

00361

35  
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ALTERACIONES METABOLICAS DE ZINC Y COBRE EN EL  
SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL**

**TESIS CON  
FALLA DE CREEN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS ( B I O L O G I A )**

**P R E S E N T A**

**GERARDO ANDRES TORRES RODRIGUEZ**



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.

# I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN .....	1
ABREVIATURAS.....	iv
I INTRODUCCION .....	1
1. FUNCIONES GENERALES DE ZINC Y COBRE .....	1
1.1 ABSORCION Y EXCRECION DE ZINC Y COBRE .....	6
1.2 TRANSPORTE DE ZINC Y COBRE .....	9
1.3 DEFICIENCIA DE ZINC Y COBRE .....	14
2. SINDROME NEFROTICO .....	20
2.1 ESTRUCTURA DEL GLOMERULO .....	26
II ANTECEDENTES .....	29
III OBJETIVOS .....	32
IV HIPOTESIS .....	32
V MATERIALES Y METODOS .....	33
1. REACTIVOS .....	33
2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	33
3. CARACTERIZACION DEL SINDROME NEFROTICO .....	35
3.1 DETERMINACION DE PROTEINAS EN SUERO Y ORINA .....	35
3.2 DETERMINACION DE ALBUMINA POR ELECTROFORESIS EN SUERO Y ORINA .....	36
3.3 COLESTEROL, UREA Y CREATININA EN SUERO .....	37
4. DETERMINACION DE MINERALES POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA .....	38
4.1 CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS .....	38
4.2 ANALISIS CUANTITATIVO POR ABSORCION ATOMICA .....	44
4.3 DETERMINACION DE ZINC Y COBRE EN EL MATERIAL BIOLOGICO .....	45

VI	RESULTADOS .....	46
1.	PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD .....	46
2.	PESO CORPORAL Y CONSUMO DE ALIMENTO .....	46
3.	DESARROLLO DEL SINDROME NEFROTICO .....	46
3.1	DETERMINACION DE ALBUMINA POR ELECTROFORESIS .....	50
4.	EXCRECION URINARIA Y NIVELES SERICOS DE ZINC .....	50
5.	CORRELACION ENTRE LA EXCRECION DE PROTEINAS Y ZINC EN ORINA .....	50
6.	EXCRECION URINARIA Y NIVELES SERICOS DE COBRE .....	50
7.	CORRELACION ENTRE LA EXCRECION DE PROTEINAS Y COBRE EN ORINA .....	55
8.	CONTENIDO DE MINERALES EN LOS TEJIDOS .....	55
VII	DISCUSION .....	59
VIII	CONCLUSIONES .....	64
IX	BIBLIOGRAFIA .....	65

## RESUMEN

Existe evidencia que los pacientes con síndrome nefrótico (SN) tienen bajos niveles de zinc, cobre y hierro y de sus proteínas transportadoras, albúmina, ceruloplasmina y transferrina, probablemente porque se pierden en la orina. También esto se ha observado en estos pacientes un considerable aumento en la excreción urinaria de cobre y hierro y una estrecha correlación entre la excreción de estos minerales y la proteinuria. En humanos la albúmina y la ceruloplasmina son las principales proteínas transportadoras de zinc y cobre por lo que se espera exista una disminución de la concentración de estos minerales en suero en estados hipoalbuminémicos y de proteinuria severa. Sin embargo, aunque se ha encontrado consistentemente una reducción en los niveles de zinc en plasma, leucocitos y eritrocitos de pacientes con SN algunos autores encuentran una excreción urinaria normal de zinc.

Por otro lado, en ratas con SN inducido con aminonucleósido de la puromicina se ha encontrado un aumento en la excreción urinaria y disminución en los niveles circulantes de ceruloplasmina, sin embargo, no se han medido los niveles de cobre en suero orina y tejidos de estas ratas. En la nefrosis experimental solamente se ha estudiado los niveles de zinc en testículo, riñón músculo y hueso, además no se ha evaluado el impacto de la deficiencia de cobre y zinc en los tejidos. Por lo tanto, el propósito específico de este estudio es

resolver algunas de los siguientes interrogantes en ratas con SN inducido con ANP:

- Existe disminución en los niveles de zinc y cobre en el suero ?.
- Existe pérdida urinaria de zinc y cobre en el SN ?.
- La pérdida de zinc y cobre en la orina se correlaciona cuantitativamente con la excreción de proteínas ?.
- Existen cambios en los niveles de cobre y zinc en los tejidos de las ratas con SN ?.

Con este fin se realizó el siguiente diseño experimental. Se usaron ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se dividieron en 2 grupos; grupo con SN que se indujo con una inyección subcutánea de ANP a una dosis de 15 mg /100 g de peso, y grupo control alimentado la par, el cual también recibió una inyección de vehículo (solución salina al 0.9 %) y se les restringió el alimento a la cantidad ingerida por las ratas con SN. De esta manera ambos grupos consumieron la misma cantidad de alimento y por lo tanto de zinc y cobre.

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas para la recolección de la orina y el registro del consumo de alimento. A la orina se le midió el volumen y se determinó el contenido de los minerales. Las ratas se sacrificaron por decapitación el día diez para la obtención del suero y los tejidos, la determinación del contenido de minerales y la evaluación de la función renal. Los minerales se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica.

El perfil de peso corporal fué similar en los dos grupos. Las ratas con SN presentaron proteinuria importante desde el día 3 hasta el último día de estudio, además para el día 10 las ratas con SN mostraron proteinuria, hipoproteinemia, albuminuria, hipalbuminemia, hipercolesterolemia, así mismo aumento en la creatinina y urea del suero.

Por otro lado la excreción urinaria de zinc y cobre aumentó significativamente a partir del día 3 y 1 respectivamente en el grupo nefrótico. Se piensa que la excreción urinaria elevada de cobre y zinc se debe probablemente a la proteinuria ya que ambas variables mostraron una correlación positiva con la proteinuria, además de encontrarse una disminución significativa en suero de estos minerales en el día 10. El contenido de zinc disminuyó en pulmón y bazo y se mantuvo normal en testículo, corazón, hígado, riñón y cerebro. El contenido de cobre disminuyó en riñón, hígado y cerebro y se mantuvo normal en pulmón, testículo, corazón y bazo.

Apparentemente los cambios en los niveles circulantes y en la excreción urinaria de los minerales trajo como consecuencia disminución en la concentración de zinc en pulmón y bazo y de cobre en riñón, hígado y cerebro.

## ABREVIATURAS

ADN .....	Acido desoxirribonucleico.
ANP.....	Aminonucleósido de puromicina.
ARN .....	Acido ribonucleico.
Cu.....	Cobre.
Cp.....	Ceruloplasmina.
EAA.....	Espectrofotómetro de absorción atómica.
ECA.....	Enzima convertidora de angiotensina.
EDTA.....	Acido etilendiamintetracético.
GSH-Px .....	Glutati6n peroxidasa.
HMG-Co-A.....	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.
IgG, M, A.....	Inmunoglobulinas G, M, A.
LD.....	Lámina densa.
LRE.....	Lámina rara externa.
LRI.....	Lamina rara interna.
MBG.....	Membrana basal glomerular.
n.....	Número de determinaciones o animales.
NAD.....	Nicotín adenín dinucleótido.
NADP.....	Fosfato de nicotín adenín dinucleótido.
OMS.....	Organizaci6n mundial de la salud.
SN .....	Síndrome nefrótico.
SOD.....	Superóxido dismutasa.
Zn .....	Zinc.
ZnCuSOD.....	Superóxido dismutasa dependientes de Zn Y Cu

## I INTRODUCCION

### 1. FUNCIONES GENERALES DEL ZINC Y COBRE

Se ha demostrado que el zinc es un nutrimento esencial para una gran variedad de especies animales, plantas y microorganismos. El zinc es requerido en la dieta de vertebrados en pequeñas cantidades: 12 mg Zn/kg de dieta en las ratas, 25 a 50 mg Zn/kg de dieta para pollos, 15 a 30 mg Zn/kg de dieta en las truchas, y 15 mg Zn/día en humanos (1-3).

Las funciones biológicas del zinc son muy diversas. El zinc proporciona integridad estructural para las enzimas y/o participa directamente en la catálisis. En la tabla 1 (4-6) se muestra algunas de las principales metaloenzimas dependientes de zinc y su función fisiológica. El zinc juega un papel esencial en la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteína. También estabiliza las membranas celulares y polirribosomas durante la síntesis de proteínas (7,8). El zinc tal vez, cumpla una función fisiológica en el sentido del gusto; la gustina y el factor de crecimiento nervioso, que son dos metaloproteínas con zinc, se han aislado de saliva humana y murina, respectivamente (7). La movilización de vitamina A partir del hígado requiere zinc. La multiplicidad de funciones en las cuales el zinc está involucrado es claro debido al papel que juega este metal en sistemas de metaloenzimas específicos. El zinc tiene un papel importante en la formación del hueso, inmunidad celular, defensa generalizada del huésped y una amplia

Nombre común	Función	Ref
NAD, NADP deshidrogenasas	Transferencia de iones	4
Alcohol deshidrogenación <sup>u</sup>	Cataliza la deshidrogenación de etanol	4
DNA, RNA polimerasa	Replicación y transcripción de información genética	4
Anhidrasa carbonica	Cataliza la hidratación de CO <sub>2</sub>	4
Carboxipeptidasa	Proteólisis enzimática.	4
Enzima convertidora de angiotensina I	-----	5
Deshidrogenasa glutámica, lactica, malica.	-----	6
Acido amino levulinico deshidratasa	-----	6

-----  
 TABLA 1 METALENZIMAS DEPENDIENTES DE ZINC

variedad de factores relacionadas con el crecimiento de tejidos.

El zinc es también necesario para la actividad apropiada de las polimerasas de DNA y RNA. Es esencial para la espermatogonía y formación de óvulos. La insulina se almacena en las células beta del páncreas en forma de un hexámero junto con dos átomos de zinc (7).

Una consideración posterior sería entender el papel de las metaloenzimas de zinc en la multitud de trastornos por deficiencia de zinc.

El cobre es un elemento esencial requerido por todos los sistemas vivientes, más específicamente para unas 30 enzimas que usan cobre como un cofactor. Clasificado como un "metal traza," su impacto benéfico sobre las células ocurre en el rango micromolar. El cobre es también uno de los elementos más tóxicos. Esto lo coloca en un especial lugar sobre los sistemas que regularmente lo transportan en el organismo.

El cálculo de las necesidades de cobre en humanos se basa en estudios del equilibrio. A partir de estos estudios en adultos, se ha determinado que el cuerpo necesita 1.5 a 2.0 mg al día. Con base en estos datos, para permitir un margen de seguridad la Food and Nutrition Board ha recomendado para adultos una ingesta de 2 a 3 mg de Cu al día (7), la OMS (9) sugiere que 30 ug/Kg al día son adecuados para el varón adulto. En ratas los requerimientos para una dieta adecuada son de 6 a 8 mg de Cu/kg de dieta (10).

Experimentos sobre nutrición han mostrado claramente que el

cobre en la dieta se requiere para una gran variedad de funciones, incluyendo formación del hueso, función cardíaca, desarrollo de tejido conectivo, mielinización del cordón espinal queratinización, y pigmentación del tejido (11-13).

Al igual que el zinc la principal función del cobre es su participación en las metaloenzimas (Tabla 2) la cual involucra la transferencia de electrones y unión enzimática de oxígeno molecular como también su participación en el metabolismo del cobre hepático principalmente ceruloplasmina; superóxido dismutasa, cuya forma citoplasmática contiene zinc y cobre, es abundante en el hígado así como en otros tejidos, cataliza la dismutación del anión superóxido



Valentine y Pantoliano (19) han sugerido que la superóxido dismutasa puede estar relacionada con el metabolismo intracelular del cobre y zinc.

Otra enzima dependiente de cobre es la lisil oxidasa, esta es importante en la biosíntesis de tejido conectivo, su deficiencia probablemente contribuye en las lesiones que afectan el hueso y el tejido conectivo en animales deficientes de cobre, su actividad en el hígado está relacionado con la síntesis de colágeno durante la fibrosis hepática (20).

Actualmente se está estudiando la regulación de síntesis de las metaloenzimas de cobre, sin embargo aun no se conoce con certeza como y cuando el cobre se inserta dentro de la molécula intacta de apoenzima.

Nombre común	Función	Ref.
Citocromo C oxidasa	Transporte de electrones	14
Superoxido dismutasa	Atrapador de radicales libres	14
Tirosinasa	Producción de melanina	14
Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa	Producción de catecolamina	14,15
Lisil - oxidasa	Encadenamiento de colageno y elastina	14,16
Ceruloplasmina	Ferroxidasa, amino-oxidasa, transporte de cobre	14,17
Factor de coagulación V	Coagulación sanguinea	14,18

TABLA 2 METALENZIMAS DEPENDIENTES DE COBRE

## 1.1 ABSORCIÓN Y EXCRECIÓN DE ZINC Y COBRE.

A diferencia de la absorción de cobre, se piensa que la absorción de zinc está limitada principalmente al intestino delgado.

El sitio exacto de la absorción de zinc en el intestino delgado se desconoce. Sin embargo en experimentos con animales, se ha propuesto que la absorción se lleva a cabo a lo largo de toda la longitud del mismo (21). Datos recientes (8) sugieren que la absorción del zinc a través de la membrana con borde en cepillo puede ocurrir particularmente por un mecanismo regulado de difusión mediado por un transportador. Estos hallazgos sugieren que hay un mecanismo en la membrana con borde de cepillo que responden homeostáticamente al suplemento de zinc en la dieta. La cinética del transporte muestra evidencia de ambos procesos, pasivo (no mediado) y saturable (mediado).

Se ha informado frecuentemente que niveles altos de proteínas en la dieta estimulan la absorción de zinc, por el contrario la restricción de proteínas la disminuye (22). Giroux y Prakash (23) mostraron que algunas mezclas de ligandos zinc-aminoácidos (lisina, cisteína, glicina) estimulan la absorción. En algunos estudios se ha demostrado que la histidina incrementa la absorción de zinc (24,25), igualmente se ha sugerido que el ácido glutámico (26,27) es un importante ligando para la absorción de zinc.

Se han detectado grupos químicos de bajo peso molecular (8000 a 10000) y de captación de zinc en animales experimentales y en

la leche humana (28,29), y se cree que facilitan la absorción de zinc a partir de la luz intestinal. La absorción de zinc, al igual que la de hierro al parecer está controlada por el estado nutricional del sujeto respecto al mineral en cuestión. El mecanismo de control no se conoce con precisión, pero tal vez intervengan las metalotioneínas, que son proteínas solubles de bajo peso molecular. Se trata de proteínas citoplásmicas con un ritmo rápido de recambio y una alta afinidad por el zinc (además de cobre, cadmio y mercurio); su síntesis, puede inducirse por la administración parenteral u oral de zinc. Posiblemente una metalotioneína participe en la regulación homeostática del metabolismo y en la absorción del zinc suministrando una fuente de zinc en momentos de privación (30).

Estudios de perfusión con intestino de rata han mostrado que los glucocorticoides aumentan la asimilación de zinc y posiblemente el retorno de zinc al lumen (34).

El zinc se excreta principalmente en heces y su eliminación aumenta en forma notable en enfermedades gastrointestinales (32). La orina en general es una vía de excreción menor de zinc, pero en ciertos trastornos, como quemaduras, cirugía, nerosis traumáticas o en enfermedades hepáticas, se intensifica mucho la excreción urinaria (33).

El cobre de origen alimentario se absorbe en la luz del duodeno y del estómago al formar complejos con l-aminoácidos y otros grupos químicos de captación (34,35). Otros elementos como cadmio, mercurio, plata, y zinc, compiten por la absorción (7).

El transporte de cobre a través de la membrana con borde en cepillo del intestino delgado puede ser influenciado por una variedad de componentes en la dieta, incluyendo fibra, fitato, ácido ascórbico, tiomolibdato y aminoácidos (7). Se ha observado que dietas altas en proteínas no ejercen una influencia positiva, sobre la absorción de cobre (36-39). La digestibilidad de las proteínas pueden tener un marcado efecto en el grado en el cual se forman los complejos cobre-aminoácidos y peptidos quelados (8). Complejos de cobre no directamente relacionados con la ingestión de proteínas pueden también influenciar la asimilación de cobre desde el tracto gastro intestinal. El citrato, el fosfato y complejos de gluconato pueden ser más fácilmente absorbidos que complejos formados con otros ligandos (40). Similarmente,  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y oxalato de Cu o el complejo Cu-ácido etilendiaminetetracético (EDTA), son mejores fuentes de aprovechamiento de cobre que  $\text{CuSO}_4$  (41). Fitato en la dieta (36), ácido ascórbico (42-44), tiomolibdato (45,46) y fibra (47), forman complejos con cobre que limitan su absorción. El quelante nitrilotriacetato amplía la absorción de cobre (48), tal vez por la formación de un complejo que es transportado intacto a través de la membrana. Sin embargo, esta área requiere más estudio, particularmente a nivel de la membrana.

Las secreciones endógenas parecen influenciar la absorción de cobre. La bilis tiene una influencia negativa sobre la reabsorción de cobre secretado (49); las proteínas pancreáticas tienen un efecto similar (50). Los glucocorticoides promueven

la secreción biliar de cobre lo cual indica que el nivel hormonal puede alterar la absorción por las influencias de estos mecanismos (51,52).

A partir de la mucosa intestinal el cobre se transforma en forma de un complejo cobre-albúmina en plasma venoso porta hacia el hígado. En las células hepáticas el cobre se almacena unido a una metalotioneína, incorporada en la ceruloplasmina u otras enzimas cúbicas, o se excreta por bilis. La ceruloplasmina representa un 95 % de cobre que se encuentra en suero y sirve para transportar cobre a tejidos periféricos, en tanto que la albúmina capta el 5 % restante (7,8).

El cobre se excreta principalmente en bilis en forma de complejos con aminoácidos y macromoléculas lo que impide su circulación enterohepática (7).

## 1.2 TRANSPORTE DE ZINC Y COBRE

La mayor parte del zinc del plasma esta asociado a las proteínas, albúmina es la principal proteína transportadora de zinc. La distribución de zinc varia entre las especies, pero usualmente cerca de dos terceras partes de zinc del plasma está unido a albúmina (53-58).

Existe una buena correlación entre los cambios de zinc unido a albúmina y la concentración de zinc en plasma que ocurren durante enfermedades crónicas y agudas, igualmente los niveles de albumina en suero pueden tener algun efecto sobre los niveles de zinc en suero (59,60). La habilidad de la albúmina para llevar

unido zinc puede ser una característica esencial para la transferencia de zinc entre plasma y los tejidos.

El zinc endógeno es secretado dentro del intestino proveniente de las secreciones pancreáticas y biliares así como del flujo de zinc de la mucosa al lumen por las células intestinales. La regulación de la absorción de zinc ocurre a nivel celular y a través de secreciones endógenas. El zinc absorbido es transportado en el plasma portal unido a la albúmina, el ingreso hepático ocurre por un proceso saturable dependiente de energía y responde a una acumulación inicial mayor de zinc absorbido nuevamente. Del zinc total, el músculo y el hueso representa la reserva más grande. Lo restante probablemente es regresado al plasma cuando se moviliza del hueso para mantener la homeostasis de calcio. Un marcado incremento en el catabolismo del músculo puede favorecer la pérdida de zinc en la orina (8).

Se ha demostrado que gran parte del zinc del suero unido a proteínas diferentes de albúmina está asociado a la alfa 2 macroglobulinas (55,5b,61), formando un complejo zinc-a-2 macroglobulina, sin embargo esta asociación no tiene una función fisiológica conocida.

Se sabe que la albúmina es la principal proteína transportadora de zinc en líquido amniótico, por otro lado se ha informado que durante el embarazo la concentración de zinc en suero disminuye proporcionalmente en ambas fracciones albúmina y a-2 macroglobulina (62).

Morgan (63) describió una lipoproteína rica en histidina de

baja concentración en plasma pero con marcada propiedades fijadoras de zinc. Los mismos estudios in vitro con otras proteínas mostró que esta glicoproteína tenía una habilidad más alta para unir zinc y poder competir exitosamente con las proteínas por zinc.

En animales experimentales el contenido de zinc del plasma se reduce rápidamente cuando el suplemento de zinc en la dieta disminuye (64-67). En humanos la respuesta a zinc en la dieta puede ocurrir más lentamente (68).

En ratas con quemaduras particularmente aquellas con complicaciones infecciosas la hipozincemia se acompaña de un incremento en los niveles de zinc en el hígado. En humanos, el ayuno agudo parece incrementar el zinc en el plasma (69). Similares observaciones se hicieron cuando ratas con bajos niveles en zinc se sometieron a restricción aguda de alimento (70).

Solamente un pequeño porcentaje de la reserva total de zinc del plasma está unido a histidina y cisteína, ligandos de bajo peso molecular. Henkin (71) ha propuesto que el zinc unido a aminoácidos está en equilibrio con albúmina, pero no con alfa 2 macroglobulina. Prasad y Oberleas (58) han sugerido que la unión de zinc a aminoácidos ultrariltrables juega un papel importante en el transporte de zinc. La histidina y cisteína son los aminoácidos más frecuentemente implicados en esta función potencial. Yunice et al (72) y Van Rij et al (73) han mostrado que la infusión de aminoácidos incrementa la excreción urinaria

de zinc. Esto sugiere que niveles elevados de aminoácidos pueden llevar a un cambio en el equilibrio de zinc del plasma mas allá de la unión de albúmina. De esta forma pueden ocurrir importantes cambios en la excreción de zinc.

El cobre es transportado en el plasma portal principalmente unido a la albúmina y posiblemente como complejos de aminoácidos. El ingreso hepático ocurre por un proceso de transporte saturable. El transporte sistémico de cobre desde el hígado es en primer lugar por ceruloplasmina (Cp) la cual parece llevar cobre a los tejidos (8).

La Cp es una proteína plasmática que pertenece al grupo de proteínas de respuesta de fase aguda. Posee muchas funciones: la primera, representa el mayor transportador de cobre en plasma y constituye un eslabón entre el hepatocito y las otras células del organismo además de ayudar al mantenimiento de la homeostasis de cobre hepático. Segundo, es responsable para la actividad de ferroxidasa en el plasma, por lo tanto también es conocida como hierro (II) oxígeno oxidoreductasa. Tercero: es un atrapador de radicales libres y iones superóxido (74).

La Cp del plasma humano es una glicoproteína de 132.000 daltones aproximadamente, contiene 6 átomos de cobre por molécula y 7.8 % de carbohidratos. Debido a que la Cp representa 90 a 95 % del contenido de cobre en el suero se espera represente una fuente primaria de cobre extrahepático (8). La síntesis y/o secreción de Cp es alterada por hormonas y cobre. Existen diversos factores fisiológicos como condiciones experimentales y

patológicos que alteran los niveles de Cp en plasma como: leucemia, infarto del miocardio, artritis reumatoide, desnutrición, nefrosis, infecciones, ejercicio físico, cirrosis biliar, embarazo, esquizofrenia, entre otras (75).

Se presenta hiperceruloplasminemia durante las infecciones crónicas y agudas como resultado de una gran variedad de agentes virales bacterianos o parasitarios. También se ha observado hiperceruloplasminemia en otras condiciones inflamatorias como artritis reumatoide y en trastornos hepáticos el cual resulta de un bloqueo en la excreción biliar de cobre (76).

Se ha reportado hipoceruloplasminemia en algunos estados patológicos como la enfermedad de Wilson, nefrosis y bajo condiciones de desnutrición y malabsorción (75).

Se ha sugerido que la Cp desempeña un papel en la defensa generalizada del huésped, además de sus propiedades como atrapadora de radicales libres y donadora de cobre (8,75) es particularmente atractiva en patologías como el SN.

En la década pasada la metalotioneína fue una de las metaloproteínas más ampliamente estudiadas. La razón para esto, aparte de sus características químicas únicas, se relaciona a su inducción por metales pesados y hormonas. Dependiendo de la especie animal y tejidos de la cual se aísla, esta, se encuentra unida a una gran variedad de metales, particularmente cadmio, cobre, mercurio y zinc (8). Las características más sobresalientes son su bajo peso molecular (cerca de 6500 daltones) y su rara composición de aminoácidos: la cisteína

constituye el 30 % de sus residuos y no posee aminoácidos aromáticos. La otra característica principal es su alto contenido de metales, con 7 átomos gramos de cadmio o zinc por mol, o arriba de 12 átomos gramos de cobre por mol. Este contenido es equivalente a un átomo del metal por tres o dos residuos de cisteína, respectivamente (8).

La metalotioneína se ha aislado de una gran variedad de especies. Los principales órganos en que se ha encontrado son hígado, riñón, e intestino. Aunque una gran parte de la atención se ha enfocado con la toxicología del cadmio. Cuando se aisló la metalotioneína del hígado humano se encontró que contenía zinc (66,76). Su alto contenido de zinc y cobre bajo condiciones fisiológicas sugiere que la proteína está involucrada en el metabolismo de ambos metales.

### 1.3 DEFICIENCIA DE ZINC Y CUBRE.

La primera evidencia de deficiencia primaria de zinc en humanos fue encontrada por Prasad et al (77,78), cuando estudiaron niños adolescentes de un poblado en Egipto. Subsecuentemente, en 1967, se describió el deterioro del crecimiento y maduración sexual de niños siguiendo un tratamiento con zinc (79). Los mismos autores reportaron el síndrome de deficiencia de zinc en ratas el cual se caracteriza por: retraso en el crecimiento, atrofia testicular y paraqueratosis esorágica (80). Coincidiendo con estos estudios en Egipto, Halsted et al (81) investigaron el síndrome en adolescentes con atrofia del

crecimiento de un poblado campesino en Irán.

Los adolescentes con el síndrome de Prasad-Halsted muestran severo retardo del crecimiento, deterioro en la maduración sexual, y en muchas ocasiones deficiencia de hierro (82).

Se ha demostrado que la deficiencia de zinc en humanos produce alteraciones en el sentido del gusto y olfato (83), otros estudios han reportado la interacción del zinc con el sistema inmune (84,85), la involución del timo y bazo pequeño son signos característicos de deficiencia de zinc prolongada en roedores y la reducción en la masa de esos tejidos se ha asociado con una reducción en el número de células blancas (86-90). Se ha observado que la leucopenia es una característica de la deficiencia de zinc, además la producción de linfocitos T disminuye en esta condición. Posiblemente, la deficiencia de zinc puede alterar la función epitelial del timo y disminuir la producción de la hormona tímica, la cual podría inhibir la maduración de las células T en el timo y en la periferia.

Por otro lado, Bala et al (91,92) encontraron que la subpoblación de células mononucleares de sangre periférica en ratas Lewis macho se altera por deficiencia de cobre. En particular, el porcentaje relativo de linfocitos CD4<sup>+</sup> (T ayudadoras) y CD8<sup>+</sup> (T citotóxicas) disminuye, y de células B y monocitos aumenta en ratas de 8 semanas de edad con deficiencias de cobre desde su nacimiento. Estudios semejantes de Mulhern et al (93) sobre la deficiencia severa y marginal de cobre en ratones, informaron de alteraciones en el peso del cuerpo y

Otros estudios demuestran incremento en la viscosidad celular en ratas deficientes de cobre (100-103) esto al parecer como resultado de una sobrecarga de lípidos y entrecruzamiento de componentes celulares causados por peroxidación de lípidos, así mismo, Yount et al. (104), estudiaron en ratas, el efecto de la deficiencia de cobre sobre las tasas absolutas de síntesis de colesterol. Los niveles plasmáticos de colesterol se elevaron significativamente, disminuyó el hematocrito y los niveles de cobre hepático además observaron que estos tenían disminución en el peso del cuerpo y del bazo y aumento en el peso del corazón.

El mismo estudio apoya la hipótesis que los niveles elevados de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-Co-A) reductasa hepática, observada en deficiencia de cobre, se asocia con un incremento en la tasa de síntesis de colesterol hepático y total del cuerpo. Por otro lado se ha informado de hipercolesterolemia ocasionada por deficiencia de cobre en más de 30 laboratorios (105-119).

Numerosos estudios han demostrado la influencia del zinc y del cobre sobre la actividad de muchas enzimas. Prasad et al. (80) en 1967 informaron la disminución en la actividad de algunas enzimas en diferentes tejidos de ratas deficientes de zinc, por el contrario su actividad aumentó en los mismos tejidos cuando ingirieron nuevamente una dieta normal en zinc. Posteriormente Reeves y O'Dell (5) estudiaron la participación del zinc en suero y en los medios de reacción sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), y además demostraron

ayudar a prevenir el daño en pulmón inducido por radicales libres. Los mismos autores en estudio previo (129) encontraron un aumento en las actividades de las enzimas superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre (ZnCuSOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa en ratas deficientes de cobre expuestas a hiperoxia. Por el contrario, en estudios semejantes de Pronaska (130,131), se encontró disminución en las actividades de citocromo C oxidasa y ZnCuSOD en ratas y ratones en 7 órganos examinados de animales deficientes de cobre, de igual forma las actividades de las enzimas GSH-Px disminuyó en hígado y plasma de ratas y ratones deficientes de cobre. Por otra parte Jenkinson et al. (132) estudiaron el efecto de la deficiencia de cobre sobre la actividad de la GSH-Px y SOD coincidiendo al observar una disminución en las actividades de las dos enzimas en ratas deficientes de cobre en la dieta.

Saari et al. (133) estudiando la producción de etano exhalado en ratas con dietas deficientes de cobre informaron un incremento en la producción de etano exhalado como consecuencia en un aumento en la peroxidación lipídica y reducción en la actividad de metaloenzimas dependientes de cobre (134,135).

Lawrence y Jenkinson (136) en estudio similar observaron aumento en la exhalación de etano en ratas deficientes de cobre con peroxidación lipídica inducida con tetracloruro de carbono.

El cobre es un micronutriente requerido para la integridad estructural y funcional de muchos órganos incluyendo el sistema cardiovascular. Se ha pensado desde hace varias décadas que la

deficiencia de cobre es la explicación de la etiología, patogenesis y fisiopatología de la enfermedad isquémica del corazón (105,137-150). La principal alteración por deficiencia de cobre es cardiomegalia, ocasionada por un incremento del volumen miotribilar (151,152). Por otro lado Schoenemann et al (153), ha demostrado que concentraciones y niveles totales de dopamina en el corazón y bazo de cerdos y ratas aumentaron dramáticamente por deficiencia de cobre, además se han observado cambios en los niveles cardiacos de las catecolaminas en ratas deficientes de cobre (154) y disminución en los niveles de norepinefrina en las glándulas adrenales de ganado vacuno y ratas deficientes de cobre (155). Así mismo el deterioro en la actividad de neuronas noradrenérgicas parece ser una ralla consistente de la deficiencia de cobre.

#### 1.4 SÍNDROME NEFRÓTICO

El síndrome nefrótico (SN) se caracteriza por un aumento en la filtración glomerular de proteínas plasmáticas, edema, ascitis, retención de sodio, albuminuria, hipoalbuminemia, hiperlipoproteinemia, desnutrición, alteraciones en los factores de la coagulación, tromboembolismo, disminución de la inmunidad humoral y celular y alteraciones en la concentración (aumento o disminución) de casi todas las proteínas plasmáticas (156-159). Se piensa que todas las alteraciones sistémicas en el SN son secundarias a la pérdida de proteínas plasmáticas por la orina debida a alteraciones en la barrera de filtración glomerular.

En la figura 1 (158) se ilustran las relaciones entre las principales alteraciones sistémicas del SN.

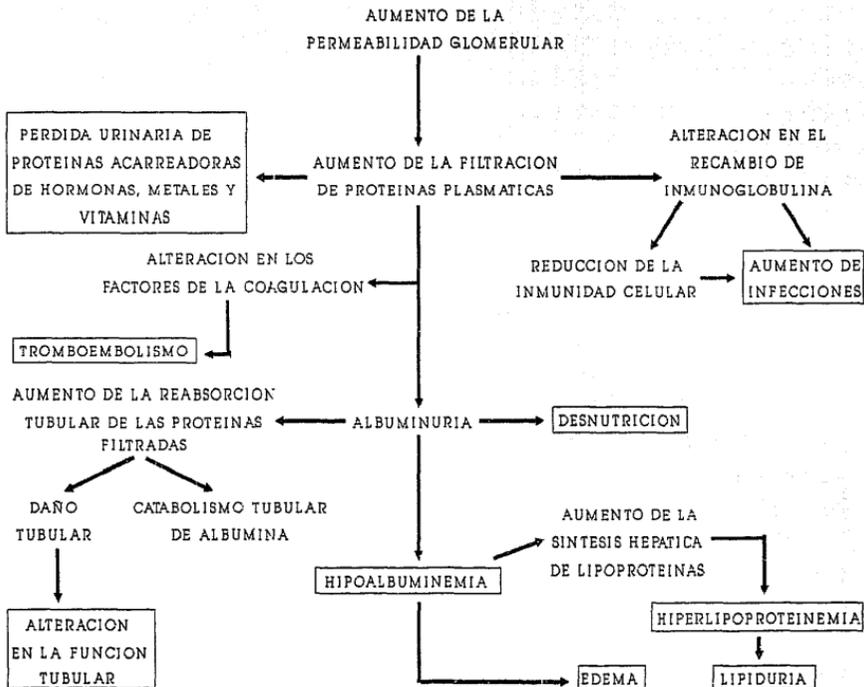
El SN que se presenta en humanos, puede ser primario o secundario. El SN primario también se conoce como idiopático o de cambios mínimos ya que su origen se desconoce y a que las lesiones renales no se observan con microscopio de luz sino con microscopía electrónica. El SN secundario puede ser causado por diferentes sustancias o como complicación de otras enfermedades.

El SN primario puede reproducirse experimentalmente en animales mamíferos como en ratas, presentándose con alteraciones renales y sistémicas muy parecidas a la enfermedad en los humanos (160-162).

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

- Suero antirrábico o suero nefrotóxico (161,163).
- adriamicina (doxorubicina) (162)
- daunomicina o daunorubicina (164)
- ANP (Aminonucleósido de puromicina) (165-167)

De los modelos más usados es el producido por el aminonucleósido de puromicina. Este modelo es muy parecido al SN primario de los humanos ya que produce la lesión renal característica que es la lesión de los procesos podocíticos de las células epiteliales (podocitos), además de que el edema, la retención de sodio, la hiperlipidemia y la proteinuria remiten espontáneamente (168-171).



El aminonucleósido de puromicina (ANP) es un derivado de la puromicina, también llamada acromicina. El ANP es un compuesto que se usó en el tratamiento de la tripanosomiasis y como antibiótico (172).

El antibiótico puromicina se obtiene del hongo actinomicete Streptomyces alboniger. se presenta en forma cristalina y transparente en el suelo donde vive el hongo o bien en algunos medios de cultivo puede presentarse de color negro oliváceo (173).

El ANP se sintetizó en 1954 por Baker (174) a partir de la hidrólisis del residuo p-metoxitirosil unido al grupo amino de la ribosa de la puromicina (175). El ANP que es el compuesto originado presenta su actividad de tripanicida de tres a cuatro veces mayor que el de la puromicina. Se ha reportado que el ANP inhibe el crecimiento tumoral mamario en ratones mejor que la puromicina (176). También se ha administrado a pacientes con cáncer y parece más tóxico que la puromicina ya que produce proteinuria y daño renal (177).

Aunque el mecanismo de acción aún no está definido para el ANP, se sabe que este inhibe la síntesis de RNA pero no la síntesis de proteínas (176,178,179) como se ha descrito para la puromicina. Se piensa que el efecto nefrotóxico del ANP involucra la producción de radicales libres del oxígeno vía xantina oxidasa del metabolismo de las purinas (180-182).

La nefrosis humana y experimental se caracteriza por profundas alteraciones en el metabolismo de proteínas del plasma. Se ha medido la concentración de muchas proteínas en suero en el

SN, y se ha mostrado que apesar de la marcada hipoproteinemia, la concentración de algunas proteínas no cambia, y aún la de otras aumentan en nefrosis experimental y humana. (Tabla 3).

Por otro lado, Pedraza-Chaverri et al. (150) midiendo la actividad de algunas enzimas del suero en nefrosis experimental informaron cambios en la actividad de las siguientes enzimas: aumento en aldolasa y colinesterasa; disminución en: alanina aminotransferasa, lactato deshidrogenasa,  $\alpha$ - hidroxibutirato deshidrogenasa, creatinina cinasa y fosfatasa alcalina; modelo birasico, primero aumentan y luego disminuyen en: leucina aminopeptidasa, isocitrato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa; y sin cambio en la actividad de gamma glutamil transferasa. Los análisis electroforéticos de proteínas séricas de pacientes o animales con SN muestra que la albúmina y las globulinas gama disminuyen, y que las globulinas  $\alpha_2$  y beta aumentan. Estas alteraciones en el patrón electroforético general de las proteínas plasmáticas son consecuencia de los cambios en la concentración individual de muchas proteínas. La disminución en la concentración individual de una proteína circulante puede ser consecuencia de una reducción en su síntesis, un incremento en su catabolismo o en su excreción urinaria, o una combinación de estos factores. Por el contrario, la elevación en la concentración de una proteína circulante en el SN puede ser consecuencia de un aumento en la síntesis y/o una disminución en su catabolismo (168, 196).

## 1.5 ESTRUCTURA DEL GLOMERULO

Anatómicamente el glomerulo consiste en una intrincada red de capilares a través de la cual fluye sangre que se bombea por fuerzas hidráulicas generadas por las contracciones isorritmicas del corazón. El glomérulo es una estructura o barrera selectiva de filtración de moléculas de proteína, esta barrera está constituida por la pared capilar glomerular que consta de tres componentes:

- a) células endoteliales cuyo citoplasma está fenestrado.
- b) la membrana basal glomerular (MBG) compuesta de tres capas: la lámina rara interna (LRI) la lámina densa (LD), la lámina rara externa (LRE),
- c) los procesos podocíticos de las células epiteliales (197).

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

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

La membrana basal glomerular (MBG) está compuesta principalmente de una maila de fibras de colágena. La LRI tiene un espesor de 300 a 350 nm en el humano pero puede variar de los 350 nm en diferentes especies, la LD constituye una barera

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

Los podocitos de las células epiteliales que están parcialmente embebidos en la LRE, se encuentran como extensiones citoplásmicas sujetas al exterior de la MBG como una serie de interdigitaciones de procesos podocíticos. Entre los procesos podocíticos adyacentes hay espacios de un tamaño de 20 a 30 nm que están cubiertos por una membrana fina conocida como diaphragma de hendidura que contiene espacios rectangulares de un tamaño aproximado de 4 x 14 nm, a través del cual pasan las moléculas pequeñas y probablemente restringen el paso de la albúmina y de moléculas más grandes (198,199).

Tanto la LRI y LKE determinan una barrera que puede retardar las moléculas de proteínas aniónicas, por su contenido de proteoglicanos tales como el heparán sulfato proteoglicano y otras glicoproteínas sulfatadas o grupos libres carboxilo que funcionan como una barrera electrostática a base de

polianiones (200).

De acuerdo con esto, los factores que determinan el paso de las moléculas por la barrera de filtración son: el tamaño, la deformabilidad, la carga eléctrica y la configuración moleculares, así como la hemodinámica glomerular.

En el SN ocurre un trastorno en la permeabilidad del capilar glomerular que permite el paso de macromoléculas cuyo mecanismo no está dilucidado. En la nefrosis por ANP, la depuración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga es muy elevada, lo que indica que la selectividad, tanto de tamaño como de carga, está alterada (201). La lesión renal característica del SN es la fusión de los procesos podocíticos, esta fusión parece deberse a la pérdida de la carga negativa de su superficie. Esta conclusión se apoya en el hecho de que la administración de policationes al riñón produce proteinuria y fusión de podocitos (202). Otras investigaciones han mostrado que la disminución en el ácido siálico en las membranas de los podocitos en la nefrosis humana y experimental juega un papel muy importante en el mecanismo de la proteinuria (203).

## II ANTECEDENTES

En 1954 se informó por primera vez de los bajos niveles de cobre en sangre (hipocupremia) y hierro (hipoferremia) en un gran número de pacientes con síndrome nefrótico (204). Esto se asoció con un considerable aumento de la excreción urinaria de cobre y hierro en estos pacientes y se observó una estrecha correlación entre la excreción de estos metales y la proteinuria. El aumento en la excreción urinaria de cobre, hierro en pacientes con SN se ha confirmado en estudios más recientes (205-209,220). La importancia de la deficiencia de cobre en el SN a nivel clínico se hace evidente por los bajos niveles de cobre encontrados en los eritrocitos de 3 de 5 pacientes estudiados por Cartwright, et al. (204). Por otro lado se ha informado que estas alteraciones son secundarias a la pérdida urinaria de sus proteínas transportadoras (Cp y transferrina) cuyos niveles disminuyen en sangre (205,206,209).

En ratas con SN inducido con ANP se ha encontrado un aumento en la excreción urinaria y una disminución de niveles circulantes de ceruloplasmina (210). Sin embargo nunca se ha medido los niveles de cobre en suero, orina y tejidos de estas ratas. En diferentes modelos experimentales de SN se ha confirmado un aumento en la excreción urinaria y una disminución en la concentración sérica de transferrina (211).

Se ha encontrado que la velocidad del catabolismo fraccional de transferrina aumentó en 7 de 8 pacientes a 160 % de lo normal, mientras la velocidad de síntesis aumentó en los mismos pacientes

aproximadamente en la misma cantidad (208).

Alfrey et al. (211), informaron aumento en la excreción urinaria de hierro y en la concentración de hierro en riñón en ratas con SN por suero nefrotóxico. Estos riñones también tienen una deficiencia de selenio y cobre, por lo que se piensa son más susceptibles al daño por radicales libres posiblemente por una alteración de metaloenzimas antioxidantes (212).

El metabolismo de zinc se ha estudiado en ratas (213) y en niños (214) con SN. En ratas con SN inducido por ANP se observó un aumento en la excreción urinaria de zinc y una disminución en sus niveles circulantes ya que se observó una correlación positiva entre los niveles zinc y albúmina, se postuló que la pérdida urinaria de zinc unido a albúmina era la causa de su disminución en suero (213). El contenido de zinc en fémur está disminuido; en riñón y músculo aumenta y en testículo no cambia (213), sin embargo no se han medido los niveles de zinc en otros tejidos.

En 1942 McCance y Widdson (215) describieron dos pacientes con albuminuria y con aumento en la excreción de zinc. Por el contrario, Fairhall y Hoyt (216) habían encontrado antes que no había cambio en la excreción de zinc en la nefritis o en la nefrosis. En pacientes con SN se ha encontrado consistentemente una reducción en los niveles plasmáticos de zinc (83,217,220), leucocitos (219) y eritrocitos (219), sin embargo aunque varía, algunos autores encuentran un aumento en la excreción, otros encuentran una excreción normal (214,211-218). En humanos la

disminución en el contenido de zinc en el pelo persistió por muchos meses después de que el SN había remitido y aunque los niveles de zinc plasmático habían regresado a lo normal (214,219). Se piensa que algunos sujetos con SN tienen un desorden más profundo en el metabolismo de zinc de lo que se había observado previamente; por lo que se requiere estudios adicionales para establecer las bases de esta anomalía metabólica en el SN, y para determinar si se requiere la terapia de reemplazamiento de zinc.

### III HIPOTESIS

La excreción urinaria de cobre y zinc puede aumentar en ratas con síndrome nefrótico inducido con ANP lo cual, a su vez, puede provocar cambios en sus niveles circulantes y en los tejidos.

### IV OBJETIVO

Medir los niveles de zinc y cobre en suero, orina, riñón, bazo, hígado, testículo, pulmón corazón y cerebro de ratas con síndrome nefrótico inducido con aminonucleósido de puromicina.

## V MATERIAL Y METODOS

### 1. REACTIVOS

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. EUA:

Solución estándar de zinc y cobre para absorción atómica, amino nucleósido de puomicina (6-dimetilamino-9-(3-amino-3-desoxi-D-beta-ribofuranosil - purina), reactivo de folin-fenol, albúmina serica de bovino, ácido tricloroacético.

De J.T. Baker se adquirieron los siguientes reactivos; hidróxido de sodio, carbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre, metanol absoluto, ácido acético glacial.

El alimento usado fué nutricubos purina para roedores pequeños de Purina de México, S.A .

### 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este trabajo se utilizaron ratas macho (Rattus norvegicus) de la cepa Wistar de 450 a 500 gramos de peso que se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición, éstas se alimentaron a la par con un contenido de minerales de 12.3 mg de zinc / 100 g de dieta y de 3.0 mg de cobre / 100g de dieta. Se dividieron en dos grupos:

- a) Grupo con síndrome nefrótico (SN) (n= 10). El SN se indujo con una inyección subcutánea de ANP en solución salina al 0.9 % a una dosis de 15 mg/100 g de peso (170,221).
- b) Grupo control (n=10) Estas también recibieron una inyección

subcutánea de vehículo (salina al 0.9 %) y se les restringió el alimento a la cantidad ingerida por las ratas con SN. De esta manera ambos grupos consumieron la misma cantidad de alimento y por lo tanto de zinc y cobre.

A los dos grupos se les suministró agua desionizada ad libitum.

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas dos días antes de la inyección del ANP o vehículo (día 0) y se mantuvieron en éstas los siguientes diez días para recolectar la orina y registrar el consumo de alimento diariamente. A la orina se le midió el volumen, se centrifugó, se determinó el contenido de minerales para todos los días de estudio y se dividió en alícuotas que se congelaron a -70°C hasta que se realizaron las determinaciones de proteínas totales y albúmina.

Las ratas se sacrificaron por decapitación el día diez, se recolectó la sangre para separar posteriormente el suero, evaluar el contenido de minerales y demás determinaciones que caracterizan el SN, se obtuvieron los tejidos (riñón, hígado, pulmón, bazo, corazón, cerebro y testículos se pesaron, se homogenizaron en agua desionizada en un volumen cinco veces superior a su peso, se hicieron alícuotas de un mililitro que se guardaron en tubos Eppendorf y se congelaron a -70 °C para posteriormente determinar los minerales. Todas éstas maniobras se hicieron evitando al máximo la contaminación de las muestras así como utilizando material libre de minerales (lavado con HNO<sub>3</sub> 6N).

### 3. CARACTERIZACION DEL SINDROME NEFROTICO

Para la caracterización del SN se hicieron las siguientes determinaciones:

#### 3.1 DETERMINACION DE PROTEINAS EN SUERO Y ORINA

Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry (230) el cual tiene dos principios básicos:

- a) Reacción de la proteína con cobre en condiciones alcalinas.
- b) Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por la proteína tratada con cobre .

La proteína se cuantifica por la cantidad de tirosina y triptofano presentes en ella comparada con la cantidad de estos aminoácidos en la proteína usada como patrón. El color desarrollado se lee a 650 nm y para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

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

Solución B: Sulfato de cobre 0.05 %

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

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

Solución E: Albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 mg/mL. Con esta solución se preparó una curva patrón de 5 hasta 50 ug

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

estaba agitando vigorosamente en vortex. Después de 30 min se determinó la densidad óptica a 680 nm.

Antes de cuantificar las proteínas urinarias, éstas se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético al 10 % de la siguiente manera: se mezclaron 200 uL de orina y 1 ml de ácido tricloroacético se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min, el sobrenadante se decantó y esta operación se repitió 3 veces hasta que el resuspendido quedara transparente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 1 mL de NaOH 0.1 M y de esta manera la orina quedó con una dilución 1:5; en algunos casos se hizo una dilución adicional 1:100 (ratas con SN día 10) con agua destilada desionizada y se colocaron 0.2 mL de esta dilución en el ensayo. A los sueros se les hizo una dilución 1:100 con agua destilada y se colocaron 50 uL en el ensayo completando a 0.2 mL con agua destilada para obtener una dilución final 1:400. Los resultados de proteínas totales en orina se expresan en mg/24 h y en suero en g/dL.

### 3.2 DETERMINACION DE ALBUMINA POR ELECTROFORESIS EN SUERO Y ORINA.

Una de las características de las proteínas es su carga eléctrica es decir pueden ser polares o no polares a un pH determinado. Es así como las proteínas pueden separarse movilizándose através de un campo eléctrico por medio de una técnica llamada electroforesis. Las proteínas que se encuentran en el suero y orina, se fraccionan y se separan de acuerdo a su

carga eléctrica y a un particular pH (8.6 - 8.9) en las siguientes fracciones de proteínas:

Albumina, proteína con carga eléctrica negativa, es la que más distancia recorre en el gel hacia el ánodo y es la más prominente en suero; posteriormente las fracciones ALFA-1, ALFA-2, BETA Y GAMMA globulinas. La albúmina se determinó con el dato de proteínas totales y el porcentaje de albúmina que se obtuvo del trazo densitométrico de la electroforesis en acetato de celulosa. El porcentaje de albúmina se multiplicó por la concentración de proteínas y de esta manera se obtuvo la concentración de albúmina en g/dL para el suero y en mg/24 h para la orina (196).

### 3.3 COLESTEROL, UREA Y CREATININA EN SUERO

El colesterol se determinó con estuche comercial de Boehringer-Lakeside de acuerdo a las instrucciones del fabricante, éste se basa en un método enzimático colorimétrico.

Los resultados se expresan en mg/dL. La determinación de creatinina se hizo con estuche de reactivos para creatinina Beckman, utilizando el Analizador 2 de Creatinina Beckman y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresan en mg/dL.

La urea se determinó con el estuche de reactivo BUN utilizando el analizador de BUN Beckman, este analizador utiliza un método enzimático que mide la velocidad de cambio de la conductividad en la reacción. Los resultados se expresan en mg/dL. La depuración de creatinina se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{\text{Cr en orina (mg/dL)} \times \text{Flujo urinario (mL/min)}}{\text{Cr en suero (mg/dL)}}$$

La excreción fraccional de zinc y cobre se determino con la siguiente formula:

$$\frac{\text{Depuración del mineral}}{\text{Depuración de creatinina}} \times 100$$

#### 4. DETERMINACION DE MINERALES POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

##### 4.1. CONCEPTOS Y FUNDAMENTO.

Un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) es un instrumento usado para analizar las concentraciones de los metales en solución. Sesenta y ocho elementos pueden determinarse en un amplio rango de concentraciones desde partes por billón, a porcentajes.

La preparación de la muestra es simple y frecuentemente involucra una disolución en un ácido apropiado. El instrumento es fácil de afinar y de operar.

La figura 1 muestra los principales componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica: a) la fuente de luz, b) el atomizador, c) el monocromador, d) el detector e) el sistema de lectura.

a) La fuente de luz, comúnmente es una lámpara de cátodo hueco, útil para todos los elementos y capaz de emitir energía en la longitud de onda analítica para un elemento en particular.

## ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION ATOMICA

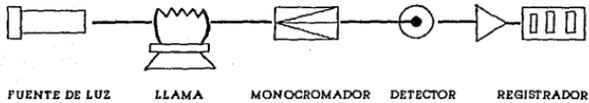


Figura 1. Principales componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica.

## PROCESO DE LA ABSORCION ATOMICA

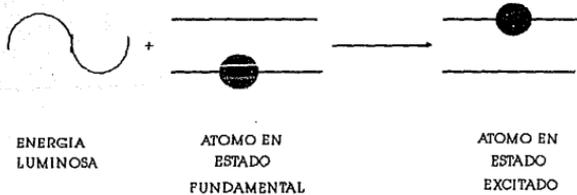


Figura 2. Proceso de la absorción atómica.

b) El atomizador, descrito en el esquema como llama, es quien genera átomos en estado fundamental en el paso óptico del fotómetro, puede ser también un horno de grafito cuando los niveles están por debajo de partes por billón.

c) El monocromador es usado para aislar la línea de resonancia analítica emitida por la lámpara de cátodo hueco de las líneas no analíticas de impurezas.

d) El detector convierte la energía de la luz llevada por el monocromador en energía eléctrica.

e) El sistema de lectura o registrador, es un microprocesador con un circuito integrado simple, capaz de suministrar un control centralizado y manipulación de datos para un número de operaciones enlazadas.

La ciencia de la espectroscopia de absorción atómica ha producido tres técnicas de uso analítico: la emisión, la absorción y la fluorescencia.

Con el objeto de entender la interrelación entre estas técnicas, se hace necesario tener un conocimiento del átomo y de los procesos atómicos involucrados en cada una de estas técnicas.

El átomo está, de hecho constituido por un núcleo rodeado por electrones. Cada elemento tiene un número específico de electrones que está directamente relacionado con el núcleo atómico y que conjuntamente con él, da una estructura orbital, que es única para cada elemento. Los electrones ocupan posiciones orbitales en una forma predecible y ordenada. La configuración más estable y de más bajo contenido energético, se conoce como "estado fundamental" y es la configuración orbital normal para el

átomo.

Si a un átomo se le aplica energía de una magnitud apropiada, ésta será absorbida por él e inducirá que el electrón exterior sea promovido a un orbital menos estable o "estado excitado". Como este estado es inestable, el átomo inmediatamente y espontáneamente retornará a su configuración fundamental. El electrón por lo tanto retornará a su orbital inicial estable y emitirá energía radiante equivalente a la cantidad de energía inicialmente absorbida en el proceso de excitación.

El proceso de excitación y decaimiento al estado fundamental es común a los tres campos de la espectroscopia atómica. Por esta razón, ya sea la energía absorbida en el proceso de excitación o la emitida en el proceso de decaimiento, puede ser medida y usada para propósitos analíticos.

Si luz de una determinada longitud de onda incide sobre un átomo libre en estado fundamental, el átomo puede absorber energía y pasar al estado excitado, en un proceso conocido como absorción atómica (fig 2). La luz que es la fuente de la excitación del átomo, es simplemente una forma específica de energía. La propiedad de un átomo de absorber luz de longitud de onda específica, es utilizada en la espectrofotometría de absorción atómica.

La característica de interés en las medidas por absorción atómica es el monto de luz, a la longitud de onda resonante, que es absorbida; cuando la luz pasa a través de una nube atómica.

Conforme el número de átomos se incrementa en el paso de la

luz, la cantidad que de ésta será absorbida se incrementará en una forma predecible. Se puede efectuar una determinación cuantitativa del analito presente, midiendo la cantidad de luz absorbida. El uso de fuentes especiales de luz y la selección cuidadosa de la longitud de onda, permite la determinación cuantitativa específica de elementos individuales en la presencia de otros.

La nube de átomos requerida para las mediciones en absorción atómica, es producida por la adición de suficiente energía térmica a la muestra para disociar los compuestos químicos en átomos libres. La aspiración de una solución de la muestra, dentro de una flama alineada con el rayo de luz sirve para este propósito. Bajo condiciones apropiadas de flama, muchos de los átomos permanecerán en la forma de su estado fundamental y pueden ser capaces de absorber luz de longitud de onda apropiada proveniente de una fuente de luz. En el proceso de atomización la solución es aspirada dentro del nebulizador y es "nebulizada". Aproximadamente 90 % de las gotas se pierden en el drenaje. El sistema produce una neblina que debe ser mezclada con los gases de la flama. La mezcla aerosol se evapora cerca de la base de la flama para formar partículas sólidas. Estas partículas son fundidas resultando en la formación de un líquido que funde cerca de la ranura del quemador. Este fundido es vaporizado para formar moléculas que son subsecuentemente atomizadas para producir átomos libres en estado fundamental (fig 3).

La facilidad y la velocidad a la cual se pueden hacer



Figura 3. Proceso de atomización de la llama.

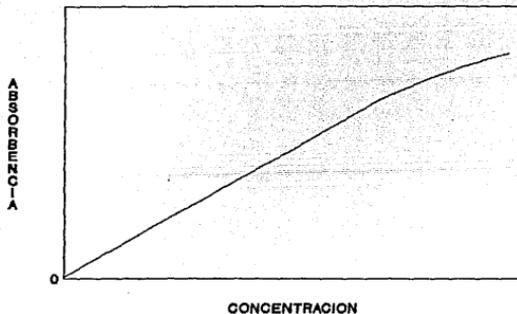


Figura 4. Relación de calibración de un elemento en solución conteniendo concentraciones conocidas del analito. La calibración produce una línea recta. Comportamientos no-ideales producen desviación en el desarrollo de la línea recta.

determinaciones exactas y precisas han hecho de esta técnica uno de los métodos más usados para la determinación de metales.

#### 4.2 ANALISIS CUANTITATIVO POR ABSORCIÓN ATÓMICA

Después de que la absorbencia es medida, este valor puede relacionarse con la concentración del elemento en solución. La relación que convierte la intensidad del rayo de luz (absorbencia) a concentración se conoce como la ley de Beer-Lambert; ésta define la siguiente relación;

$$A = abc$$

en donde "A" es la absorbencia; "a" es el coeficiente de absorptividad constante que es característica de las especies que absorben; "b" es la longitud del paso de luz ocupado por la celda de absorción; y "c" es la concentración de las especies absorbentes en la celda de absorción. Esta ecuación simplemente establece que la absorbencia es directamente proporcional a la concentración de las especies por unas condiciones instrumentales dadas.

Esta conducta, de proporcionalidad directa entre absorbencia y concentración, es observada en absorción atómica. Cuando la absorbencia de soluciones patrón conteniendo concentraciones conocidas del analito se miden y se grafican los resultados de las absorbencias con respecto a la concentración, se establece una relación de calibración similar a la de la fig. 4. En la región en la cual se observa la relación de la ley de Beer, la calibración produce una línea recta.

Después que se ha establecido tal curva de calibración, se puede medir la absorbencia de soluciones de concentración desconocida y su concentración directamente de la curva de calibración (231).

#### 4.3 DETERMINACION DE ZINC Y COBRE EN EL MATERIAL BIOLÓGICO

El contenido de los minerales en suero y orina se determinó haciendo una dilución 1:5 para zinc y 1:2 para cobre, posteriormente se leyó directamente en el EAA; los resultados se expresan en ug/dL, para suero y ug/24 h. para orina (232-237).

Los minerales en los tejidos se determinaron por cenizas secas utilizando el siguiente procedimiento:

Después de homogenizados los tejidos se tomaron alícuotas de un mililitro las cuales se liofilizaron, se determinó su peso seco y se colocaron en la muflla a 500 °C durante 12 horas o hasta completar totalmente su digestión. Posteriormente se disolvieron las cenizas en HCl 3 Normal, se filtraron, se aforaron a 10 mL con agua desionizada y se leyeron en el EAA. Los resultados se expresan en ug/g de peso seco (238).

## VI RESULTADOS

### 1. PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD

El coeficiente de variación (CV) de las pruebas inter-análisis para la determinación de minerales fue 8.6 % para zinc (n=11) y 9.7 % para cobre (n=11).

Las curvas patrón para la determinación de minerales tuvieron una  $r = 0.9991$  para zinc y una  $r = 0.9926$  para cobre en promedio, (figs.1 A y B).

### 2. PESO CORPORAL Y CONSUMO DE ALIMENTO

La figura 2 muestra que hubo una ligera disminución en peso corporal en los dos grupos, pero no hubo diferencia significativa entre el grupo control y el grupo nefrótico.

Las ratas se alimentaron a la par y el consumo de alimento en promedio para el día 0 fue 16.22 gramos y 11.85 gramos para el día diez.

### 3. DESARROLLO DEL SINDROME NEFROTICO

Los resultados de la tabla 1 muestran el desarrollo del SN en las ratas. Se observa claramente la proteinuria, hipoproteinemia, albuminuria, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, así mismo aumento en la creatinina y la urea en suero. En el grupo nefrótico también aumentó el volumen urinario y disminuye la depuración de creatinina. Por otro lado la figura 3 muestra la excreción de proteínas en orina en la cual se observa una diferencia significativa a partir del día 3 respecto al grupo

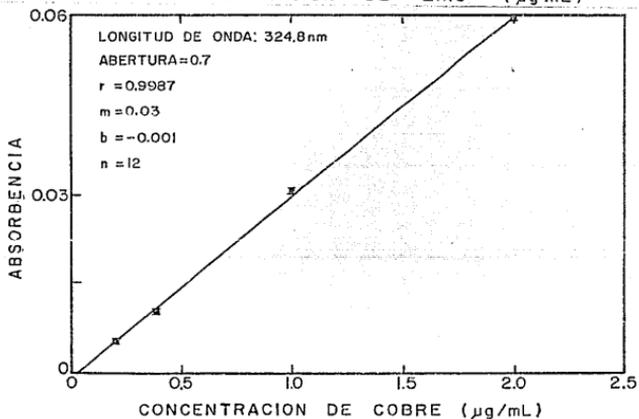
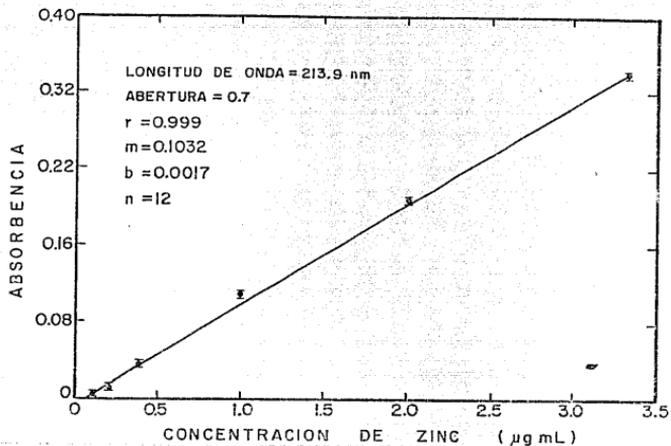


Figura 1. Curvas patron para la determinación de zinc (A) y cobre (B).

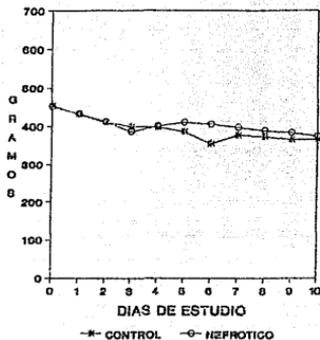


Figura 2. Perfiles de peso corporal de los dos grupos durante los 10 días de estudio

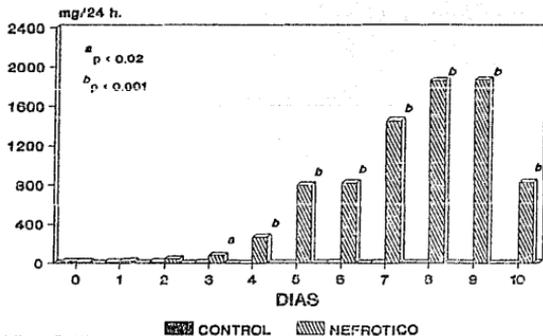


Figura 3. Excreción urinaria de proteínas. (a) y (b) es la significancia estadística por t no pareada.

<u>SUERO</u>	CONTROLES	NEFROTICAS
Proteínas totales, g/dl	8.1 ± 1.0	5.5 ± 0.5 **
Albumina, g/dl	3.0 ± 0.7	0.6 ± 0.2 **
Colesterol, mg/dl	94.0 ± 28.0	534 ± 169 **
Creatinina, mg/dl	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.2 **
Urea, mg/dl	22.2 ± 12.4	69.6 ± 16.7 **
<u>ORINA</u>		
Volumen, ml/24 h	17 ± 7	26 ± 9 *
Proteínas totales mg/24 h	0.1 ± 0.07	822 ± 276 **
Albumina, mg/24 h	< 0.1	438 ± 157 **
Depuración de creatinina, ml/min.	0.803 ± 0.3	0.33 ± 0.13 **

TABLA 1 Desarrollo del síndrome nefrótico. \*\* p< 0.001, \* p < 0.0025 vs control, t no pareada.

control.

### 3.1 DETERMINACION DE ALBUMINA POR ELECTROFORESIS

En la figura 4 se observa el trazo densitometrico en el cual cada curva representa las fracciones de proteínas presentes en el día 10. Se aprecia claramente que el pico de albúmina descendió en suero (b) y aumentó en orina (c) en las ratas nefróticas respecto al control (a). Tambien se aprecia que la fracción globulina alfa-1 aumenta en suero en las ratas nefróticas.

### 4. EXCRECION URINARIA Y NIVELES SERICOS DE ZINC.

La figura 5 muestra que la excreción urinaria de zinc aumentó significativamente a partir del día 3 en el grupo nefrótico y se mantuvo alta hasta el día diez.

La excreción fraccional de zinc aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) figura 6, mientras que la concentración de zinc disminuyó en suero en el día diez (fig. 7).

### 5. CORRELACION ENTRE EXCRECION DE PROTEINAS Y ZINC EN ORINA.

La figura 8 muestra que la correlación entre la excreción de proteínas y zinc en orina fue estadísticamente significativa ( $r = 0.5828$ ,  $n = 98$  y una  $p < 0.001$ .)

### 6. EXCRECION URINARIA Y NIVELES SERICOS DE COBRE.

La excreción urinaria de cobre aumentó significativamente desde el día 1 en el grupo nefrótico (fig.9) manteniéndose elevada hasta el final del estudio.

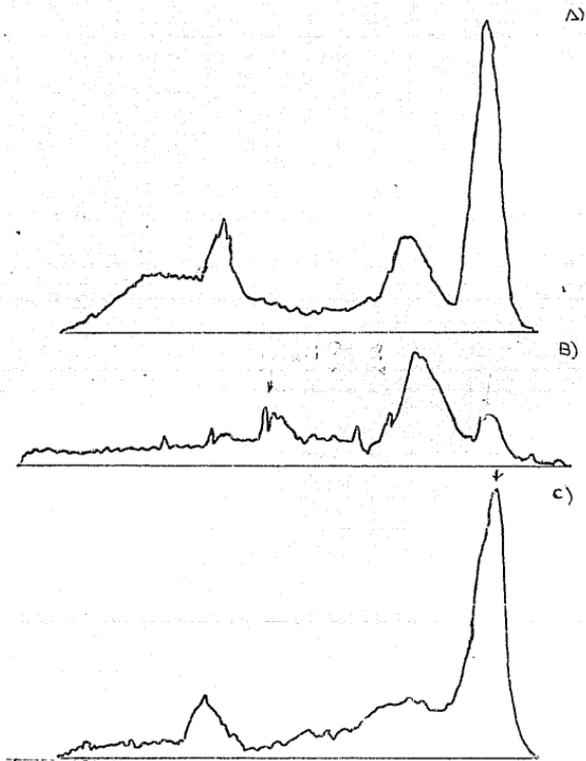


Figura 4. Trazos densitometricos de las electroforesis de proteínas totales en suero y orina. (A) Proteínas totales en suero de las ratas control. (B) Proteínas totales en suero de las ratas nefróticas. (C) Proteínas totales en orina de las ratas nefróticas.

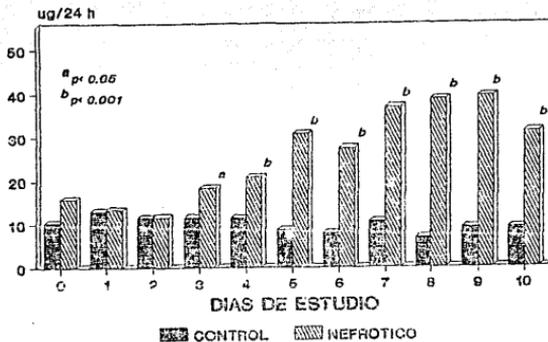


Figura 5. Excreción urinaria de zinc durante los 10 días de estudio. (a) y (b) es la significancia estadística por t no pareada.

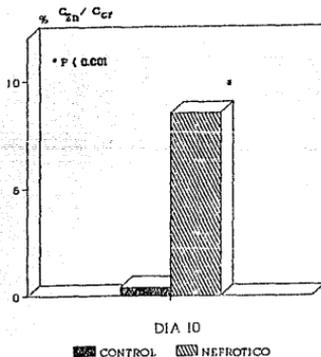


Figura 6. Excreción fraccional de zinc para el día 10. \* Significancia estadística por t no pareada.

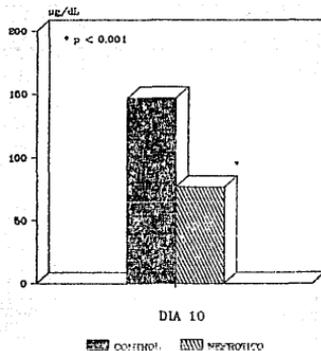


Figura 7. Concentración de zinc en suero para el día 10. \* Significancia estadística por t no pareada.

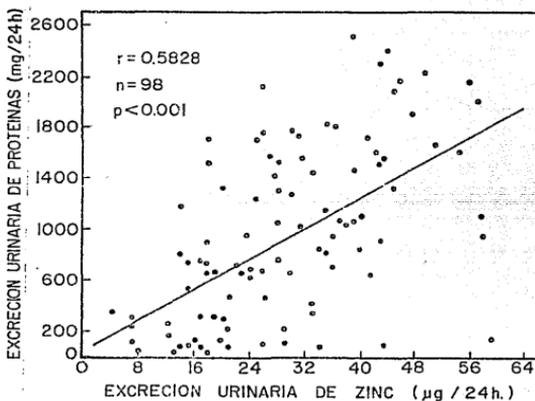


Figura 8. Correlación entre la excreción de proteínas y zinc en orina. ( $p < 0.001$ ) t no pareada.

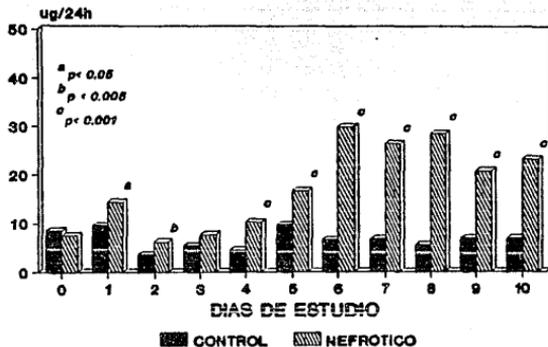


Figura 9. Excreción urinaria de cobre durante los 10 días de estudio (a) y (b) es la significancia estadística por t no pareada.

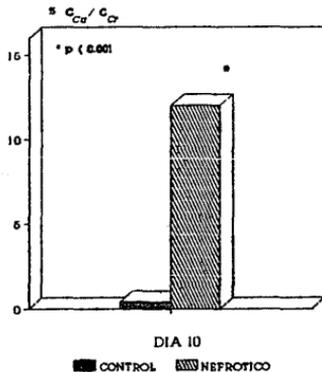


Figura 10. Excreción fraccional de cobre para el día 10. \* Significancia estadística por t no pareada.

La excreción fraccional de cobre aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) en el grupo nefrótico el día diez (fig.10).

Por otro lado en el día diez se observa un descenso en la concentración de cobre (fig.11) y de ceruloplasmina (fig. 12) en suero.

#### 7. CORRELACION ENTRE EXCRECION DE PROTEINAS Y COBRE EN ORINA.

En la figura 13 se observa que la correlación entre excreción de proteínas y cobre en orina fue estadísticamente significativa ( $r = 0.5824$ ,  $n = 98$  y una  $p < 0.001$ ).

#### 8. CONTENIDO DE MINERALES EN LOS TEJIDOS

En las tablas 2 y 3 se puede observar los resultados del contenido de zinc y cobre en los tejidos y su significancia estadística entre el grupo nefrótico y el control.

Se puede observar que la concentración de zinc disminuyó en pulmón y bazo y que la concentración de cobre disminuyó en riñón, hígado y cerebro en el grupo nefrótico.

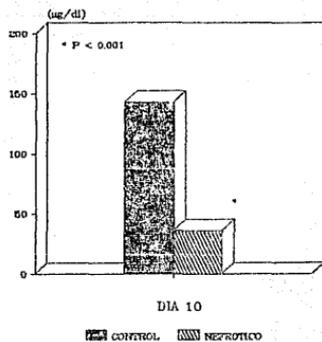


Figura 11. Concentración de cobre en suero para el día 10. \* Significancia estadística por t no pareada.

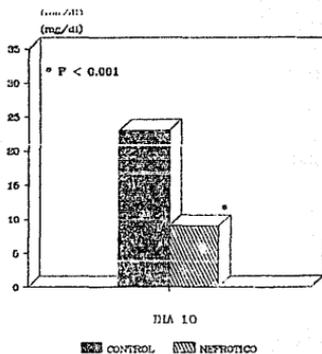


Figura 12 Concentración de ceruloplasmina en suero para el día 10. \* Significancia estadística por t no pareada.

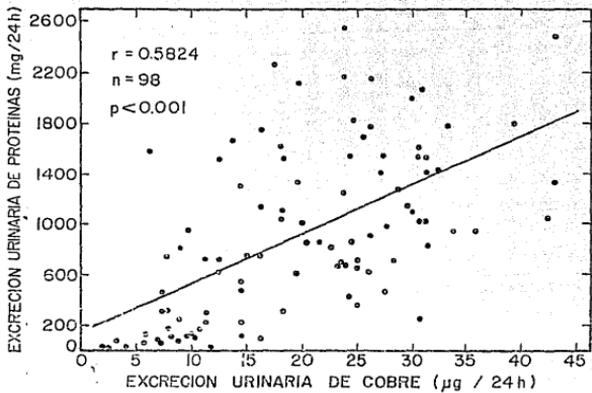


Figura 13 Correlación entre la excreción de proteínas y cobre en la orina. ( $p < 0.001$ ) t no pareada.

TEJIDO	CONTOLES	NEFRÓTICAS	SIGNIFICANCIA
RINON	86.8 ± 12.3 (9)	87.4 ± 31.0 (9)	NS
HIGADO	103.7 ± 15.1 (9)	110.8 ± 33.0 (10)	NS
TESTICULO	149.8 ± 14.8 (10)	150.6 ± 15.8 (8)	NS
PULMON	78.3 ± 9.6 (9)	65.14 ± 11.3 (9)	p<0.002
CORAZON	78.83 ± 16.4 (9)	72.25 ± 14.3 (9)	NS
BAZO	91.96 ± 12.7 (9)	81.36 ± 6.5 (6)	p<0.05
CEREBRO	63.56 ± 8.6 (10)	62.91 ± 9.4 (10)	NS

-----  
 TABLA 2 Contenido de zinc en los tejidos (ug/g Peso Seco).  
 (n), t no pareada.

TEJIDO	CONTROL	NEFROTICO	SIGNIFICANCIA
RINON	42.5 ± 12.3 (9)	26.8 ± 6.5 (9)	p<0.001
HIGADO	19.2 ± 5.2 (8)	10.8 ± 1.2 (9)	p<0.001
TESTICULO	15.0 ± 3.5 (8)	12.9 ± 1.0 (8)	NS
PULMON	11.95 ± 2.5 (9)	10.7 ± 2.6 (9)	NS
CORAZON	24.04 ± 5.5 (8)	21.3 ± 4.6 (9)	NS
BAZO	23.3 ± 8.9 (7)	18.5 ± 7.7 (6)	NS
CEREBRO	17.8 ± 2.6 (10)	14.9 ± 3.3 (10)	P<0.01

-----  
 TABLA 3 Contenido de cobre en los tejidos (ug/g Peso Seco) (n), t no pareada.

## VII DISCUSION

Los datos presentados en este trabajo demuestran que las ratas inyectadas con ANP desarrollaron el SN típico, caracterizado por proteinuria, hipoproteinemia, albuminuria, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia. Estas alteraciones remiten espontáneamente, lo cual está de acuerdo con trabajos previos (170,171) y con la forma humana de la enfermedad (157,158).

Por otro lado en este trabajo también se observó que las ratas nefróticas tienen profundas alteraciones en el metabolismo de zinc y cobre. Estas ratas presentaron concentraciones bajas de Cu y Zn en suero y algunos tejidos y elevada excreción urinaria de ambos minerales

Se ha reportado en estudios anteriores (59,60) que existe una buena correlación entre el zinc unido a albúmina y los cambios en la concentración de zinc que ocurren en enfermedades crónicas y agudas, por ejemplo la hipozincemia que se presenta como consecuencia de la hipoalbuminemia en la cirrosis del hígado. Nuestros datos confirman y amplían el estudio de Freeman et al (214) en estas ratas. Estos autores también observaron bajos niveles de Zn en suero, aumento en la excreción urinaria de zinc y niveles normales de Zn en riñón y testículos. Un aspecto interesante en este trabajo fue una ligera disminución en los niveles de zinc en pulmón y bazo (87 y 81 % de los valores control respectivamente) y normal en los otros 5 tejidos, por lo tanto, estas ratas no desarrollan una deficiencia de zinc como aquellas alimentadas con dieta deficiente de zinc (80).

Por lo tanto queda por establecer si las alteraciones en el metabolismo de zinc observadas en este trabajo en ratas nefróticas inducidas con ANP están involucradas en alguna complicación del SN. En humanos con SN se ha observado niveles bajos de zinc en cabello (215,220), eritrocitos (220), y leucocitos (220) a pesar de que en algunos estudios (215,217-219) la excreción de zinc fue normal. Por lo tanto, se ha sugerido que la deficiencia de zinc en humanos con SN puede contribuir a la disgeusia (220), impotencia (83), anorexia (83), deterioro en la inmunidad celular (158) y pobre cicatrización de heridas (223). Las alteraciones en el metabolismo de cobre no se habían estudiado previamente en ratas nefróticas inducidas con ANP. La disminución de cobre en suero fue más profunda que la de zinc, además, 4 de 7 tejidos estudiados mostraron disminución en los niveles de Cu. La disminución en el contenido de Cu en el riñón observado en este trabajo coinciden con los datos de Alfrey & Hammond (212) en ratas con nefritis de Heymann. Estos datos demuestran que las alteraciones en el metabolismo de Cu fueron más profundas que las de Zn en ratas inducidas con ANP. En algunos estudios en humanos con SN, se ha informado que los niveles de Cu en suero no se modifican a pesar de la alta excreción urinaria de este mineral (205,207,221,224,225); además en humanos con SN, se han reportado bajos niveles de Cu en eritrocitos (205). La disminución de los niveles de Cu y ceruloplasmina observados en las ratas nefróticas pueden estar involucrados en algunas de las complicaciones del SN. Por otro

lado, se ha informado que ratas deficientes de cobre tienen un deterioro en la función inmune (226), por lo tanto, es posible que la hipocupremia puede estar involucrada en el deterioro de la función inmune en el SN (158).

Se ha informado consistentemente en varios trabajos la, ratas con deficiencia de cobre desarrollan hipercolesterolemia (105-119), por lo tanto es posible que la deficiencia de Cu pueda estar relacionada en el estado hipercolesterolemico en ratas nefróticas inducidas con ANP.

Existe evidencia que especies reactivas de oxígeno, como los radicales libres, puedan estar involucradas en la patogénesis de la nefrosis inducida por ANP (227), sugiriendo que la deficiencia de Cu y ceruloplasmina puede ampliar el daño producido por ANP por las siguientes razones: a) La Cp es un atrapador de radicales libres y iones superóxido (228,229) y un inhibidor de lipoperoxidación (228), b) la deficiencia de Cu produce una disminución de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (132), c) los animales deficientes de Cu tienen un aumento en la producción de radicales libres (132) y d) la actividad antioxidante de Cp y transferrina se encuentra disminuida en la nefrosis experimental (211,212). Finalmente podría ser que los casos aislados que reportan anemia por deficiencia de hierro en pacientes con SN, que han sido atribuidos a excesiva pérdida urinaria de transferrina y hierro, puedan también involucrar deficiencia de zinc y cobre (206,230).

El (los) mecanismo (s) involucrados en las alteraciones

metabólicas de Cu y Zn en ratas nefróticas inducidas con ANP se desconoce.

Debido a que la ingesta de alimento fue similar en los dos grupos (control y nefrótico), los bajos niveles de ambos minerales en las ratas nefróticas no se puede explicar por el consumo de alimento, sin embargo, no se puede excluir alteraciones en la absorción intestinal producidas por componentes de la dieta (219,220).

El Cu en el plasma está unido principalmente a la ceruloplasmina (8,98), esto nos hace proponer que la excreción de ceruloplasmina y los bajos niveles en suero de esta proteína en ratas nefróticas inducidas con ANP, está involucrada en la alta excreción urinaria y bajos niveles circulantes de este metal. Contrariamente, Jensen (225) reportó que la hipocupremia no se presentó en pacientes nefróticos con bajos niveles de ceruloplasmina en el plasma. En suma, gran parte del zinc del plasma está unido a las proteínas, y la albúmina transporta la mayoría del Zn circulante (8), por lo tanto, la albuminuria y la hipoalbuminemia puede estar involucrada en la hiperzincuria y en la hipozincemia, respectivamente. Apoyando estas sugerencias encontramos:

- Los niveles elevados de zinc y en la orina aparecieron simultáneamente con la proteinuria en el día 3.
- Existió una correlación positiva entre la excreción de zinc y cobre y proteínas en orina.
- Los niveles séricos de zinc, cobre, albúmina y ceruloplasmina

disminuyeron en el día diez.

Contrariamente, la excreción de Cu aumentó en el día 1 en ausencia de la proteinuria sugiriendo que otros mecanismos pueden estar involucrados. Existe evidencias de que las alteraciones en el transporte de esos minerales también pueden estar involucrados en su alta excreción urinaria en SN (221,214), de hecho, se ha encontrado que animales y pacientes con defecto tubular en la reabsorción de Cu, se caracterizan por un aumento en la pérdida urinaria de este mineral (8).

## VIII CONCLUSIONES

1. Las ratas presentaron SN que se hizo evidente a partir del tercer día con la aparición de la proteinuria observándose hasta el final del estudio.
2. El aumento en excreción urinaria de zinc y cobre puede explicar al menos en parte la disminución de sus niveles circulantes.
3. El aumento en la excreción urinaria de zinc y cobre puede ser consecuencia de la proteinuria.
4. La disminución en la concentración de zinc y cobre en los tejidos de las ratas nefróticas tal vez sea consecuencia de la pérdida de estos minerales en la orina.
5. La deficiencia de zinc y cobre puede estar involucrada y/o agravar algunas de las manifestaciones sistémicas del SN.

## IX BIBLIOGRAFIA

1. Underwood EJ. Zinc. En: Underwood E. ed. Trace elements in human and animal nutrition 4th ed. New York: Academic Press 1977;196-247.
2. National Research Council. Zinc. En: National Research Council eds. Recommended dietary allowances Washington DC: National Academy of Sciences:1980:144-147.
3. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. Free Rad Biol Med 1990;8:281-291.
4. Lehninger AL. Principles of Biochemistry. En: Capitulo 26 Human Nutrition. Ed Worth Publisher, Inc. 1982:783.
5. Reeves PG, O'Dell BL. An experimental study of the effect of zinc on the activity of angiotensin converting enzyme in serum. Clin Chem 1985;31:581-584.
6. Dixon M. Webb EC. The Enzymes. New York: Academic 1979;1116.
7. Taylor KB, Anthony LE. Nutrición Clínica McGraw Hill de México. SA de CV. Capitulo 18. 1983:537-546.
8. Cousins RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiol Rev 1985;65:238-309.
9. World Health Organization. Trace elements in human nutrition, WHO Tech Rep Ser. no. 1973:532.
10. American Institute of Nutrition. Report of the AIN ad hoc committee on standards for nutritional studies. J Nutr 1977;107:1340-1348.
11. Burch RE, Hahn HKJ, Sullivan Jf. Newer aspects of the roles of zinc, manganese, and copper in human nutrition. Clin Chem 1975;21:501-520.
12. Owen CA. Biochemical Aspects of Copper: copper proteins, ceruloplasmin, and copper protein binding. Park Ridge, NJ: Noyes, 1982:205
13. Underwood EJ. Copper. En: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. New York: Academic. 1977:56-108.
14. Ciba foundation symposium 79. Biological roles of copper. Amsterdam /Oxford/New York: Excerpta Medica. 1980:343.
15. Lokitch G, Pendray MR, Godolphin WJ, Quigley G. Serial changes in selected serum constituents in low birth weight

infants on peripheral parenteral nutrition with different zinc and copper supplements. *Am J Clin Nutr* 1985;42:24-30.

16. Owen CA, Metabolism of copper 67 by the copper deficient rat. *Am J Physiol* 1971;221:1722-1727.

17. Gutteridge JMC, Stoks J. *CRC Crit. Clin Lab Sci* 1981;14:257-329.

18. Mann KG, Lawler CM, Verhar GA, Church WR. Coagulation factor V contains copper ion. *J Biol Chem* 1984;259:12949-12951.

19. Valentine JS, Pantoliano MW. Protein metal ion interactions in cuprozinc protein (superoxide dismutase) a major intracellular reposition for copper and zinc in the eukaryotic cell. En: *Copper Proteins*, editado por T. G. Spiro. New York: Wiley 1981:291-358.

20. Siegel RC. Lysyl oxidasa. *Int Rev Connect Tissue Res* 1979;8:73-118.

21. Solomons NW, Cousins RJ. Zinc. En: *Absorption and Malabsorption of Mineral Nutrients* editado por N.W. Solomons and I.H. Rosemberg. New York: Liss 1984:125-197.

22. Menard PC, MacCormic C, Cousins RJ. Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc. *J Nutr* 1981;111:1353-1361.

23. Giroux E, Prakash NJ. Influence of zinc-ligand mixtures on serum zinc levels of rats. *J Pharm Sci* 1977;66:391-392.

24. Suso FA, Edwards HM. Binding of EDTA, histidine and acetylsalicylic acid to zinc-protein complex in intestinal content, intestinal mucosa and blood plasma. *Nature* 1972;236:230-232.

25. Wapnir RA, Khani DE, Bayne MA, Lifshitz F. Absorption of zinc by the rat ileum: effects of histidine and other low-molecular-weight ligands. *J Nutr* 1983;113:1346-1354.

26. Martin MT, Licklider KF, Brushmiller LG, Jacobs FA. Detection of low-molecular-weight copper (II) and zinc (II) interactions following ethambutol administration. *Agents Actions* 1981;11:296-305.

27. May PM, Smith GL, Williams DR. Computer calculation of zinc (II)-complex distribution in milk. *J Nutr* 1982;112:1990-1993.

28. Evans GW. Zinc absorption and transport, in *Trace Elements in Human Health and Disease*. eds. Prasad AS y Oberleas D. Academic New York 1976:1

29. Hurley LS, Duncan JR, Ecker CD, Sloan MV. Zinc-binding ligands in milk and their relationship to neonatal nutrition. *En Trace Element Metabolism in Man and Animals* ed. Kirchgessner Technische Universität München, Freising-Weihenstephan 1978;3.
30. Richards MP, Cousins RJ. Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J Nutr* 1976;106:1591.
31. Bonewitz RF, Foulkes EC, O'flaherty EJ, Hertzberg VS. Kinetics of zinc absorption by the rat jejunum: effects of adrenalectomy and dexamethasone. *Am J Physiol* 1983;244:G314-G320.
32. Underwood EJ. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* 4th ed., Academic, New York 1976:196.
33. Solomans NW. Zinc and the gastroenterologist, *Practical Gastroenterol.* 1980;4:15.
34. Bush JA, Mahoney JP, Markowitz H, Glubler CJ, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XVI. Radioactive copper studies in normal subjects and in patients with hepatolenticular degeneration. *J Clin Invest.* 1955;34:1766-1778.
35. Van Campen DR, Mitchell EA. Absorption of  $Cu^{64}$ ,  $Zn^{66}$ ,  $Mo^{99}$ , and  $Fe^{59}$  from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *J Nutr* 1963;86:120-124.
36. Davis PN, Norris LC, Kratzer FH. Interference of soybean proteins with utilization of trace minerals. *J Nutr* 1962;77:217-223.
37. Engel RW, Price NO, Miller RF. Copper, manganese, cobalt, molybdenum balance in pre-adolescent girls. *J Nutr* 1967;92:197-204.
38. Greger JL, Snedeker SM, Effect of dietary protein and phosphorous levels on the utilization of zinc, copper and manganese. *J Nutr* 1980;110:2243-2253.
39. MacCall JT, Davis GK, Effect of dietary protein and zinc on the absorption and liver deposition of radioactive and total copper. *J Nutr* 1961;74:45-50.
40. Schultze MD, Elvehjem CA, Hart EB. Further studies on the availability of copper from various sources as a supplement to iron in hemoglobin formation. *J Biol Chem* 1936;115:453-457.
41. Chapman HLJ, Bell MC. Relative absorption and excretion by beef cattle of copper from various sources. *J Anim Sci* 1963;22:82-85.

42. Carlton WW, Henderson W. Studies in chickens fed a copper-deficient diet supplemented with ascorbic acid. *J Nutr* 1965;85:67-72.
43. Hill CH, Starcher B. Effect of reducing agents on copper deficiency in the chick. *J Nutr* 1965;85:271-274.
44. Van Campen DR, Gross E. Influence of ascorbic acid on the absorption of copper by rats. *J Nutr* 1968;95:617-622.
45. Cymbaluk NF, Schryver HF, Hintz HF, Smith DF, Lowe JE. Influence of dietary molybdenum on copper metabolism in ponies. *J Nutr* 1981;111:96-106.
46. Suttle NF. Recent studies of the copper-molybdenum antagonism. *Proc Nutr Soc* 1974;33:299-305.
47. Kelsay JL, Jacob RA, Prathers ES. Effect of fiber fruits and vegetables on metabolic responses of human subject.III. Zinc, copper and phosphorus balances. *Am J Clin Nutr* 1979;32:2307-2311.
48. Keen CL, Saltman P, Hurley L. Copper nitrilotriacetato: a Potent therapeutic agent in the treatment of a genetic disorder of copper metabolism. *Am J Clin Nutr* 1980;33:1789-1800.
49. Gollan JL, Deller DJ. Studies on the nature and excretion of biliary copper in man. *Clin Sci* 1973;44:9-15.
50. Jamison MH, Sharma H, Csaie RM, Braganza JM. Pancreatic secretions assist bile in limiting copper absorption in the rat. *Gut* 22;1981:A866-A867.
51. Benson GD. Hepatic copper accumulation in primary biliary cirrhosis. *Yale J Biol Med* 1979;52:83-88.
52. Mearrick PT, Mistilis SP. Excretion of radiocopper by the neonatal rat. *J Lab Clin Med* 1969;74:421-426.
53. Boyet JD, Sullivan JF. Distribution of protein-bound zinc in normal and cirrhotic serum. *Metabolism* 1970;19:148-157.
54. Chester JK, Will M. Measurement of zinc flux through plasma in normal and endotoxin-stressed pigs and the effects of Zn supplementation during stress. *Br J Nutr* 1981;46: 119-130.
55. Giroux EL. Determination of zinc distribution between albumin and  $\alpha_2$ -macroglobulin in human serum. *Biochem Med* 1975;12:258-266.
56. Giroux EL, Durieux M, Schechter PJ. A study of zinc distribution in human serum. *Bioinorg Chem* 1976;5:211-218.

57. Scott BJ, Bradwell AR. Identification of the serum binding protein for iron, zinc, cadmium, nickel and calcium Clin Chem 1983;29:629-633.
58. Prasad AS, Oberleas D. Binding of zinc to amino acids and serum proteins in vitro. J Lab Clin Med 1970;76:416-425.
59. Falchuck KH. Effect of acute disease and ACTH on serum zinc proteins. N Engl J Med 1977;296:1129-1134.
60. Halsted JA, Smith JC, Irwin MI. A conspectus of research on zinc requirements of man. J Nutr 1974;104:347-378.
61. Parisi AF, Valle BL. Isolation of a zinc  $\alpha$ 2-macroglobulin from human serum. Biochemistry 1970;9:2421-2526.
62. Swanson CA, King JC. Reduced serum zinc concentration during pregnancy. Obstet Gynecol 1983;62:313-318.
63. Morgan WT. Interactions of the histidine-rich glycoprotein of serum with metals. Biochemistry 1981;20:1054-1061.
64. Leucke RW, Olman ME, Baltzer BV. Zinc deficiency in the rat: effect on serum and intestinal alkaline phosphatase activities. J Nutr 1968;94:344-350.
65. Richards MP, Cousins RJ. Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. J Nutr 1976;106:1591-1599.
66. Richards MP, Cousins RJ. Zinc-binding protein: relationship to short term changes in zinc metabolism. Proc Soc Exp Biol Med 1976;153:52-56.
67. Wilkins PJ, Grey PC, Dreosti IE. Plasma zinc as an indicator of zinc status in rats. Br J Nutr 1972;26:113-120.
68. Prasad AS, Rabbani P, Abbasil A, Bowersox E, Fox MRS. Experimental zinc deficiency in humans. Ann Intern Med 1978;89:483-490.
69. Henry RW, Elmes ME. Plasma zinc in acute starvation. Br Med J 1975;4:625-626.
70. MacCormick CC, Menard PM, Cousins RJ. Induction of hepatic metallothionein by feeding zinc to rats of depleted zinc status. Am J Physiol 1981;240:E414-E421.
71. Henkin RI. Metal-albumin-amino acid interactions: chemical and physiological relationships. En: Protein-metal interactions, editado por M. Friedman. New York: Plenum, 1974:299-328.

72. Yunice AA, King RW Jr, Kraikitpanicht S, Haygood CC, Lindeman RD. Urinary zinc excretion following infusions of zinc sulfate, cysteine, histidine or glycine. *Am J Physiol* 1978;235:F40-F45.

73. Van Rij AM, Godfrey PJ, McKenzie JM. Amino acid infusions and urinary zinc excretion *J Surg Res* 1979;26:293-299.

74. Arnaud P, Gianazza E, Miribel L. Ceruloplasmin. *Meth Enzymol* 1988;163:441-453.

75. Poulik MD, Weiss ML. Ceruloplasmin. In: *The plasma protein structure function and genetic control*. 2a ed. Vol II F.W. Putnam ed. New York, Academic Press 1975:51-108.

76. Buhler RHO, Kagi JHR. Human hepatic metallothioneins. *FEBS Lett.* 1974;39:229-234.

77. Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR, Darby WJ. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. *Arch Intern Med* 1963;111:407-428.

78. Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR. Zinc metabolism in patients with syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. *Lab Clin Med* 1963;61:537-549.

79. Sandstead HH, Prasad AS, Farid Z. Human zinc deficiency, endocrine manifestations, and response to treatment. *Am J Clin Nutr* 1967;20:422-442.

80. Prasad AS, Oberleas D, Wolf P, Horwitz JP. Studies on zinc deficiency: Changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. *J Clin Invest* 1967;46:549-557.

81. Halsted JA, Ronaghy HA, Abadi P. Zinc deficiency in man: the shiraz experiment. *Am J Med* 1972;53:277-284.

82. Sandstead HH. Zinc deficiency. A public health problem. *AJDC* 1971;145:853-859.

83. Temes-Montes, X.L., Picaporte MA, Herrero E, Selgas R, Beberide JM, Martinez-Ara, Sánchez-Sicilia L. Valores séricos y urinarios de zinc en nefropatías exteriorizadas por síndrome nefrótico o como proteinuria en rango nefrótico. *Rev Clin Esp* 1980;159:159-161.

84. Cunningham-Rundles S, Bockman RS, Lin A, Giardina PV, Hilgartner MW, Caldwell-Brown D, Carter DM. Physiological and pharmacological effects of zinc on immune response. *Ann NY Acad Sci* 1990;587:113-122.

85. Beisæl WR, Pekarek RS, Wanemacher RW Jr. In trace element metabolism in animals 2 ed. WG Hoekstra, JW Suttie, H Ganther, W Mertz, chap 16. Baltimore: Univ Park press 1974:217-240.
86. Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS. Altered thymic structure and mitogen responsiveness in postnatally zinc-deprived mice. *Dev Comp Immunol* 1979;3:725-738.
87. Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS. Growth and development of postnatally zinc-deprived mice. *J Nutr* 1980;110:201-211.
88. Dowd PS, Kelleher J, Guillou PJ. T-lymphocyte subsets and interleukin-2 production in zinc-deficient rats. *Br J Nutr* 1986;55:59-69.
89. Fraker PJ, Haas SM, Luecke RW. Effect of zinc deficiency on the immune responses. *J Nutr* 1977;107:1889-1895.
90. Gershwin ME, Beach RS, Hurley LS. *En Nutrition and Immunity*. New York: Academic. 1985:405.
91. Bala S, Failla ML, Lunney J. T cell numbers and mitogenic responsiveness of peripheral blood mononuclear cells are decreased in copper deficient rats. *Nutr Res* 1990;10:749-760.
92. Bala S, Failla M, Lunney J. Phenotypic and functional alterations in peripheral blood mononuclear cells of copper-deficient rats. *Ann N Y Acad Sci* 1990;587:283-285.
93. Mulhern SA, Koller LD. Severe or marginal copper deficiency results in a graded reduction in immune status in mice. *J Nutr* 1988;118:1041-1047.
94. Undomkesmalee E, Dhanamitta S, Yhoun-Aree J, Rojroongwasinkul N, Smith C Jr. Biochemical evidence suggestive of suboptimal zinc and vitamin A status in school children in Northeast Thailand. *Am J Clin Nutr* 1990;52:564-567.
95. O'Dell BL, Conley-Harrison J, Besch-Williford C, Browning JD, O'Brien D. Zinc status and peripheral nerve function in guinea pigs. *FASEB J* 1990;4:2919-2922.
96. O'Dell BL, Becker JF, Emery MP, Browning JD. Production and reversal of the neuromuscular pathology and related signs of zinc deficiency in guinea pigs *J Nutr* 1989;119:196-201.
97. Hassel CA, Marchello JA, Lei KY. Impaired glucose tolerance in copper-deficient rats. *J Nutr* 1983;113:1081-1083.
98. Danks DM. Copper deficiency in humans. *Ann Rev Nutr* 1988;8:235-257.

99. Choudry H, Srivastava L, Murthy L, Petering HG. Effects of dietary copper on insulin and thyroxine in male rats. Western Hemisphere Nutrition Congress VI, Los Angeles, CA, Aug. 1980, Official Program. 1981:84.

100. Jain SK, Williams DM. Copper deficiency anemia: altered red blood cell lipids and viscosity in rats. *Am J Clin Nutr* 1988;48:637-640.

101. Shohet SB. Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids. *N Engl J Med* 1972;286:577-583.

102. Dormandy JA. Blood viscosity and red cell deformability. *Methods Angiol* 1980;2:214-266.

103. Whitmore RL. The influence of erythrocyte shape and rigidity on the viscosity of blood. *Biorheology* 1981;18:557-562.

104. Yount NY, Carr TP, MacNamara DJ, Lei KY. Incorporation of water into sterol in copper-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 1991;1082:79-84.

105. Klevay LM. Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested. *Am J Clin Nutr* 1973;26:1060-1068.

106. Ley KY. -----  
----- J Nutr 1983;113:2179-2183. ?

107. Ley Ky. Cholesterol metabolism in copper-deficient rats. *Nutr Rep Int* 1977;15:579-185.

108. Allen KGD, Klevay LM. Cholesterolemia and cardiovascular abnormalities in rats caused by copper deficiency. *Atherosclerosis* 1978;29: 81-89.

109. Harvey PW, Allen KGD. Decreased plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity in copper-deficient rats. *J Nutr* 1981;111:1855-1891.

110. O'Dell Copper-zinc interaction, effect of excess dietary zinc on copper status, Proc N.Z. Workshop on trace elements in New Zealand, University of Otago, Dunedin, 1981:157-162.

111. Nielsen FH, Zimmerman TJ, Shuler TR. Interaction among nickel, copper and iron rats. Liver and plasma content of lipids and trace elements. *Biol Trace Elements Res* 1982;4:125-132.

112. Reiser S, Ferreti RJ, Fields M, Smith JC. Role of dietary fructose in the enhancement of mortality and biochemical changes associated with copper deficiency in rats. *Am J Clin Nutr* 1983;38:214-223.

113. Wu BN, Medeiros DM, Lin KN, Thorne BM. Long term effects of dietary copper and sodium upon blood pressure in the Long-Evans rat. *Nutr Res* 1984;4:305-313.
114. Jones DG. Effects of dietary copper depletion on acute delayed inflammatory responses in mice. *Res Vet Sci* 1984;37:205-211.
115. Lefebvre M, Keen CL, Lonnerdal B, Hurley LS, Schneman BO. Copper deficiency-induced hypercholesterolemia: effects on HDL subfractions and lipoprotein receptor activity in the rat. *J Nutr* 1986;116:1735-1742.
116. Valsala P, Kurup PA. Investigations on the mechanism of Hypercholesterolemia observed in copper deficiency in rats. *J Biosciences* 1987;12:137-145.
117. Lynch SM, Strain JJ. Effects of dietary copper deficiency on hepatic antioxidant enzymes in male and female rats. *Nutr Rep Int* 1988;37:1127-1135.
118. Koo SI, Lee CC, Norvell JE. Effect of copper deficiency on the lymphatic absorption of cholesterol plasma chylomicron clearance, and post heparin lipase activities. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188:410-418.
119. Cunnane SC, MacAdoo KR, Karmazyn M. Copper intake affects rat heart performance during ischemia-reperfusion: possible relation to altered lipid and fatty acid metabolism. Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids. 1988;34:61-79.
120. White CI. Relationship between plasma zinc, angiotensin-converting enzyme, alkaline phosphatase and onset of symptoms of zinc deficiency in the rat. *Aust J Biol Sci* 1988;41:34-56.
121. Mills CF, Quarterman J, Williams RB, Dalgarano AC, Panic B. The effects of zinc deficiency on pancreatic carboxypeptidase activity and protein digestion and absorption in the rat. *Biochem J* 1967;102:712-718.
122. Taylor CG, Bettger WJ, Bray TM. Effects of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. *J Nutr* 1988;118:613-621.
123. Johanning GL, Browning JD, Bobilya DJ, Veum TL, O'Dell BL. Effect of zinc deficiency on enzyme activities in rat and pig erythrocyte membranes. *P.S.E.B.M.* 1990;195:224.
124. Bettger WJ, Fish TJ, O'Dell BL. Effects of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;158:279-282.

125. O'Dell BL, Browning JD, Reeves PG. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes J Nutr 1987;117:1883-1889.

126. Taylor CG, Bray TM. Effect of hyperoxia on oxygen free radical defense enzymes in the lung of Zinc-deficient rats. J Nutr 1991;121:460-466.

127. Thomas JP, Bachowski GJ, Girotti AW. Inhibition on cell membrane lipid peroxidation by cadmium and zinc-metallothioneins. Biochim Biophys Acta 1986;884:448-461.

128. Taylor CG, Towner RA, Janzen EG, Bray TM. MRI detection of hyperoxia -induced lung edema in zinc deficient rats. Free Radical Biol Med 1990;9:229-233.

129. Taylor CG, Bray TM. Increased lung copper-zinc-superoxide dismutase activity and absence of magnetic resonance imaging-detectable lung damage in copper-deficient rats exposed to hyperoxia. J Nutr 1991;121:467-473.

130. Prohaska JR. Changes in Cu, Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, Glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. J Nutr 1991;121:355-363.

131. Prohaska JR. Biochemical changes in copper deficiency. J Nutr Biochem 1990;1:452-461.

132. Jenkinson SG, Lawrence RA, Burk RF, Williams DM. Effects of copper deficiency on the activity on the selenoenzyme glutathione peroxidase and on excretion and tissue retention of  $^{75}SeO_4^{2-}$  J Nutr 1982;112:197-204.

133. Saari JT, Dickerson FD, Habib MP. Ethane production in copper-deficient rats. P.S.E.B.M. 1990;195:30-33.

134. Paynter DI, Moir RJ, Underwood EJ. Changes in activity of the Cu-Zn Superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary copper. J Nutr 1979;109:1570-1579.

135. L'Abbe MR, Fischer PWF. The effects of high dietary zinc and copper deficiency on the activity of copper-requiring metalloenzymes in the growing rat. J Nutr 1984;114:813-822.

136. Lawrence RA, Jenkinson SG. Effects of copper deficiency on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation. J Lab Clin Med 1987;109:134-140.

137. Davis GK, Mertz W. Copper. En: Trace elements in human and animal nutrition (Editado por Mertz W), Academi press, New York Vol I 5th Ed 1987:301-364.

138. Shields GS, Coulson WF, Kinball DA, Carnes WH, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XXXII. Cardiovascular lesion in copper-deficient swine. *Am J Path* 1962;41:603-621.
139. Klevay LM. Ischemic heart disease as copper deficiency. In: *Copper Bioavailability and Metabolism*. Edited by Constance Kies. Plenum Publis Corporation. 1990:197-208.
140. Schoenemann HM, Failla ML, Steele NC. Consequences of severe copper deficiency are independent of dietary carbohydrate in young pigs *Am J Clin Nutr* 1990b;52:147-154.
141. Klevay LM. Ischemic heart disease. A major obstacle to becoming old. *Clin Geriatric Med* 1987;3:361-369.
142. Klevay LM. The role of copper, zinc, and other chemical elements in ischemic heart disease. En: *Metabolism in trace metals in man*. Vol I. D.M. Rennert and W-Y. Chan, Boca Raton, FL, CRC Press. 1984:129-154.
143. Klevay LM, Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis *Am J Clin Nutr* 1975;28:764-772.
144. Klevay LM. Elements of ischemic heart disease. *Perspect Biol Med* 1977;20:186-194.
145. Klevay LM. The role of copper and zinc in cholesterol metabolism. En: *Advances in Nutritional Research*, Vol I H.H. Draper ed. Plenum Publishing Corp, New York 1977:227-235.
146. Klevay LM. The influence of copper and zinc on the occurrence of ischemic heart disease. *J Environ Pathol Toxicol* 1980;4:281-292.
147. Klevay LM. interactions of copper and zinc in cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1980;355:140-148.
148. Klevay LM. Ischemic heart disease: Updating the zinc/copper hypthesis. En: *Nutrition in Hearth Disease* H.k. Naito ed. S.P. Medical & Scientific Books New York 1982;61-69.
149. Klevay LM. Copper and ischemic heart disease. *Biol Trace Element Res* 1983;5:245:251
150. Klevay LM. Dietari copper: A powerful determinant of cholesterolemia. *Med Hypoth* 1987;24:111-120.
151. Medeiros DM, Bagby D, Ovecka G, MacCormick R. Myofibrillar, mitochondrial and valvular morphological alterations in cardiac hypertrophy among copper-deficient rats. *J Nutr* 1991;121:815-824.

152. Bugaisky L, Zak R. Biological Mechanisms of hypertrophy. En: Fozzard H.A. Jennings R.B. Haber E, Katz, A. M. & Morgan H.E. The heart and cardiovascular system: scientific foundation, Vol II Raven Press New York 1986:1491-1506.

153. Schoenemann HM, Failla ML, Rosebrough RW. Cardiac and splenic levels of norepinephrine and dopamine in deficient pigs and rats. *Comp Biochem Physiol* 1990;97:387-391.

154. Seidel KE, Failla MK, Rosebrough RW. Cardiac catecholamine metabolism in Copper-deficient rats. *J Nutr* 1991;121:474-483.

155. Hesketh JE. The effect of nutritional copper deprivation on the catecholamine content and dopamine-B-hydroxylase activity of rat and cattle adrenal gland. *Gen Pharmacol* 1981;12:445-449.

156. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. En Brenner BM, Stein JH, eds. *Nephrotic syndrome, Contemporary issues in nephrology*, Vol 9. New York: Churchill Livingstone 1982: 85-119.

157. Skorecki KL, Nadler SP, Badr KF, Brenner BM. Renal and systemic manifestations of glomerular disease. En: Brenner BM Rector FC, eds. *The kidney*, Philadelphia:Saunders,1986:891-928.

158. Bernard, DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney int* 1988; 1184-1202.

159. Schnaper HW, Robson AM, Nephrotic syndrome: minimal change disease, focal glomerulosclerosis, and related disorders. En:Schrier RW, Gottschalk CW, eds. *Diseases of the Kidney*. 4a edición, Vol II Boston/Toronto:Little Brown,1988:1949-2004.

160. Haymann W, Lund HZ. Nephrotic syndrome in rats. *Pediatrics* 1951;7:691-698.

161. Frenk S, Antonowics I, Craig JH, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.

162. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982;46:16-21.

163. Marsh BJ, Drabkin DL. Metabolic Channeling in experimental nephrosis. *Lipid Metabolism. J Biol Chem* 1955;46:16-23.

164. Morisaki N, Matsuola N, Saito Y, Kumagal A. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism* 1984;33:405-410.

165. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Activity of serum enzymes in puromycin aminonucleoside induced nephrotic syndrome. *Renal Failure*, en prensa.
166. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J Lab Clin Med* 1957;50:437-446.
167. Chavez-Ponce MT. Caracterización del sistema renina-angiotensina-aldoesterona en el síndrome nefrótico experimental. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Unam 1988:21-27.
168. Ibarra-Rubio ME. Niveles hepáticos del ARNm de diferentes proteínas plasmáticas en el síndrome nefrótico experimental. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias, UNAM, 1990:1-8.
169. Vernier RL, Papermaster BW, Bood RA. Aminonucleoside nephrosis: I Electron microscopic studies of the renal lesions in rats *J Exp Med* 1959;109:115-126.
170. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, Hypoproteinemia, and renin-angiotensin-system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42: 29-38.
171. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on sodium retention and proteinuria. *Rev Invest Clin* 1990;42:210-216
172. Ginerri F, Gusman R, Oleggini R, Acerbo S, Bertelli R, Perfumo F, Cercignani G, Allegrini S, D'Allegrì F, Ghigeri G. Renal purine efflux and xanthine oxidase activity during experimental nephrosis in rats: difference between puromycin aminonucleoside and adriamycin nephrosis. 1990;78:283-293.
173. Porter JM, Hewitt RI, Hassetline CW, Kupka G, Lowery JA, Wallace WS, Bohonos N, Williams JH. Achromycin: a new antibiotic having trypanocidal properties. *Antibiot Chemother* 1952;2:409-410.
174. Baker BR, Joseph JP, Williams JH. Puromycin. Synthetic studies VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 1954;76:2838.
175. Spear GS. DMSO Potentiates aminonucleoside of puromycin nephrosis in rats. *J Pathol* 1987;153:183-187.

176. Farnham AE. Effect of aminonucleoside (of puromycin) on normal and encephalomyocarditis (EMC) virus-infected L cells. *Virology* 1965;27:73-79.

177. Karnofsky DA, Clarkson BD. Cellular effects of anticancer drugs. *Ann Rev Pharmacol* 1963;3:357-428.

178. Rabinovitz M, Fisher JM. A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein synthesis by Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 1962;237:477-481.

179. Nathans D, Neidle A. Structural requirements for puromycin inhibition of protein synthesis. *Nature* 1963;197:1076-1077.

180. Diamond JR, Bonventre JV, Karnofsky MJ. Role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986;29:478-483.

181. Beaman B, Birtwistle R, Hawie AJ, Michael J, Adu D. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 1987;73:329-332.

182. Granger DN, Rutigli G, McCord J. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;81:22-29.

183. Lewandoski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kent JD, Jefferson LS. Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 1988;254:C634-C642.

184. Girout R, Jaubert F, Leon M, et al. Albumin, fibrinogen, prothrombin III variations in blood, urines and liver in rat nephrotic syndrome (Heymann nephritis). *Tromb Haemostas* 1983;49:13-17.

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

186. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chavez MT. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II in vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev Invest Clin* 1990;42:120-126.

187. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC. Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephrotic rats. Nephron* 1991;57:106-108.

188. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Sandoval AA, Tapia E, Peña JC. Effect of captopril on urinary excretion of renin and

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- angiotensinogen in aminonucleoside-nephrosis. Renal Failure 1972;14:155-159.
189. Chan Y-L, Mason RS, Parmentier M, Savdie E, Lissner D, Posem S. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. Kidney Int 1983;24:336-341.
190. Khamiseh G, Vaziri ND, Oveisi F, Ahmadnia MR, Ahmadnia L. Vitamin D absorption, plasma concentration and urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. Proc Soc Exp Biol Med 1991;196:210-213.
191. Beaman M, Oldfield S, MacLennan ICM, Michael J, Adu D. Hypogammaglobulinaemia in nephrotic rats is attributable to hypercatabolism of IgG. Clin Exp Immunol 1988;74:425-430.
192. Houseley J, Jones L, Harvey A. Serum  $\alpha$ -macroglobulins in rat aminonucleoside nephrosis. Clin Chim Acta 1968;21:85-90
193. Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Serum angiotensin converting enzyme activity and plasma renin activity in experimental models of rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 1990;17:393-399.
194. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin-I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. Clin Chim Acta 1990;191:175-184.
195. Marsh NA. The fibrinolytic enzyme system of the rat: the effect of aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. Br J Exp Pathol 1969;50:1-12.
196. Calderon Gonzalez P. Analisis electroforético secuencial de proteínas séricas y urinarias en ratas con síndrome nefrótico experimental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM 1992:1-10.
197. Kanwar YS. Biology of disease. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. Lab Invest 1984;51:7-21.
198. Schneeberger EE. Glomerular permeability to protein molecules. Its possible structural basis. Nephron 1974;13:7-12.
199. Rennke HG, Venkatchalam MA. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. J Clin Invest 1979;63:713-717.
200. Mohos SC, Skcoza L. Histochemical demonstration and localization of sialoproteins in the glomerulus. Exp Mol Pathol 1970;12:316-323.

201. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM. Mechanism of puromycin induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1977;60:152-161.
202. Hunsicker LG, Shearter TP, Shaffer SJ. Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexadimethrine. *Kidney Int* 1981;20:7-17.
203. Charest PM, Roth J. Localization of sialic acid in kidney glomeruli; regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8508-8512.
204. Cartwright GE, Gubler CJ, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XI. Copper and iron metabolism in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1954;33:685-698.
205. Ellis D. Anemia in the course of the nephrotic syndrome secondary to transferrin depletion. *J Pediatr* 1977;90:953-955.
206. Brown EA, Sampson B, Muller BR, Curtis JR. Urinary iron loss in the nephrotic syndrome-an unusual cause of iron deficiency with a note on urinary copper losses. *Post Med J* 1984;60:125-128.
207. Wiltink Wf, Van Eijk HG, Bobeck-Rutsaert MM, Gerbrandy J, and Leijne B. Urinary iron excretion in nephrotic syndrome. *Acta Haemato* 1972;47:269-276.
208. Rifkind D, Kravetz HM, Knight V, Schade AL. Urinary excretion of iron-binding protein in the nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1961;265:115-118.
209. Dagg JH, Smith JA, Goldberg A. Urinary excretion of iron. *Clin Sci* 1966;30:495-501.
210. Hainero A, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Serum and urinary ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome *Clin Invest Med* en prensa.
211. Alfrey AC, Hammond Ws. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1990;37:1409-1413.
212. Richard MJ, Arnaud J, Jurkowitz C, Hachache T, Meitahi H, Laporte F, Foret M, Favier A, Cordonier D. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991;57:10-15.
213. Freeman RM, Richards CJ, Rames LK. Zinc metabolism in aminonucleoside-induced nephrosis. *Am J Clin Nutr* 1975;28:699-703.

214. Reimold, EW. Changes in zinc metabolism during the course of the nephrotic syndrome. *Am J Dis Child* 1980;134:46-50.
215. MacCance RA, Widdowson EM. The absorption and excretion of zinc. *Biochem J* 1942;36:692-696.
216. Fairhall LT, Hoyt LH. The excretion of zinc in health and disease. *J Clin Invest* 1929;7:537-541.
217. Lindeman RD, Baxter DJ, Yunice AA, Kraikitpanitch S. Serum concentrations and urinary excretion of zinc cirrosis, nephrotic syndrome and renal insufficiency. *Am J Med Sci.* 1978;275:17-31.
218. Tümer N, Baskan S, Arcasoy A, Çavdar AD, Ekim M. Zinc metabolism in nephrotic syndrome. *Nephron* 1989;52:95.
219. Mahajan S, Speck J, Varghese G, Abu-Hamdan D, Migdal S, Briggs W, Prasad A, Macdonald F. Zinc metabolism in nephrotic syndrome. *Nutr Res* 1985;1:340-362.
220. Stec J, Podracka O, Kollar J. Zinc and copper metabolism in nephrotic syndrome. *Nephron* 1990;56:186-187.
221. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8:219-232.
222. Glasscock RJ, Adler SG, Ward HJ, Cohen AH. Primary glomerular diseases. En: *The kidney*. Brenner BM, Rector FC Jr. Saunders: Philadelphia 1991;1182-1279.
223. Markowitz H, Gubler CJ, Mahoney JP, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XIV. Copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1955;43:1498-1506.
224. Jensen H. Plasma protein and lipid pattern in nephrotic syndrome. *Act Med Scand* 1967;182:465-473.
225. Prohaska JR, Lukasewycz DA. Effects of copper deficiency on the immune system. *Adv Exp Med Biol* 1990;262:123-146.
226. Diamond JR. The of reactive oxygen species in animal models of glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 1992;19:292-230.
227. Blake DR, Hall ND, Treby DA, Haliwel B, Butteridge JMC. Oxygen free radicals and lipid peroxidation inhibition by the protein ceruloplasmin. *FEBS Lett* 1980;112:269-274.
228. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissman G.

Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide anion radicals J Biol Chem 1979;254:4044-4045.

229. Hancock DE, Onstad JW, Wolf PL. Transferrin loss into the urine with hypochromic, microcytic anemia. Am J Clin Pathol 1976;65:73-78.

230. Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein determination with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-272.

231. Beaty RD. Conceptos, instrumentación y técnicas de espectrofotometría de absorción atómica. Ed. Perkin Elmer Corporation 1979.

232. Butrimovitz GP, Purdy WC. The determination of zinc in blood plasma by atomic absorption spectrometry. Anal Chim Acta 1977;94:63-71.

233. Dawson JB, Ellis DJ, Newton-John H. Direct estimation of copper in serum and urine by atomic absorption spectroscopy. Clin Chim Acta 1968;21:33-41.

234. Fernandez FJ, Kahn HL. Clinical methods for atomic absorption spectroscopy. Clin Chem News 1971;3:24-31.

235. Makino T, Takahara K. Direct determination of plasma copper and zinc in infants by atomic absorption with discrete nebulization. Clin Chem 1981;27:1445-1453.

236. Parker MM, Humoller FL, Mahler DJ. Determination of copper and zinc in biological material. Clin Chem 1967;13:40-48.

237. Weinstock N, Uhlemann M. Automated determination of copper in undiluted serum by atomic absorption spectroscopy. Clin Chem 1981;27:1438-1446.

238. Roach AG, Sanderson P, Williams DR. Determination of trace amounts of copper, zinc and magnesium in animal feeds by atomic-absorption spectrophotometry. Analyst 1968;93:42-49.