A + 1 ml de B (se preparó al momento de usar)
- D. Reactivo de Folin Ciocalteu 2N
- E. Solución patrón de albúmina sérica bovina (ASB), que es aproximadamente al 5% usando 50 mg/100 ml.

### ii) CURVA STD

TUBO	PROTEINA mg	ASB ul	AGUA ul	VOL. TOTAL
BLANCO	-	-	200	
1	5	10	190	
2	10	20	180	
3	15	30	170	200 $\mu$ l
4	25	50	150	
5	35	70	130	
6	50	100	100	

### iii) SUERO

1. De una dilución 1:100 se tomó 0.1 ml + 0.1 ml de agua  
 Puede modificarse la dilución de acuerdo a la concentración de proteínas e la muestra.

2. Se agregó 1 ml de solución C, se esperaron 10 min.
3. Se agregó 0.1 ml de solución D, se espera 30 min. después de haber agitado al momento de poner la solución D.
4. Se leyó a 660 nm y se expresaron los resultados en mg/dl.

#### ORINA

1. Se precipitaron las muestras a procesar con TCA al 10%  
200 µl de orina + 600 µl de TCA al 10% y se agitó
2. Se centrifugaron 10 - 15 min. a 2200 rpm.
3. Se retiró el sobrenadante
4. Se adicionó al precipitado 1 ml de TCA y se agitó
5. Se volvió a centrifugar, los lavados se repitieron hasta que el precipitado quedara blanco.
6. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200 µl de NaOH 0.5 N.
7. Se realizó la dilución correspondiente; para las ratas con SN fué desde 1:50 hasta 1:250 en el período crítico y para las ratas control 1:10.
8. Se agregó 1 ml de solución C, se esperaron 10 min. y se adicionó 0.1 ml de solución D, se esperaron 30 min. y se leyó a 660 nm.

## DETERMINACION DE 25 (OH)D

Adaptada a microtécnica.

-Se colocaron 0.250 ml de suero y se agregó 2,000 cpm de  $H^3$ -25 (OH)D<sub>3</sub>/ 50 µl más 2.750 ml de solución salina al 0.9 %.

- Se reposó 30 min. a temperatura ambiente y se adicionó 3 ml de acetonitrilo (grado HPLC) y se agitó por 30 seg. en el vortex.

- Se centrifugó 15 min. a 2,500 rpm a 4 °C:

- A (activar)

- B Se transfirió el sobrenadante al cartucho de sílica C<sub>18</sub> previamente activada.

Se lavó el tubo con 1.0 ml de solución salina al 0.9 % y se eluyó con 3.0 ml de metanol grado analítico: agua (65:35)

- El siguiente paso fué desechar.

- C se agregó 3 ml de acetonitrilo HPLC y se colectó en tubo la 25 (OH)D<sub>3</sub>

- Se secó con nitrógeno a 25 °C en baño de agua y en campana de extracción. se resuspendio en 500 µl de etanol bidestilado al 99 %.

- Del paso anterior se toman 100 µl para cuantificar por duplicado en tubos borosilicados y que puede servir para ensayo de la proteína acopladora a vitamina D (DBP) y 250 µl para calcular el % de recuperación en un frasco para contar radioactividad.

- Los tubos A,B y C son de desecho, lavado-desecho y para coleccionar la 25 (OH)D<sub>3</sub>, respectivamente.

## TECNICA PARA CALCIO SERICO Y URINARIO

### SOLUCION STOCK DE CALCIO:

500 mg de carbonato de calcio/l

A 1,249 g de  $\text{CaCO}_3$  se añadió 50 ml de agua desionizada, seguido de esto añadir gota a gota en volumen mínimo de HCl (aprox. 10 ml). Hasta completar la disolución de  $\text{CaCO}_3$ , aforar a un litro de agua.

### SOLUCION STOCK DE LANTANO ( $\text{La}^{+++}$ )

Lantano 50,000 mg/l

Disolver 58.64 g de  $\text{La}_2\text{O}_3$  con 50ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , añadir lentamente y con cuidado aprox. 250 ml de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  para disolver el  $\text{La}_2\text{O}_3$ , aforar a un litro.

### SOLUCIONES STANDARD DE $\text{Ca}^{2+}$

A partir de las soluciones stock preparar soluciones standard de 5,4,3,2 y 1 ppm de  $\text{Ca}_2$  aprox. mg/l

Para preparar las soluciones standard de calcio para suero:

#### STD 5 mg/l

Tomar 1 ml de solución stock de  $\text{Ca}^{2+}$  y diluirlo a 100 ml (aforar).

#### STD 4 mg/l

Tomar de la solución stock 10 ml, aforar a 100 ml.

#### STD 3 mg/l

Tomar 3 ml de la solución de 5 mg/100 ml de  $\text{Ca}^{2+}$  y aforar a 50 ml.

**STD 2 mg/l**

Tomar 2 ml de la solución 5 mg/100 ml de  $\text{Ca}^{2+}$  y aforar a 50 ml.

**STD 1 mg/l**

Tomar en un matraz de 50 ml, de solución de 5 mg de  $\text{Ca}^{2+}$ /100 ml y aforar a 50 ml.

**NOTA.**

Todos los estándares deberán tener una concentración de lantano para sueros del 0.15 y los estándares para orinas del 0.5 %.

Por lo tanto para los estándares de suero, antes de aforar se agregará 1 ml de solución stock de lantano (5 % de lantano) para aforar a 50 ml.

## 6.6. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados estan expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estandar. Se hicieron análisis de varianza (ANDEVA) con el propósito de investigar si habia grupos diferentes del control. El ANDEVA se realizó usando una calculadora Hewlett Packard modelo 41 CV.

## 6.7. PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD

a) Interanálisis: Se realizó la determinación de cada uno de los analitos anteriormente mencionados de una misma mezcla de sueros y orinas de ratas normales en diferentes ensayos.

b) Intraanálisis: Se realizó la determinación de los analitos anteriormente mencionados de una misma mezcla de sueros y orinas de ratas normales, siete veces y cinco veces, respectivamente, dentro de un mismo ensayo.

Para los dos grupos mencionados anteriormente se calculó el coeficiente de variación.

## VII. RESULTADOS



## VII. RESULTADOS

Todas las ratas inyectadas con ANP presentan edema, hidroxiprolinuria y fosfaturia de forma masiva, ligera hipocalciuria, hipocalcemia (día 2), hipoproteinemia (días 4 y 17), hipofosfatemia (día 12), hipofosfatasia (días 2-26), disminución en niveles séricos de 25 (OH)D (días 6 y 12). La creatinina sérica únicamente se encontró aumentada el día 6.

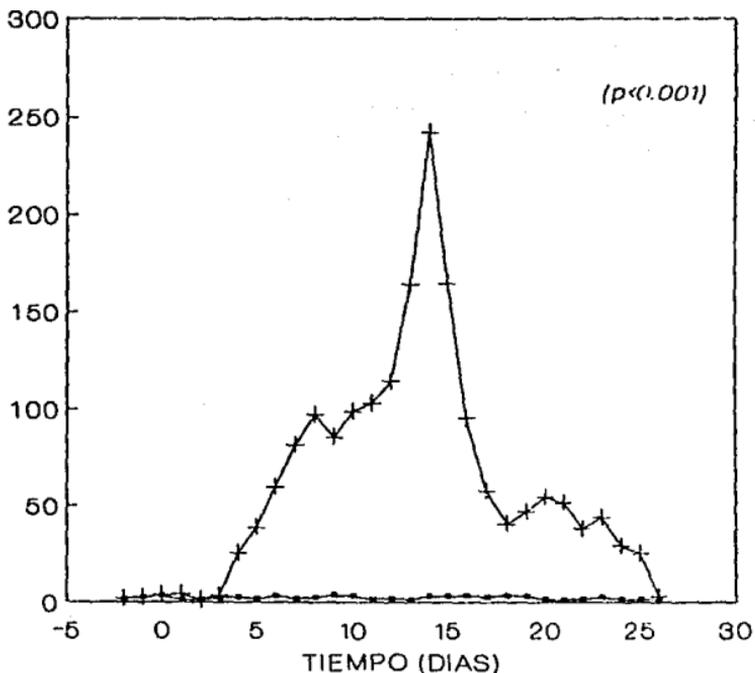
### DETERMINACIONES URINARIAS

**PROTEINAS.** Gráfica No. 1. La proteinuria empieza cuatro días después de la inyección de ANP, encontrándose un valor máximo el día 14 ( $241.95 \pm 28.83$  vs.  $3.31 \pm 1.92$  mg/vol del control), posteriormente cae hasta valores de 30-40 mg/vol desde el día 17 llegando a valores similares al grupo control al final del estudio.

**HIDROXIPROLINA.** Gráfica No. 2. Los niveles urinarios de hidroxiprolina aumentan desde el tercer día de estudio mostrando un pico máximo el día 14 ( $162 \pm 52.60$  vs.  $3.87 \pm 2.02$  mg / g de Cr del control) para posteriormente disminuir de 20-25 mg / g de Cr sin llegar a valores similares al grupo control al final del estudio.

**FOSFORO.** Gráfica No. 3. se observa que el fósforo urinario aumenta desde el tercer día para tener un pico de excreción máxima el día 8 ( $165.22 \pm 52.60$  vs.  $3.39 \pm 1.59$  mg/vol del control) posteriormente este analito cae

## EXCRECION URINARIA DE PROTEINAS (mg/vol)



—●— CONTROLES    —+— S.N.

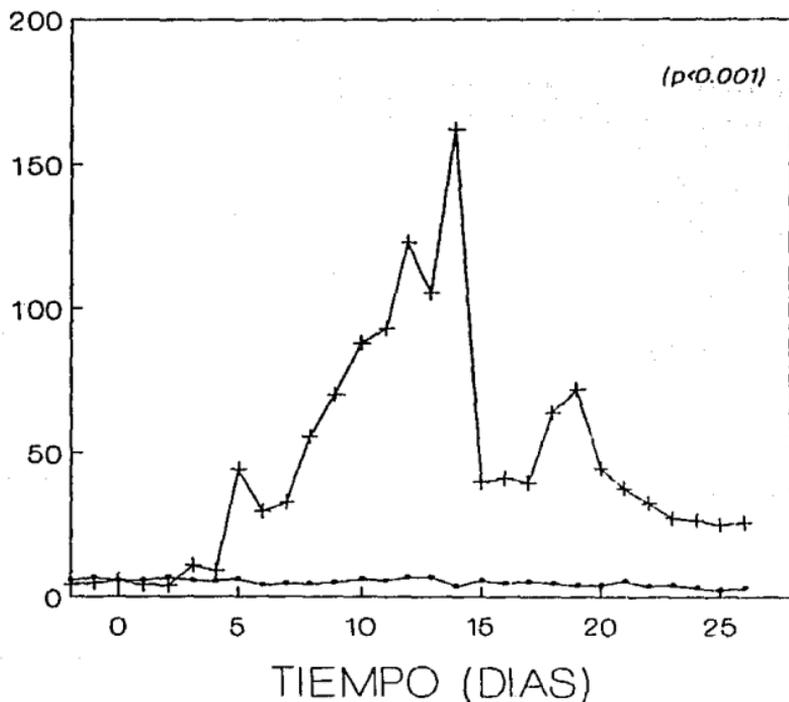
CUSP641204

GRAFICA No. 1

## VIII. DISCUSION DE RESULTADOS



# EXCRECION URINARIA DE HIDROXIPROLINA (mg/g Cr)

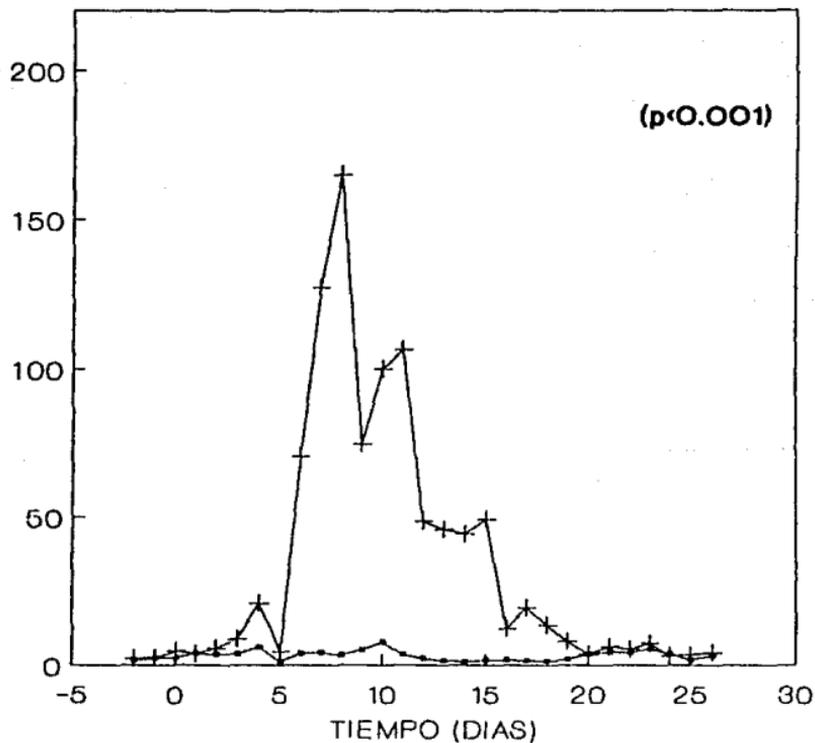


—●— Controles    —+— S.N.

CUSP641204

GRAFICA No.2

# EXCRECION URINARIA DE FOSFORO (mg/vol)



—●— CONTROLES      —+— S. N.

CUSP641204

**GRAFICA No.3**

gradualmente hasta llegar a valores control desde el día 19 y permaneciendo así hasta el día 26.

CALCIO. Gráfica No. 4. Se observa hipocalciuria desde el segundo día de aplicación de la inyección de ANP y un valor mínimo en el día 9 ( $0.160 \pm 0.06$  vs.  $0.909 \pm 0.303$  del control), posteriormente se aprecia un ligero aumento en la excreción urinaria de calcio sobre todo en el día 19 para en el día 23 y hasta el final del estudio permanecer con valores similares al control.

#### Determinaciones en suero.

PROTEINAS. Gráfica No. 5. Se observó hipoproteïnemia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ) los días 6 y 12 con respecto al grupo control.

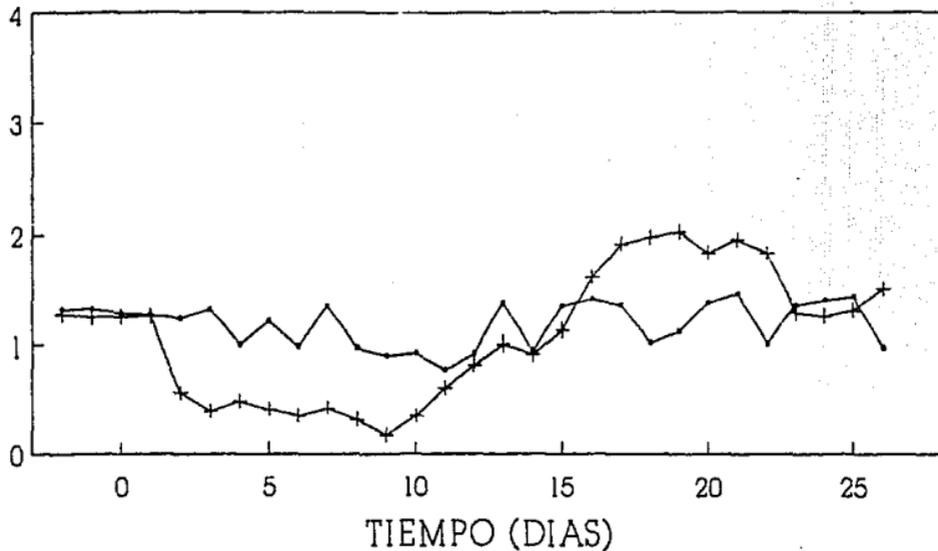
Para el día 6 se observaron  $5.68 \pm 0.79$  vs.  $9.30 \pm 0.91$  mg/dl del control y para el día 12 ( $5.94 \pm 1.75$  vs.  $9.14 \pm 1.82$ ) del control. El día 2 y 26 muestran valores similares los dos grupos.

FOSFORO. Gráfica No. 6. Todos los días que duró el estudio se observaron valores similares entre el grupo experimental y el grupo control, excepto en el día 12 que se muestran valores diferentes ( $5.50 \pm 1.11$  vs.  $8.47 \pm 2.04$  mg/dl del control) y con una  $p < 0.001$ .

CALCIO. Gráfica No. 7. Se mostró diferencia significativa ( $p < 0.005$ ) en el día 6, manifestándose como hipocalcemia ( $8.97 \pm 0.98$  vs.  $10.49 \pm 0.70$  mg/dl del control).

# EXCRECION URINARIA DE CALCIO

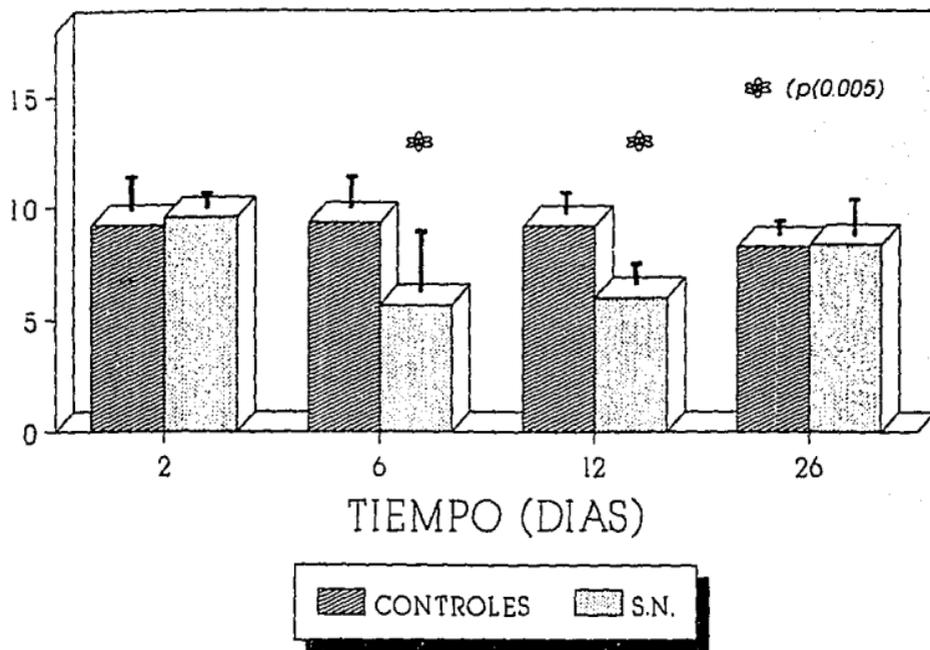
mg/vol



— CONTROLES    + S.N.



# PROTEINAS TOTALES SERICAS (mg/dl)



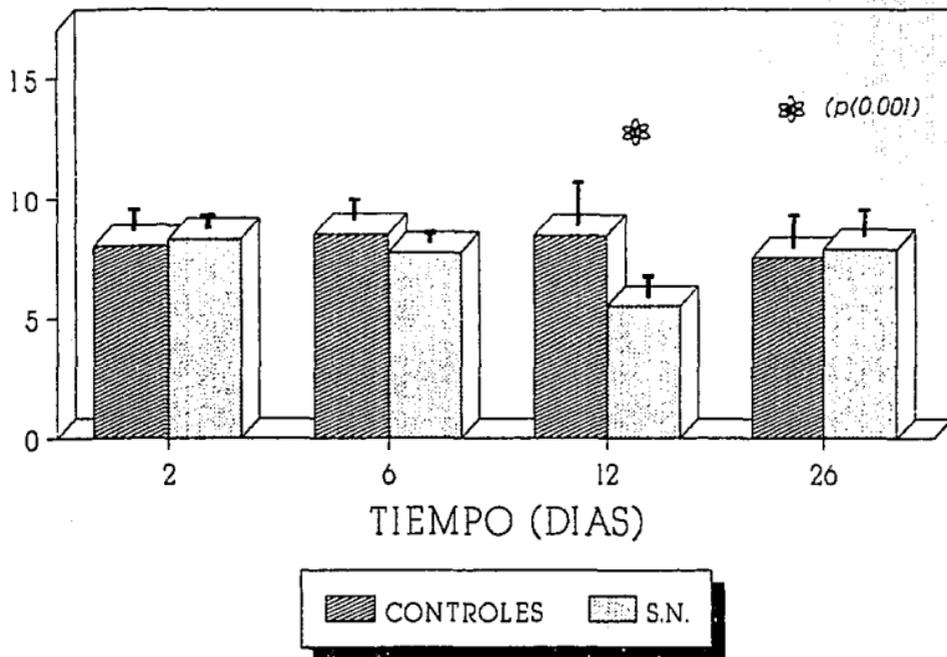
25(OH)D. Gráfica No. 8. Se observó que hay una disminución en los valores séricos de este analito lo que concuerda con hallazgos anteriores en padecimientos con SN (41-45). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.02$ ) los días 6 y 12 ( $12.39 \pm 0.38$  vs.  $16.08 \pm 2.31$  ng/ml del control) y ( $13.08 \pm .041$  vs.  $16.40 \pm 1.91$  ng/ml del control) respectivamente.

FOSFATASA ALCALINA. Gráfica No. 9. Se observó a lo largo del estudio hipofosfatasa mostrandose valores significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ) con respecto a los controles. El día que se observó marcadamente una disminución en los valores de este analito fué el día 6 ( $72.0 \pm 16.99$  vs.  $516.7 \pm 121.8$  U/L del control).

AMPc. Gráfica No. 10. Permaneció sin cambio a lo largo del estudio.

CREATININA. Gráfica NO. 11. Permaneció sin cambio a lo largo del estudio, excepto el día 6 en el cual los dos grupos muestran ser diferentes ( $p < 0.005$ ). El grupo experimental muestra  $0.62 \pm 0.17$  vs.  $0.38 \pm 0.04$  mg/dl del control.

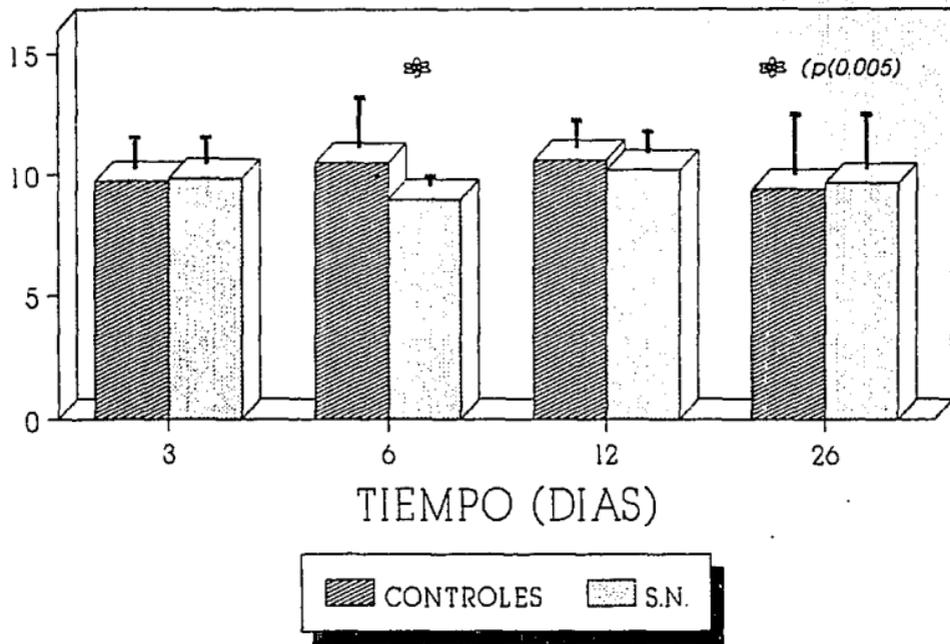
# FOSFORO SERICO (mg/dl)



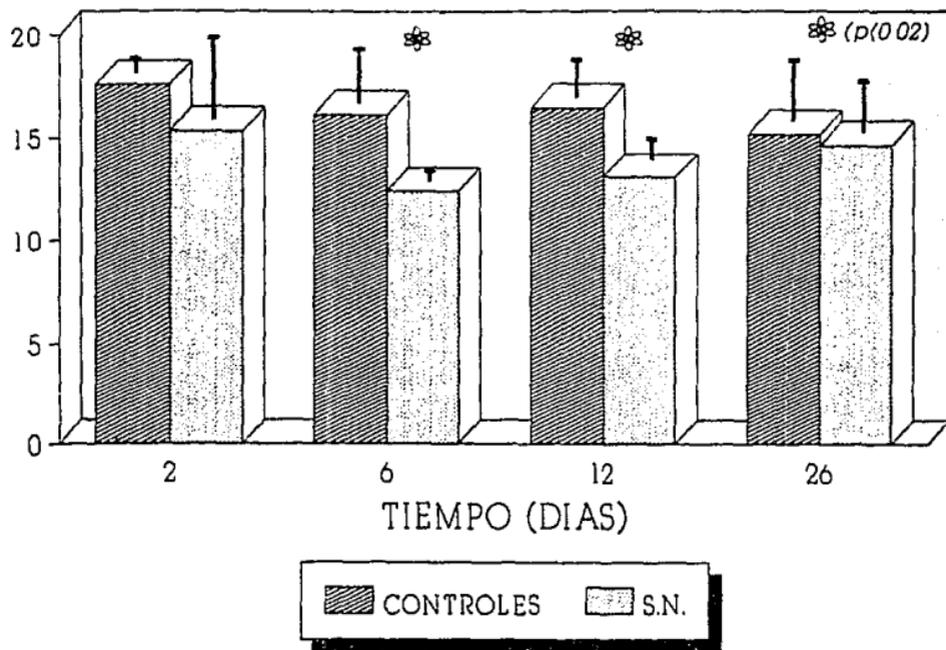
CUSP641204

GRAFICA No.6

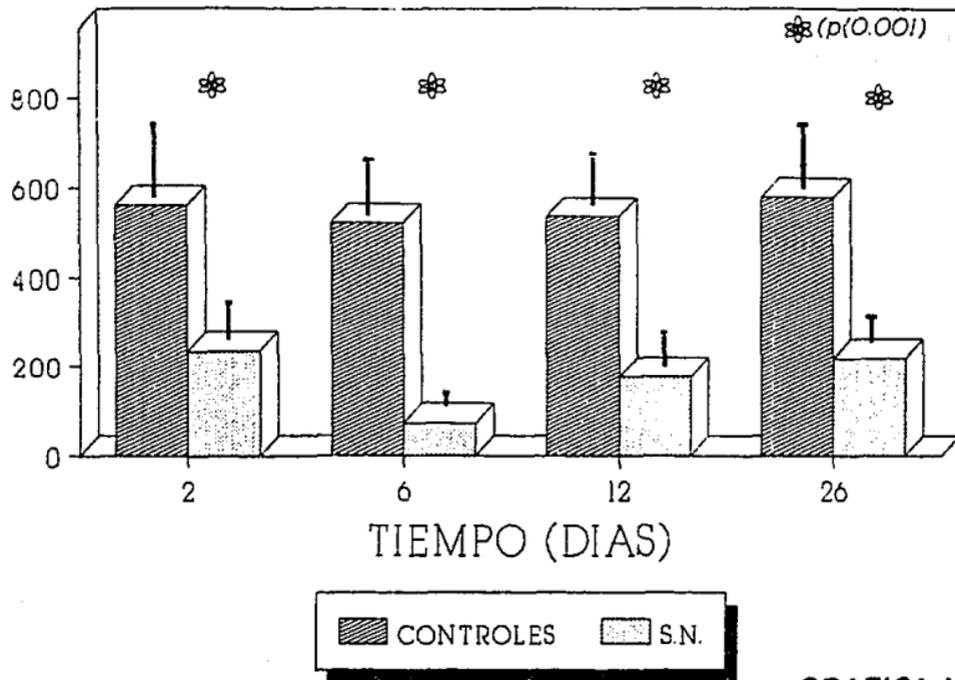
# CALCIO SERICO (mg/dl)



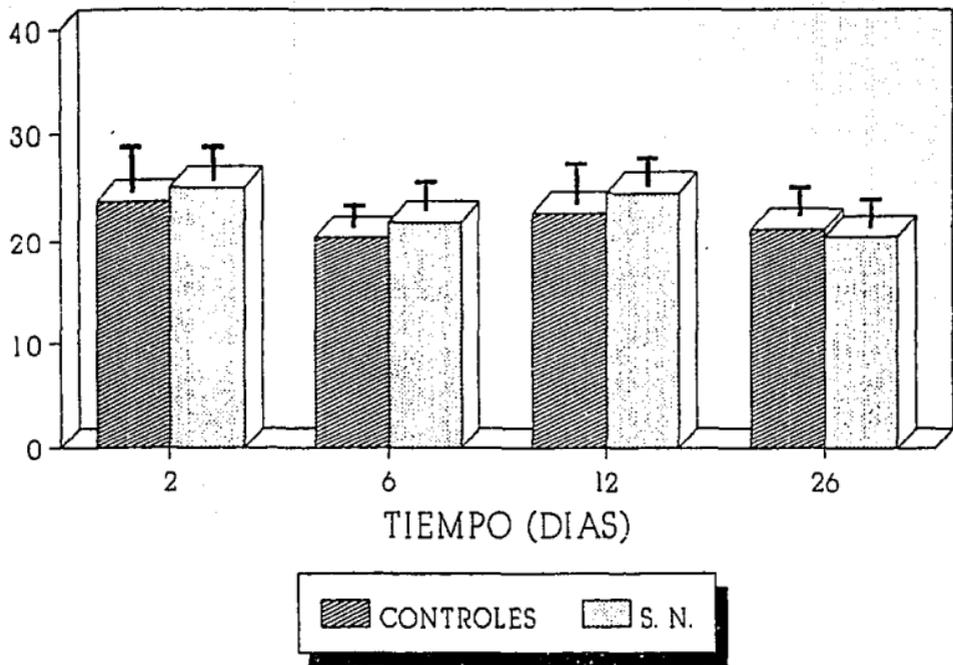
# 25OHD EN SUERO (ng/ml)



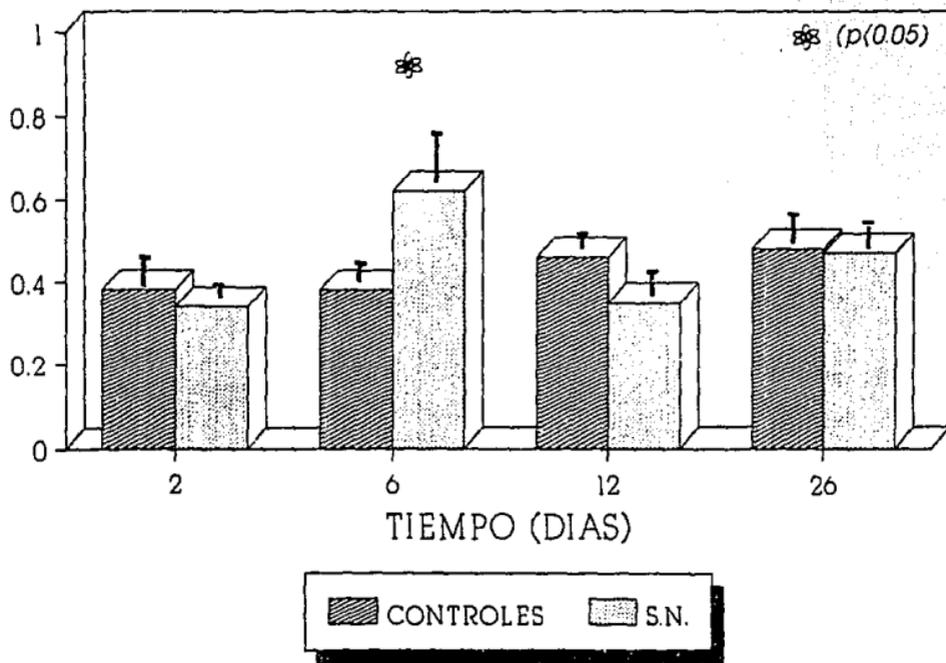
# FOSFATASA ALCALINA (U/L)



# AMPC PLASMÁTICO (pmol/ml)



# CREATININA SERICA (mg/dl)



## VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Al segundo día de la inyección del ANP la Palk sérica y calcio sérico disminuyen, al tercer día empieza la excreción urinaria tanto de OHpr como de fósforo, en el cuarto día, las proteínas totales empiezan a excretarse por orina para que en el sexto día los niveles séricos de proteínas totales, Ca, 25 (OH)D y de Palk estén por debajo de los valores normales. En este mismo día se observó que la Cr se encuentra aumentada. En el octavo día la excreción urinaria de P es la más alta y en el día 14 alcanzaron su pico máximo de excreción urinaria de OHpr y de proteínas.

En general se pudo observar que el periodo crítico para las ratas del grupo experimental fué entre los días 6 y 14 después de la inyección del ANP, ya que es la etapa en donde puede observarse la mayor cantidad de alteraciones sufridas en el metabolismo de la vitamina D y en el sistema mineral.

Se observó que las ratas del grupo experimental presentan proteinuria e hipoproteinemia (días 6 y 12) indicando un daño renal severo y comprobándose así que las ratas estaban intensamente nefróticas. La hipocalcemia observada (día 6) se describe como una complicación del SN (2,8,5,6) y se atribuye a una deficiencia de vitamina D. Probablemente es consecuencia de la pérdida en orina de proteína acopladora a vitamina D (DBP),

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Otra explicación más clara de que en éste mecanismo disminuya el calcio sérico es el que aproximadamente un 45% del calcio se encuentra unido a proteínas, principalmente albúmina, que se excretan en la orina en el SN, de allí que el nivel sérico de calcio disminuye.

Debido a la pérdida urinaria de calcio se estimula la actividad de la PTH, favoreciendo la resorción de calcio filtrado e incrementando la resorción oséa. Se ha observado en pacientes con SN que también disminuye  $1,25(OH)_2D_3$  para favorecer indirectamente la absorción intestinal de minerales (54).

La hipocalciuria observada en las ratas del grupo experimental corresponde con las observaciones en humanos con SN ya que también excretan pequeñas cantidades de calcio urinario (54,56).

En ratas se ha observado que altas ingestas de cloruro de sodio son factor de riesgo para desarrollar osteopenia. El efecto resultante se observa como una disminución en la formación oséa o un aumento en la resorción oséa. En este caso la excreción urinaria junto con la de calcio son altas; esto es un efecto de competencia entre los dos para su resorción en el túbulo renal (57).

Se ha observado que la retención de sodio no está relacionada con la hipoproteïnemia ni con la proteinuria (4).

Por otro lado se observó que el aumento de OHpr

urinaria obedece a que la resorción de colágena ósea es alta, esto indica que hay un índice de resorción alto (52).

Presumiblemente la PTH (que no fué posible determinarla) se activaría y se observarían valores altos (56) y junto con ella un aumento en los valores de AMPc urinario.

Como se mencionó con anterioridad los valores de 25 (OH)D se encuentran disminuidos, la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no se determinó.

Se puede observar que en las gráficas mostradas anteriormente se observa que hay un fuerte impacto sobre el esqueleto como respuesta a la disminución de 25, (OH)D y por ende de sus metabolitos, asociado a un defecto en la mineralización del osteoide (debido a un aumento en la excreción urinaria de hidroxiprolina) que puede llevar a la osteomalacia, disminución en la absorción intestinal de calcio y una disminución a la respuesta calcémica a PTH.

## IX. CONCLUSIONES



## IX. CONCLUSIONES

Se observó que las ratas inyectadas con ANP desarrollan un franco SN, reflejado en la excreción urinaria de OHpr, Ca, P y PT, lo que demuestra ser un modelo experimental excelente para estudiar éste padecimiento y compararlo con el que se presenta en humanos.

Tanto en humanos como en ratas con SN se muestran alteraciones semejantes, por lo que los datos obtenidos en el modelo experimental podrían extrapolarse en humanos. Los datos obtenidos sugieren un fuerte impacto sobre el esqueleto, debido a un alto índice de resorción ósea de colágena y a una pérdida masiva en orina de OHpr aunado a una deficiencia en los niveles séricos de 25 (OH)D.

Los valores de Palk mostraron un total abatimiento, que posiblemente se deba a un efecto directo del ANP sobre el hígado, originando una deficiencia en la producción de sales biliares necesarias para la absorción de 25 (OH)D y por ende valores disminuidos de la misma.

## X. REFERENCIAS



## X. REFERENCIAS

1. Bernard DB. metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology an complications. En Brenner BM ,Stein JH, eds. Contemporary issues in nephrology. vol. 9, New york, Churchill Livingstone, 1982:85-120
2. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. Kidney Int 1988;33:1184-202
3. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera- Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En Nefrología, Martínez Maldonado M, Rodicio Diaz JL, Herrera Acosta J, Eds. 1992. En Prensa
4. 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 the sodium retention. Rev Invest Clin 1990;42:29-38
5. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, López A, Tapia E, Uribe MC, Romero L, 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;42:120-26
6. Hoedemaeker PhJ. Experimental glomerulonephritis. En Nephrology, Editado por Davidson AM, Cambridge University Press, 1988;(1):424-26
7. Holick MF. En Endocrinology, editado por Leslie J y Groot 2nd ed. 1989;2(56):902-1226
8. Holick MF, Maclanghin JA, Clarck MB. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and physiological consequences. Science 1980;210:203-05
9. Pondchon G, Deluca HF. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. J Clin Invest 1977;7:283-87
10. Reynolds JJ, Habick MF, Deluca HF. The role of the vitamin. D metabolits in bone resorption. Calcif Tissue Res 1973;12:295-301

11. Price PA, The effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on the synthesis the vitamin D dependent protein of bone: En vitamin D, basic and clinical aspects. Kumar R, editado por The Hague, Nijhoff 1984:397-140
12. Zervekh JE, Sakhie K, Pack CyC. Short term 1,25 dihydroxy vitamin D3 adminnestation raises serum osteocalcin in patients with postmenopausal osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 1985;60:615-17
13. Deluca HF. The metabolism, physiology and function of vitamin D. En : vitamin D, basic and clinical aspects. Kumar R, editado por The Hague, Nijhoff 1984:1-68
14. Goldstein DA, Haldiman B, Sherman, Norman AW. Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function J Clin Endocrinol Metab 1981;52:116
15. Collip JB. The extraction of parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and wich regulates the level of blood calcium. J Biol Chem 1925;63:395-438
16. Alba G. Radioinmunoanálisis del AMPc urinario y su aplicación en el diagnóstico clínico de padecimientos paratiroides. Tesis de Licenciatura Química, Universidad Motolinia inc. UNAM, 1985
17. Kivirikko KI., Urinary excretion of hydroxyproline in health and disease. Int Rev Connective Tissue Research 1970;5:93-150.
18. Adams Elijah. Metabolism of proline and of hydroxyproline. Int Rev Connective Tissue Research 1970;5:2-82.
19. Bydlowsky SP, Stivaletti VLG, Douglas CR. Effects of mast cell inhibition on plasma and aortic content of lipids, hexosamine and hydroxyproline in rats. Role of thyroid gland. Pharmac 1986;17: 247-250.
20. Goulding A, McIntosh J. Effects of NaCl on calcium balance, parathyroid function and hydroxyproline excretion in prednisolone-treated rats consuming low calcium diet. J Nutr 1986: 1037-1044.
21. Laitinen Ossi. Clinical application of urinary hydroxyproline determination. Acta Med Scand 1974 suppl 577: 8-50.

22. Yamada-Sadako, Aoto Yuji. Urinary hydroxyproline and hydroxylisine excretions in relation to hepatic hydroxyproline content in chronic liver disease. Clin Biochem 1989;22:389-393.
23. Lim P, Jacob E, Tock EPC, Pwee S. Calcium and phosphorus metabolism in nephrotic syndrome. Q J Med 1977;46:327-338.
24. Stanbury SW, Macaulay D. Defects of renal tubular function in the nephrotic syndrome. Q J Med 1957;26:7-30.
25. Stickler GB, Hayles AB. Renal tubular dysfunction complicating the nephrotic syndrome. Pediatrics 1960;75-85.
26. Freudlich M., Borsoigne JJ. Bone modulating factors in nephrotic children with normal glomerular filtration rate. Q J Med 1985;76:280-285.
27. Albright F, Reifenstein EC. The parathyroid glands and metabolic bone disease. Baltimore, Williams and Wilkins, 1948, p.309.
28. Shepard RM, Horst PL, Hamstra AJ. Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. Biochem J 1979;182:55-69
29. Alon U., Chan JCM. Calcium and vitamin D homeostasis in the nephrotic syndrome: Current status. Nephron 1984;36:1-4.
30. Hooft C., Vermassen A. On calcemia and phosphatemia in the nephrotic syndrome. Helv paediat acta 1960;15:437-450.
31. Emerson K., Beckman WW. Calcium metabolism in nephrosis I. A description of an abnormality in calcium metabolism in children with nephrosis. J Clin Invest 1945;24:564-572.
32. Alon U., Chan JCM. calcium and vitamin-D metabolism in nephrotic syndrome. Int J Pediat Nephrol 1983;4:115-118.
33. Cerda JJ, Toskes PP, Shopa N. The relationship of the serum alkaline phosphatase to urinary hydroxyproline excretion in liver and bone disease. Clin Chim Acta 1970;27:437-443.

34. Chen PS , Toribara TY , Warner H. Microdetermination of phosphorous. Anal Chem 1956;28:1756-1758

35. Korkor J, Schwartz M. Absence of metabolic bone disease in adult patients with the nephrotic syndrome and normal renal function. J Clin End Met 1983;8:496-500

36. Matsuky H, Kasuga H, An improved method for analysis of urinary hydroxyproline by an automated analyzer. J Exp Clin Med 1984;9:421-28

37. Johnston CS, Cartee GD. Effect of ascorbic nutriture on protein-bound hydroxyproline in guinea pig plasma. J Nutr 1985;115:1089-93

38. Manual: Model 2380 Atomic absorption spectrophotometer. Norwalk, Connecticut, USA (1986)

39. Goldstein DA, Oda Y. Blood levels of 25-hydroxy vitamin D in nephrotic syndrome. Ann Int Med 1977;87:664-67

40. Sato KA, Lemann JM. Urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in health and the nephrotic syndrome. J Lab Clin Med 1982;99:325-30

41. Lambert PW, De oreo PB. Urinary and plasma vitamin D3 metabolites in the nephrotic syndrome. Met Bone Dis & Rel Res 1982;4:7-15

42. Auwerx J, De Keyser L. Decreased free 1,25- dihydroxy cholecalciferol index in patients with the nephrotic syndrome. nephron 1986;42:231-35

43. Chan YL, Mason RS. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. Kidney International 1983;24:336-41

44. Barragry JM, Carter ND. Vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. Lancet 1977;629-32

45. Schmidt-Gayk H. 25-hydroxy-vitamin-D in nephrotic syndrome. Lancet 1977,2:105-08

46. Colston K, Williams NJ. Studies on vitamin D binding protein in the nephrotic syndrome. Clin Chem 1985;31/5:718-21

47. Lowry DA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:267-275

48. Bessey O, Lowry OH, Brock MJ. Method for the determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321-29
49. Podephant J, Larsen NE, Chrstansen C. An easy and reliable method for determination of urinary hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1984;142:145-48
50. Miyakawa T. Studies on the alterations in glucosamine, galactosamine and hydroxyproline contents of the kidney, liver, serum and urine in experimental renal disease. *Acta Med Biol* 1967;15(3): 147-67
51. Sheila K, Canalis Ernesto. Analysis of hydroxyproline by High Performance Liquid Chromatography and its application to collagen turnover studies in bone cultures. *Calcif Tissue Int* 1989;44:421-24
52. Lowry M, Douglas EH, Brosnan JT. Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: Distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism* 1985; 34:955-61
53. Hsu CH, Patel S. Factors influencing calcitriol metabolism in renal failure. *Kidney Int* 1990;37:44-50
54. Massry SG, Goldstein DA. Calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome. A state with vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 1978;31:1572-80
55. Garcia JC. Alteraciones de los minerales y enfermedades paratiroides y óseas metabólicas. En : Manual de terapéutica médica, 7a. ed. Dunagan C, editado por Salvat. Barcelona 1991:521-61
56. Jones H, Peters DK, Morgan GA, Mallick NP. Observations on calcium metabolism in the nephrotic syndrome. *Q J Med* 1967;36:301-20
57. Goulding A, Gold <sup>45</sup>E. effects of dietary NaCl supplementation on bone <sup>45</sup>Ca up take in the rat. *Horm Metab Res* 1988;20:743-45
58. Goulding A, McIntosh J. Hydrochlorothiazide lowers urinary hydroxyproline in parathyroidectomized rats. *Horm Metab Res* 1985;17:50-1
59. Prockop DJ, Udenfriend S. A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal Biochem* 1960;1:228-39