

71
205



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ALTERACIONES EN LOS SISTEMAS
DE COAGULACION Y FIBRINOLITICO
EN RATAS CON SINDROME NEFROTICO
EXPERIMENTAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA
FRANCISCO JUAREZ NICOLAS

MEXICO, D.F.

1993.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El propósito del presente estudio fué determinar el tiempo de protrombina (TP); y el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa) y la actividad de: a) los siguientes factores de coagulación (FC): I,II,V y del VII al XII; b) el inhibidor de la coagulación antitrombina III (AT III) y el componente del sistema fibrinolítico alfa₂-antiplasmina (alfa₂-APL) en plasma y en orina de ratas control (n=10) y de ratas inyectadas con aminonucleósido de puromicina (ANP) en una dosis de 15 mg/100 g de peso corporal en los días 2 (estado pre-nefrótico, n=10) y día 10 (estado nefrótico, n=10). Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 hrs. Las actividades de los FC, AT III y alfa₂-APL se midieron usando reactivos comercialmente disponibles. Las actividades en plasma y orina están expresadas como porcentaje del obtenido a partir de un pool de plasmas de ratas normales, con excepción del factor I que se midió por el método de Clauss modificado, y está expresado en mg/dl. También se midieron las proteínas plasmáticas y urinarias y el colesterol plasmático. En el día 2, las ratas tenían las proteínas plasmáticas y urinarias normales y el colesterol del plasma normal y no se detectó excreción urinaria de ningún FC, de AT III, o de alfa₂-APL; sin embargo, en plasma el FC VIII y AT III disminuyeron a 42% y 86% respectivamente. En el día 10 las ratas tenían proteinuria, hipoproteinemia; hipercolesterolemia; niveles plasmáticos altos de los siguientes FC: I (183 mg/dl vs 97 mg/dl en los controles); II(132%); V(452%); VII(366%); VIII(378%); X(242%) y XI (210%); y actividad plasmática baja de AT III (11%) y actividad plasmática normal de los FC IX y XII y de alfa₂-APL.

El TP disminuyó de 12.8 a 10 seg. y el TPTa disminuyó de 22.8 a 16.3 seg. Los siguientes FC: II(8%); VII(147%); VIII(7%); IX(30%); X(63%); XI(69%) y XII(56%), y AT III(88%) aparecieron en la orina del día 10. Las alteraciones observadas en el estado pre-nefrótico (día 2) podrían deberse al efecto directo del ANP. En contraste, los cambios en el día 10 están probablemente relacionados con el estado nefrótico. La deficiencia de AT III fué probablemente consecuencia su pérdida urinaria.

En contraste con el síndrome nefrótico humano donde el FC II está normal o bajo; los FC IX, XI, y XII están bajos y la alfa₂-APL es alta o baja; en ratas con síndrome nefrótico experimental: los FC II y XI están altos; y la alfa₂-APL, y los FC IX, XII están normales. Estos datos demuestran que en las ratas con SN experimental tienen profundas alteraciones en el sistema de coagulación, algunas de las cuales son diferentes a las descritas en pacientes con síndrome nefrótico.

INDICE

	PAGINA
I.- INTRODUCCION.....	1
A) GENERALIDADES DEL SINDROME NEFROTICO.....	1
B) HEMOSTASIS.....	3
C) MECANISMOS DE HEMOSTASIS.....	5
D) COAGULACION.....	6
E) BIOQUIMICA DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION.....	7
F) INHIBIDORES DE LA COAGULACION.....	12
G) FIBRINOLISIS.....	14
II.- ANTECEDENTES.....	15
A) ANORMALIDADES DE COAGULACION EN EL SINDROME NEFROTICO....	15
III.- OBJETIVO	21
IV.- MATERIAL Y METODOS.....	22
A) REACTIVOS.....	22
B) EQUIPO.....	23
C) MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
D) DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
E) DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES.....	24
F) DETERMINACION DE COLESTEROL.....	25
G) DETERMINACION DE CREATININA.....	25
H) DETERMINACION DE UREA.....	28
I) DETERMINACION DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION.....	30
I.1 TIEMPO DE PROTROMBINA.....	30
I.2 TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA.....	30

I.3 FIBRINOGENO.....	31
I.4 FACTORES DE LA COAGULACION.....	31
J) DETERMINACION DE AT III Y ALFA ₂ -APL.....	34
K) ANALISIS ESTADISTICO.....	35
V.- RESULTADOS.....	36
VI.- DISCUSION.....	46
VII.- CONCLUSIONES.....	51
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	52

I INTRODUCCION

A) GENERALIDADES DEL SINDROME NEFROTICO

El síndrome nefrótico (SN) se caracteriza por proteinuria, albuminuria, hipoproteinemia, disminución de la presión coloidosmótica, ascitis, edema, lipiduria, retención de sodio, hipercolesterolemia (1,2). En el laboratorio se han desarrollado modelos experimentales que sirven para estudiar las bases bioquímicas y fisiológicas de las alteraciones en esta enfermedad. Los modelos usados comúnmente para estudiar el SN son: 1.- inyección de suero antirriñón (nefritis por suero nefrotóxico o nefritis de Heymann) (3,4), 2.-inyección de aminonucleósido de puromicina (ANP) (5,6), y más recientemente por la inyección de 3. adriamicina, (ADR doxorubicina) (7) y de 4.- daunomicina (7a). El SN experimental inducido por ANP ha recibido gran atención ya que se parece al SN con lesiones mínimas encontrado en humanos (2,5,6,). Otra ventaja adicional que ofrece el modelo experimental es que permite seguir la evolución de la enfermedad en condiciones controladas, lo cual se dificulta en los pacientes humanos. El mecanismo por medio del cual el ANP produce daño renal no se ha dilucidado totalmente. Midiendo la depuración de dextranos cargados y neutros de peso molecular (PM) conocido y comparándolos a la depuración de inulina (marcador de filtración glomerular) es posible estudiar la permeabilidad del capilar glomerular. Tales estudios han demostrado que tanto el tamaño como la carga molecular influyen en el paso transglomerular de las moléculas circulantes. Dicho en otras palabras, existe una barrera glomerular tanto de carga como de tamaño. De esta manera la filtración

de la albúmina cargada negativamente está restringida en mucho mayor proporción que las macromoléculas neutras del mismo tamaño. Esto se debe a la existencia de cargas negativas sobre la pared del capilar glomerular, tal como se ha demostrado por el uso de colorantes "catiónicos" tales como oro coloidal y el rojo de rutenio. Estudios en ratas con SN por suero nefrotóxico o por ANP han demostrado que, independiente del tamaño molecular, la depuración fraccional del sulfato de dextrán cargado negativamente es mayor que en ratas normales (8,9). Esto sugiere que la albuminuria en estos desórdenes se debe a una reducción de las cargas negativas fijas sobre la pared del capilar glomerular de las ratas enfermas. Ryan y Karnovsky (10) propusieron que la proteinuria masiva se debe a una lesión de las células epiteliales glomerulares que causa la pérdida de los podocitos y la aparición de defectos focales de la cubierta epitelial de la membrana basal glomerular. Otros autores han identificado defectos selectivos, tanto de carga como de tamaño, en la barrera glomerular después de la administración de ANP (11,12). Actualmente hay controversia en cuanto a si hay pérdida de sitios aniónicos de la membrana basal glomerular (13,14). Sin embargo, se ha demostrado que hay una reducción en la carga de la superficie de las células del epitelio glomerular en las ratas tratadas con ANP (13). Otros estudios han demostrado glicosilación defectuosa de la sialoproteína glomerular podocalixina (15) que puede explicar el defecto selectivo de carga. Por otra parte se ha encontrado en 5 pacientes con SN congénito que el número de sitios aniónicos estaba reducido significativamente (16). Este hallazgo apoya la idea de que las bases del daño renal en los humanos y en las ratas con SN por ANP son similares.

El mecanismo de daño renal en el SN no está dilucidado totalmente, sin embargo, se ha estudiado el papel de los radicales libres de oxígeno (17,18), de los tromboxanos glomerulares (19,20), del factor activador de plaquetas (21) y de las prostaglandinas (22,23), como posibles mediadores en este mecanismo. Diamond y cols. (17) estudiaron el papel de los radicales libres de oxígeno en el daño renal en el SN por ANP, pues se ha demostrado que estos radicales pueden inducir diferentes tipos de daño celular, principalmente peroxidación de lípidos y daño de membrana (24). Durante el metabolismo del ANP se genera hipoxantina, que al ser metabolizada por la xantina oxidasa genera el ion superóxido. Estos autores encontraron que el alopurinol (un inhibidor de la xantina oxidasa) y que la enzima superóxido dismutasa (la cual metaboliza los iones superóxido a peróxido de hidrógeno) protegen al riñón del daño renal (Fig. A). Beaman y cols (18) confirmaron este estudio y encontraron también que la administración de la catalasa (la cual metaboliza el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua) protege a las ratas del daño renal por ANP.

Por otra parte, se ha encontrado un aumento en la producción glomerular de tromboxanos (19, 20) y del factor activador de plaquetas (21) en ratas con SN inducido por adriamicina (19) o por suero nefrotóxico (20).

B) HEMOSTASIS

La hemostasis es un proceso por el cual el sangrado es contrarrestado y comprende una serie compleja de eventos fisiológicos y bioquímicos que culminan con la formación de un tapón estable que sella el vaso sanguíneo.

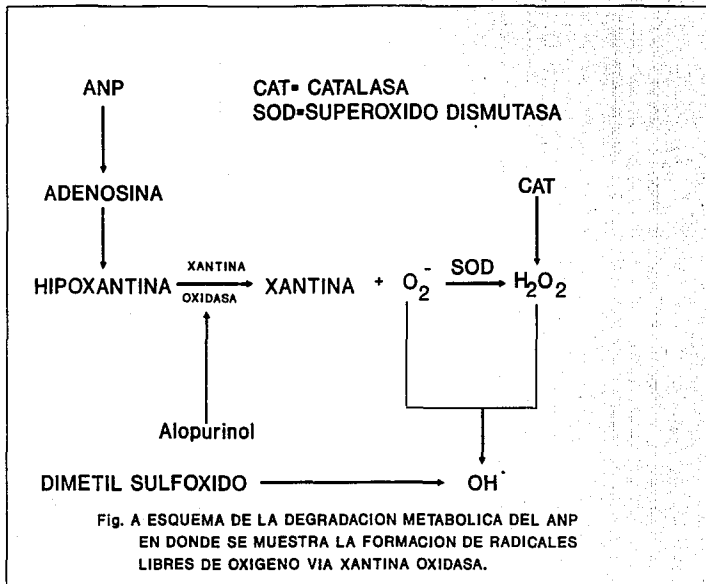


Fig. A ESQUEMA DE LA DEGRADACION METABOLICA DEL ANP EN DONDE SE MUESTRA LA FORMACION DE RADICALES LIBRES DE OXIGENO VIA XANTINA OXIDASA.

Estos procesos involucran la siguiente secuencia de eventos:

- Interacción entre la pared del vaso y las plaquetas.
- Coagulación de la sangre.
- Fibrinolisis.

C) MECANISMOS DE HEMOSTASIS

Cuando el vaso sanguíneo sufre una lesión ocurre un reflejo local reduciendo la luz y el flujo sanguíneo en el sitio, la contracción vascular es mantenida por la liberación de compuestos vasoactivos de las plaquetas adyacentes y de los tejidos de alrededor. Simultáneamente las plaquetas de la vecindad se adhieren a las fibras de colágena expuestas del subendotelio.

Una de las funciones básicas para mantener el endotelio vascular intacto, es proveer de una superficie de tromborresistencia del endotelio a la circulación. El endotelio intacto no promueve la adherencia de las plaquetas ni de los leucocitos ni la activación de la coagulación.

El endotelio, particularmente en la microcirculación pulmonar, remueve activamente sustancias de la circulación que promueven la agregación plaquetaria. Estas incluyen la prostaglandina F₁, la serotonina, los nucleótidos de adenina, la bradicinina y la angiotensina I.

El papel de las plaquetas en la hemostasis es de mucha importancia en el mecanismo de coagulación. Las plaquetas están involucradas con la pared del vaso y con la actividad y contacto de los factores de la coagulación XII y XI (25).

Las plaquetas promueven la hemostasis por algunas vías. Cuando el

vaso sanguíneo se lesiona, las plaquetas se acumulan en el sitio de la lesión una a otra y finalmente se involucran en la vía intrínseca de la coagulación. La exposición de las plaquetas a las fibras de colágena de la pared del vaso activan ciertos constituyentes como: serotonina, histaminas y ADP y los liberan en el ambiente del fluido induciendo la adherencia y la agregación plaquetaria en el área. El proceso de agregación requiere calcio, fibrinógeno y energía.

D) COAGULACION

La coagulación sanguínea es una serie compleja de reacciones que involucran varios factores de coagulación que son designados por el comité internacional de nomenclatura de los factores de coagulación con números romanos como se muestra a continuación:

FI	Fibrinógeno
FII	Protrombina
FV	Proacelerina
FVII	Proconvertina
FVIII	Globulina A antihemofílica
FIX	Globulina B antihemofílica
FX	Factor de Stewar-Prower
FXI	Antecedente de tromboplastina plasmática
FXII	Factor de Hageman

Ca Considerado antes como FIV

No hay factor VI

A la tromboplastina tisular se le conocía como FIII.

En la tabla 1 se muestran los pesos moleculares (PM) correspondientes de FC, AT III y alfa₂-APL así como el número de moléculas por unidad de volumen de estas proteínas.

TABLA 1. PESOS MOLECULARES Y CONCENTRACION DE LAS PROTEINAS ESTUDIADAS.

Proteína	Masa molecular (kDa)	Número de moléculas por unidad de vol.
Fibrinógeno	340	100 000
Protrombina	72	10 000
Factor X	56	1 000
Factor IX	56	1 000
Factor VII	50	100
Factor XI	160	100
Factor XII	80	1 000
Factor V	330	100
Factor VIII	330	1
Antitrombina III	65	10 000
Alfa ₂ -Antiplasmina	70	10 000

tomados de la referencia 26.

El proceso de coagulación llega a ser activado en la hemostasis después de la interacción inicial de las plaquetas con la pared del vaso sanguíneo.

El proceso de coagulación procede por una vía intrínseca o intravascular y por una vía extrínseca o tisular que convierten la protrombina en trombina. La trombina a su vez convierte el fibrinógeno en monómeros solubles de fibrina que junto con el factor XIII y Ca es convertido y polimerizado completamente en un coágulo insoluble de fibrina.

Este estado final de la coagulación es también el punto de la medición de las pruebas más comunes de coagulación (27).

E) BIOQUIMICA DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION

El sistema de coagulación consiste de proteínas, lipoproteínas y de iones calcio.

La bioquímica moderna y biología molecular han permitido la caracterización detallada de cada uno de los factores de la coagulación en su forma nativa y en su forma activa. Los plasmas humanos y de bovinos han sido los principales materiales usados para el estudio de la estructura de las proteínas de la coagulación.

FIBRINOGENO. El fibrinógeno humano es una glicoproteína con PM cercano a los 340 KDa y está compuesto por tres pares de cadenas polipeptídicas conectadas por puentes disulfuro; es una molécula compuesta de mitades simétricas. Estas cadenas se conocen como A alfa, B beta y gamma. Las cadenas designadas como A alfa producen todo tipo de fibrinopéptido A cuando es atacada por la trombina, la cadena B beta es la que produce fibrinopéptido B y la gamma es la cadena que no es atacada por la trombina. Los PM de las cadenas A alfa, B beta y gamma son de 63.5, 56 y 47 KDa respectivamente. Las correspondientes cadenas A alfa, B beta y gamma consisten de 610, 416 y 411 residuos de aminoácidos respectivamente.

PROTROMBINA (Factor II). La protrombina (PM 72 KDa) y los factores VII, IX y X son las cuatro proteínas de la coagulación que requieren vitamina K para su completa biosíntesis. La vitamina K se requiere para la modificación postraducciona principal, la carboxilación de ciertos residuos de ácido glutámico (Glu), para dar lugar al ácido gamma carboxiglutámico. En ausencia de la vitamina K, la reacción de carboxilación no ocurre, resultando proteínas sin actividad coagulante. La carboxilación requiere CO_2 y vitamina K.

TROMBINA. La trombina se forma a partir de la protrombina por la hidrólisis de la unión del péptido por el factor Xa y trombina. La trombina ha sido designada como alfa-trombina y consiste de dos cadenas de polipéptidos conectados por puentes disulfuro. Su PM

molecular es de 39 KDa con dos cadenas: la A de 6 KDa y la B de 33 KDa. El sitio activo y los carbohidratos están localizados en la cadena B. La trombina es una de las enzimas de la familia proteolítica conocida como proteasa de serina, por tener serina en su sitio activo. La trombina es inhibida competitivamente por el fibrinopéptido A liberado por el fibrinógeno por la acción de la trombina, y por péptidos de estructura similar.

FACTOR V. El factor V en el plasma es inestable y su caracterización es extremadamente difícil. Es una glicoproteína con un PM de 249 KDa El factor V tiene una extensa secuencia homóloga al factor VIII y a ceruloplasmina. El factor V circula como una sola cadena de proteína que se ha estimado tiene un 0.27% de actividad del derivado proteolítico, Factor Va. La molécula activada consiste de una cadena pesada de 110 y de una cadena ligera de 78 kDa, se cree que estos péptidos que están unidos por puentes de calcio. La activación inicial del factor V puede ocurrir por la generación del factor Xa, por la activación directa del factor X por el factor tisular y el factor VII/VIIa. Sin embargo, como la progresión de la coagulación es comúnmente por la trombina, que es considerablemente más activa que el factor Xa en esta reacción, llegando a ser el activador primario del factor V.

FACTOR VII. Se ha purificado de plasmas de humanos y de bovino. La proteína que circula en el plasma consiste de una cadena de 406 aminoácidos, el factor VII es atacado por el factor Xa en presencia de fosfolípidos y calcio para producir una molécula con dos cadenas con una mejor actividad coagulante. La actividad del factor VII también aumenta en plasma cuando ha sido expuesto a superficies de vidrio u

otras. En cada sistema el factor VII es activado por el factor XIIa y XIa y así como por la calicreína, tal vez indirectamente.

FACTOR VIII. El factor VIII humano es una proteína compleja que posee actividad procoagulante deficiente en la hemofilia clásica (Hemofilia A). El factor VIII esta constituido por una sola cadena de 2332 aminoácidos. El factor VIII circula con una mínima actividad coagulante. Pequeñas cantidades de trombina o factor Xa incrementan la actividad coagulante del factor VIII. Con óptimas concentraciones de estas enzimas la actividad del factor VIII puede aumentar hasta 63 veces.

FACTOR IX. Es una glicoproteína constituida por una sola cadena de PM de 57 KDa con 17% de carbohidratos y 10 residuos de ácido gamma-carboxiglutámico. El factor IX es activado por el factor XIa o por el complejo factor tisular-factor VIIa en una sola molécula con dos cadenas que están unidas por la cadena pesada la cual tiene un PM de 28 KDa y contiene el sitio enzimáticamente activo.

FACTOR X. Es una glicoproteína de doble cadena con un PM aproximado de 59 KDa. En una electroforesis en gel-SDS se obtuvo un PM de 49 KDa para la cadena pesada y de 7 KDa para la cadena ligera, las cuales están conectadas por puentes disulfuro. La cadena ligera contiene 14 residuos de ácido gamma carboxiglutámico. La activación fisiológica del factor X se lleva a cabo por la hidrólisis del enlace Arg⁵¹-Ile⁵² en la cadena pesada, en una reacción catalizada por el factor XIa y el complejo factor tisular-factor VIIa. El sitio activo se encuentra en la cadena pesada. El factor X tiene una secuencia considerable homóloga con otras proteasas de serina de otros mamíferos como con tripsina, trombina y factor IXa.

FACTOR XI.- El PM del factor XI es de 180 KDa determinado por

filtración en gel y de 160 KDa determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida, la molécula contiene dos subunidades idénticas unidas por puentes disulfuro de PM aproximado de 80 KDa. Se ha confirmado que cada cadena consiste de 607 aminoácidos. El sitio de hendidura requerido para la activación se ha localizado en el enlace formado por Arg³⁵⁹-Ile³⁷⁰. Esto resulta en una proteína tetramérica que consiste en dos cadenas ligeras, cada una conteniendo 238 residuos, y dos cadenas pesadas, cada una con 369 residuos. Las cadenas ligeras contienen el centro activo, el cual es típico de las proteasas de serina. El factor XI humano puede circular en el plasma como un complejo con el cininógeno de alto PM. La tripsina y el factor XIIa pueden activar al factor XI.

FACTOR XII.- El PM del factor XII de humanos es 80 KDa determinado por electroforesis en gel y de 100 a 120 KDa determinado por filtración en gel. El factor XII consiste de una sola cadena de 596 aminoácidos. Es convertido a su forma activa o a XIIa por una hendidura en una cadena en la unión Arg³⁵³-Val³⁵⁴. La molécula resultante contiene una cadena pesada de 353 aminoácidos que contienen los sitios activos para unir las superficies negativas, mientras que la cadena ligera con 243 aminoácidos contiene el centro activo típico de las proteasas de serina. El factor XII de humanos es activado durante la exposición al vidrio, tierra de diatomeas, y por sustancias tales como ácido eleáxico, homocisteína, colágeno, ácidos grasos. El factor XII también puede ser activado en solución por enzimas tales como: tripsina, calicreína, plasmina y factor XIa. La tripsina, plasmina y calicreína atacan al factor XII en dos sitios, produciendo fragmentos de un PM aparente de 52, 40, y 28 KDa (28).

La figura B muestra la estructura de los dominios de algunas de las proteínas involucradas en la coagulación sanguínea.

F) INHIBIDORES DE LA COAGULACION

El sistema activable de la coagulación conlleva a riesgos potenciales para el organismo (por ejemplo trombosis). La hiper o hipofunción altera el equilibrio, por una parte, debe ser capaz de mantener las propiedades de flujo de la sangre y, por otra parte, evitar el paso de la sangre a los tejidos sellando los capilares. Por lo tanto, el sistema de activación debe quedar a la amplitud y sitio de las necesidades. Esta tarea la realizan los inhibidores que bloquean la actividad enzimática. El inhibidor más importante es la antitrombina III. Se han descrito una serie de antitrombinas (antitrombina III, la alfa₂-macroglobulina y la alfa₁-antitripsina). En el plasma completo los dos mecanismos principales para la supresión de trombina parecen ser la adsorción inmediata y la inactivación de la mayor parte de la trombina por la fibrina, seguida de una inactivación progresiva de la trombina restante por acción de una antitrombina presente en la fracción globulínica alfa del plasma. Si se compara con otros dos inhibidores de la trombina que se producen de manera natural, a saber, la alfa₂-macroglobulina y la alfa₁-antitripsina, la antitrombina III parece constituir el principal inactivador de la trombina.

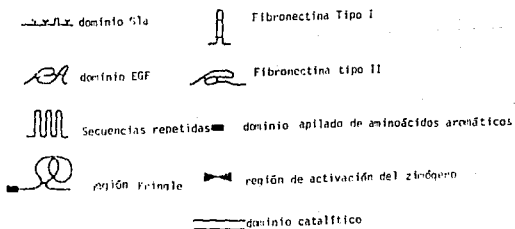
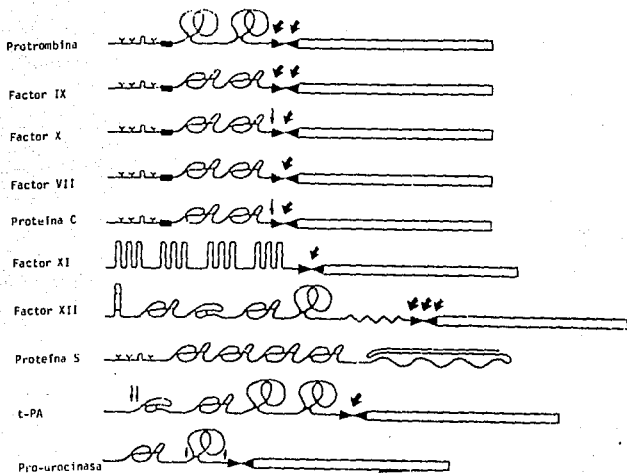


Figura C Estructuras de algunas de las proteínas que intervienen en los procesos de la coagulación

G) FIBRINOLISIS

Una vez que la fibrina ha cumplido su función debe ser catabolizada en un proceso conocido como fibrinólisis en el cual se produce la conversión de la proteína plasminógeno en la enzima plasmina, la que a su vez degrada a la fibrina en productos cada vez más pequeños y por lo tanto solubles (27). El plasminógeno humano es una globulina contenida en la fracción plasmática III. Se trata de una glicoproteína de PM 89 KDa. El plasminógeno es convertido a plasmina en presencia de algunos "activadores". Se han descubierto activadores en el plasma y en diversos tejidos, en particular útero, tiroides, pulmón, próstata, así como en la orina.

El plasma contiene sustancias que no se han caracterizado bien y que parecen inhibir la acción de la plasmina. Se ha demostrado la presencia de dos inhibidores de plasmina en el plasma. Una sustancia fué purificada recientemente y se comprobó que era una globulina alfa₁ de PM 55 KDa. Este inhibidor tenía actividad de antiplasmina doble, lenta e inmediata. La otra reacciona inmediatamente, es más estable en valores extremos de pH, y resiste las temperaturas elevadas. Resulta ser una macroglobulina alfa₂ con capacidad de fijar enzimas de hidrolasa para serina como la tripsina, la trombina y la plasmina, en grado variable. La participación de las proteínas plasmáticas en el mecanismo fibrinolítico sugiere que actúan como reguladoras e inhibidoras de una fibrinólisis excesiva. Las plaquetas también contienen antiplasmina.

II ANTECEDENTES

A) ANORMALIDADES EN LA COAGULACION EN EL SINDROME NEFROTICO

La nefrosis humana y experimental se caracteriza por cambios profundos tanto en los niveles plasmáticos como en el metabolismo de muchas proteínas circulantes. A pesar de la marcada hipoproteïnemia característica de la nefrosis experimental, los niveles individuales de algunas proteínas plasmáticas pueden ser altos (29-33), bajos (29,33-37) o normales (33-35) y entre estas se encuentran las involucradas en los procesos de coagulación y fibrinólisis las cuales muestran alteración en su síntesis y pérdida urinaria.

En la tabla 2 se muestran las alteraciones en los niveles plasmáticos de las proteínas involucradas en el proceso de coagulación en la nefrosis humana.

TABLA 2. ALTERACIONES EN ALGUNAS PROTEINAS DE LA COAGULACION EN LA NEFROSIS HUMANA.

	Referencias que citan las concentraciones.		
	Elevada	Normal	Disminuido
Factor VIII	38-42	53,54	-
Fibrinógeno (I)	38-40,42-46	-	-
Factor II	47,48	38,39	59
Factor V	38-41	-	50
Factor VII	38,41,49,50	-	60
Factor XI	-	54,55,56	61
Factor XII	-	54	47,55,56,61-64
Factor X	41,50	47	-
Factor IX	41,39	42,55	47,54,65,65-67
Antitrombina III	-	48,53,57,58	68-72
Alfa ₂ -antiplasmina	51,52	43	40,45,73-75

En la figura C se muestran a los zimógenos y cofactores de la cascada de la coagulación. La forma activada de cada enzima está indicada por el sufijo "a" y los zimógenos y cofactores por sus números romanos convencionales. Las flechas indican por su dirección y magnitud las alteraciones más comúnmente observadas en el SN en los humanos. Así, los tres factores de la vía intrínseca: XII, XI y IX, están comúnmente disminuidos, mientras que el factor X y sus cofactores VIII y V están usualmente elevados. La protrombina no se encuentra comúnmente alterada, pero el fibrinógeno circulante se encuentra muy aumentado.

En la figura D se muestran las alteraciones de las proteínas que forman parte del sistema fibrinolítico en donde se puede apreciar la disminución en la concentración plasmática del inhibidor de la coagulación más importante que es la antitrombina III (AT III), y a su vez una disminución en la concentración plasmática del componente más importante del sistema fibrinolítico, la alfa₂-antiplasmina (alfa₂-APL). También se aprecian disminución de plasminógeno en plasma así como un aumento en la concentración del activador del plasminógeno (52). Estos cambios son los más comúnmente observados en pacientes con SN.

Kauffman y cols (68) y otros autores (52,57,70,72,76,77) han encontrado bajas concentraciones plasmáticas de antitrombina III aparentemente resultado de la pérdida urinaria de esta proteína de bajo PM.

Por otra parte, en el SN experimental inducido en ratas con ANP se presentan alteraciones en las proteínas séricas y urinarias las cuales

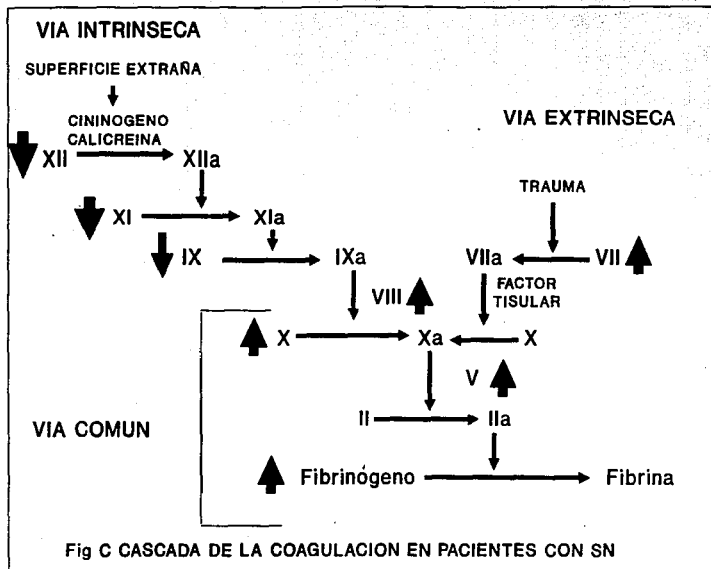
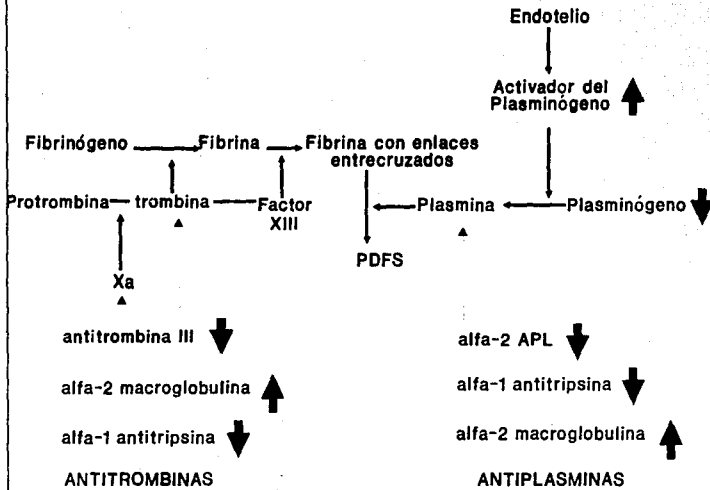


Fig D INHIBIDORES DE LA COAGULACION Y SISTEMA FIBRINOLITICO EN EL SN



se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. ALTERACIONES EN LAS PROTEINAS EN SUERO Y ORINA
EN LA NEFROSIS EXPERIMENTAL

Proteína	Sangre ^a	Orina ^a	Referencia
Albumina	-	+	29,30,32,34
Transferrina	-	+	36,78
Glicoproteína ácida alfa ₁	-	+	36
Ceruloplasmina	-	+	79
Angiotensinógeno	-	+	30,31,82,83
Antitrombina III	-	+	34
Proteína que une vitamina D	-	+	80,81
IgG	-	?	33
IgM	+	?	33
Alfa ₂ -Macroglobulina	+	?	84
Renina	+	+	30,31,82,83,85
ECA	+	+	30,85,86
Protrombina	+	+	34
Fibrinógeno	+	0	34,87
IgA	=	?	33

^a-: disminuye la concentración; +: aumenta la concentración
=: no hay cambio en la concentración; 0: no hay excreción
urinaria; ?: desconocido.
ECA: enzima convertidora de angiotensina I.

Sin embargo, no se han realizado estudios sistemáticos concernientes al metabolismo de las proteínas de la coagulación en el SN experimental en ratas. Solo se han realizado un par de estudios (34,87) en el síndrome nefrótico experimental que no abarcan la totalidad de las proteínas que conforman el sistema de la coagulación. Lo que se informa acerca de la hematología de la rata son los siguientes parámetros:

El tiempo de protrombina (TP) se encuentra entre 8-14 seg (88).
El tiempo parcial de tromboplastina activada es de 21.1 ± 3.7 seg.

(89). La concentración de fibrinógeno encontrada en esta especie es de 158-214 mg/dl determinada por el método de Ratnof y Mezie (90).

El tiempo de coagulación de la vía extrínseca se encuentra igual o aumentado comparada con el de humano, mientras que la vía intrínseca se encuentra aumentada.

Las actividades de los factores de la coagulación de la rata con respecto a la del humano se muestran en la tabla 4 (25).

TABLA 4. COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION ENTRE LA RATA Y EL HUMANO.

FACTOR	ACTIVIDAD CON RESPECTO AL HOMBRE NORMAL
I	Igual
II	Igual o aumentada
V	Aumentada
VII	Igual
VIII	Aumentada
IX	Igual o disminuido
X	Disminuido
XI	Igual o disminuido
XII	Aumentado

III OBJETIVO

ESTUDIAR LA ACTIVIDAD DE:

- LOS FACTORES DE LA COAGULACION: I, II, VII, IX, X, XI Y XII.
 - LOS COFACTORES DE LA COAGULACION V Y VIII
 - LA ANTITROMBINA III (AT-III)
 - LA ALFA₂ ANTIPLASMINA (ALFA₂-APL).
- EN PLASMA Y ORINA DE RATAS INYECTADAS CON ANP EN LAS ETAPAS PRE-NEFROTICA (DIA 2) Y NEFROTICA (DIA 10)

IV MATERIAL Y METODOS

A) REACTIVOS. La albúmina sérica bovina fracción V 96-99%; el aminonucleósido de puromicina ANP; el reactivo de Folin Ciocalteu; el reactivo para albúmina BCG (verde de bromocresol) se compraron de Sigma Diagnostics. El carbonato de sodio; el hidróxido de sodio; el éter etílico; el cloruro de sodio; el sulfato de cobre; el citrato de sodio dihidratado; y el cloruro de calcio se compraron de J. T. Baker. Los reactivos para la determinación de creatinina; y los reactivos para la determinación de BUN (Nitrógeno uréico sanguíneo) se compraron de Beckman. El reactivo Monotest Colesterol CHOD-PAP se compró de Farmacéuticos Lakeside.

Los siguientes reactivos requeridos para los estudios de coagulación se compraron de Química Hoechst: plasmas deficientes en los factores de la coagulación II (código OSGR), V (código ORSM), VII (código OTXV), VIII (código OTXW), IX (código OTXX), X (código OTXY), XI (código OSDF), XII (código OSDG); reactivo para la determinación cuantitativa de fibrinógeno Multifibren (código OTXG); tromboplastina cálcica humana para la determinación del tiempo de Protrombina y el dosaje de los factores de la coagulación II, V, VII y X (Tromborel S, código OUHP); plasma N de control humano (ORKE); reactivos para la determinación de antitrombina III (Berichrom-Antitrombina III código OUBP); reactivo para la determinación de alfa₂-antiplasmina (Berichrom alfa₂-antiplasmina código OUBU); reactivo para la determinación del tiempo parcial de tromboplastina activada (Neothromtin código OSFF); amortiguador de acetato dietilbarbiturato pH 7.6 (código ORHW); amortiguador de barbital para multifibren (código OTXM); Suspensión de Caolín (código 2570).

B) EQUIPO. El Fibrintimer (código OVFY), Chromotimer (código OVHI) (Behringwerke, Marburg, Alemania); Agitador magnético PC-353; Balanza analítica Mettler Instrument Corp Hights town N.J tipo H15.; Espectrofotómetro Carl Zeiss PM QII; Centrifuga refrigerada ICE PR-7000; BUN analyzer 2 de Beckman; Creatinine analyzer 2 de Beckman; Vortex de Scientific Industries; Baño de agua a 37°C de Precision GSA Corporation; Congelador Revco -70°C, Micropipetas Gilson (Rainin Instruments Co) P 5000 (5 ml), P 1000 (1 ml), P 200 (0.2 ml), P 20 (0.02 ml). Jeringas desechables de 3 ml con agujas número 21. Celdillas de cuarzo 100 QS de 1 cm de paso de luz (588503). Jaulas metabólicas de fabricación nacional para recolectar la orina de las ratas (las jaulas constan de una malla metálica que permite el paso de la orina y retiene las heces y de un cono colector para que fluya la orina a un recipiente. El comedero y el bebedero están fuera del cuerpo de la jaula para que el agua y la comida no contaminen la orina).

C) MATERIAL BIOLÓGICO. En este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 350-450 g para el grupo control y para la inducción del SN, así como para la obtención de plasma para las curvas de calibración.

D) DISEÑO EXPERIMENTAL. El SN se indujo en 20 ratas macho de la cepa Wistar (350-450 g peso) por una inyección única subcutánea de ANP al 2% en una dosis de 15 mg/100 g. Las ratas control (n=10) se inyectaron solo con el vehículo. Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 hrs con citrato de sodio en los días 2 y 10 para cada grupo respectivamente. La sangre se obtuvo por punción cardíaca bajo anestesia de éter usando citrato de sodio

0.11 mol/L (1 parte de citrato de sodio y 9 partes de sangre) como anticoagulante tanto para las ratas del grupo control como para las ratas inyectadas con ANP de los días 2 y 10. La sangre se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min para separar el el plasma.

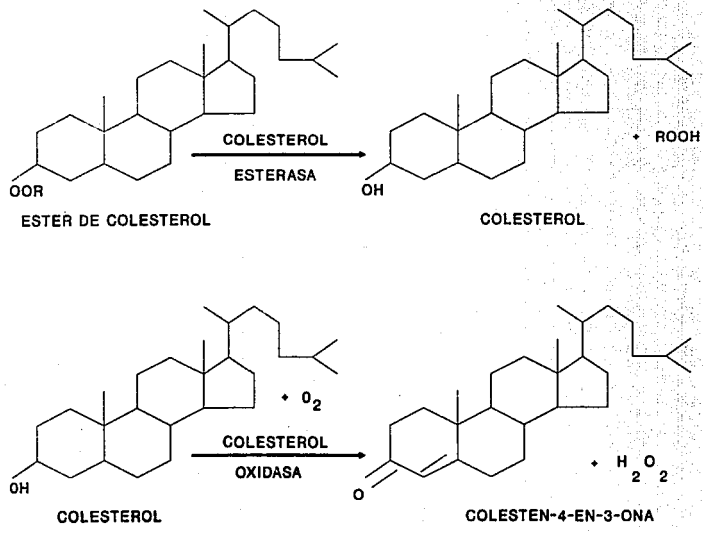
E) DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES. Se empleó el metodo de Lowry y cols. (91). Se usó como patrón albúmina sérica bovina (5 a 50 ug/0.2 ml). La primera etapa de esta reacción involucra la formación de un complejo proteína-cobre en solución alcalina, en la segunda etapa de la reacción, el complejo formado reduce a un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Fenol folín y Ciocalteu) para producir un intenso color azul. Las soluciones empleadas fueron: SOLUCION A: carbonato de sodio 2%; hidróxido de sodio 0.4% y tartrato de sodio 0.02%; SOLUCION B: sulfato de cobre al 0.5%; SOLUCION C: 50 ml de la SOL. A más 1 ml de la SOL. B. La SOLUCION C se prepara y se usa al momento de la determinación; SOLUCION D: reactivo de folín 1 N, solución diluída a partir de una concentración 2 N. SOLUCION E: solución patrón de albúmina sérica de bovino 50 mg/100 ml, la cual se utilizó para la realización de la curva patrón. El procedimiento fué el siguiente: se tomaron 0.2 ml de una dilución 1:400 del plasma. Esta dilución puede modificarse de acuerdo a la concentración de proteínas en la muestra. Se adicionó 1 ml de la SOL. C, después de 10 min de incubación a temperatura ambiente se adicionaron 0.1 ml de la SOL. D se agitó y se dejó reposar durante 30 min al cabo de los cuales se leyó la densidad óptica a 660 nm contra el blanco reactivo (el cual está constituido de las soluciones anteriores excepto el plasma). Los resultados se expresan en g/100 ml. PROTEINAS URINARIAS.- Antes de cuantificar las proteínas urinarias, estas se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético al 10% de

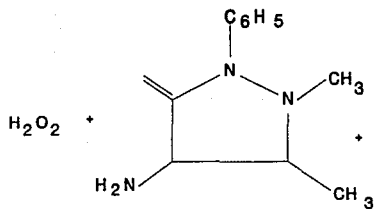
la siguiente manera: se mezclaron 200 μ l de orina y 1 ml de ácido tricloroacético, se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min, el sobrenadante se decantó y esta operación se repitió 3 veces hasta que el resuspensión quedara transparente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 600 μ l de NaOH 0.5 M y de esta manera la orina quedó en una dilución 1:5; en caso de las ratas nefróticas del día 10 se hizo una dilución adicional 1:20 con agua destilada y desionizada y se colocaron 0.2 ml de esta dilución en el ensayo anteriormente descrito.

F) DETERMINACION DE COLESTEROL. El colesterol en plasma se determinó por una prueba enzimática colorimétrica en la que los esteroides de colesterol presentes en la muestra son hidrolizados por un grupo de enzimas que dan como resultado final un producto secundario, el cual, al reaccionar con la 4-aminofenazona da un producto colorido al que puede medírsele la densidad óptica a 500 nm. La concentración de colesterol en la prueba se calcula multiplicando la D.O x 575. El fundamento de la prueba se muestra en la figura E.

G) CREATININA. La creatinina se midió por el método del picrato alcalino en un analizador 2 de creatinina Beckman. Se inyectaron 0.025 ml de plasma al aparato y se mezclaron con el reactivo alcalino en una celdilla de reacción. Se midió la velocidad del aumento de absorbencia debido a la formación del complejo alcalino de picrato de creatinina. La velocidad de formación del complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. El analizador utiliza un sistema de detección óptica empleando una fuente luminosa, un filtro de 520 nm, un fotodetector y un circuito electrónico que mide el cambio en la absorción de la solución de picrato alcalino después de la adición de la muestra. Cuando se inyecta una muestra en el reactivo

FIG.E Determinación del colesterol





PEROXIDO DE
HIDROGENO

4-AMINOFENAZONA



FENOL

4-(p-Benzoquinona-monoimino)-
fenazona + $4H_2O_2$

Determinación de colesterol

picrato alcalino, la creatinina de la muestra se combina con el ácido pícrico en presencia de iones OH en el reactivo, y produce un complejo de color rojo el cual se muestra en la figura F. Los resultados se expresan en mg/dl. Para calcular la depuración de creatinina se utilizó la siguiente fórmula en donde las unidades se expresan como ml/min.

$$D = \frac{\text{Creatinina urinaria mg/dl} \times \text{Flujo urinario ml/min.}}{\text{Creatinina en suero mg/dl.}}$$

H) UREA. La urea se cuantificó en un analizador BUN Beckman. Este analizador utiliza un método enzimático que mide la velocidad de la conductividad en la reacción. Se inyecta un volumen de 0.010 ml y se mezcla con el reactivo en la celdilla de reacción. El electrodo de conductividad mide la velocidad de aumento de conductividad en la reacción. La velocidad medida es proporcional a la cantidad de nitrógeno ureico presente en la muestra (fig. G). Los resultados se expresan en mg/dl.

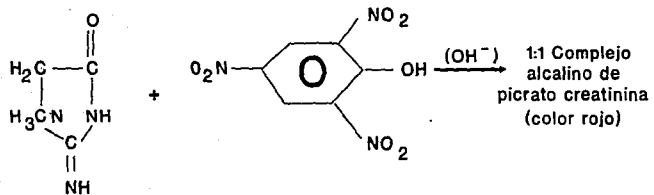


FIG. F Fundamento de la reacción de creatinina

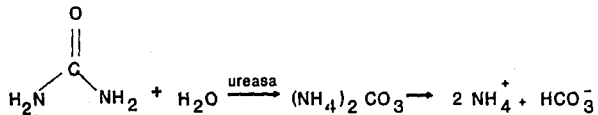


FIG G Fundamento de la reacción de urea

I) DETERMINACION DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION

I.1. TIEMPO DE TROMBOPLASTINA (TP). El proceso de coagulación se desencadena mediante la incubación del plasma con cantidades óptimas de tromboplastina y calcio, y se mide el tiempo transcurrido hasta la formación de un coágulo de fibrina. El TP es una prueba rápida para detectar trastornos exógenos de la coagulación para los factores II, V, VII Y X y caracterizar estados deficitarios congénitos o adquiridos de la vía exógena de la coagulación y también para el control de la actividad hepática de síntesis en las enfermedades del hígado.

Trazado de la curva de referencia: A partir de un pool de plasmas citratados de un grupo de ratas control, se efectúan una serie de diluciones con solución salina isotónica de cloruro de sodio:

Porcentaje del normal	100%	50%	25%	12.5%	10%
Dilución del plasma	sin diluir	1+1	1+3	1+7	1+9

las diluciones se efectuaron inmediatamente antes de la determinación.

Los tiempos de coagulación hallados se graficaron contra los valores porcentuales normales sobre papel doble logarítmico.

I.2. TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA (TPTa). La incubación del plasma con la cantidad óptima de fosfolípidos y un activador, conduce a la activación de factores del sistema endógeno de coagulación. El agregado de los iones de calcio desencadena el proceso de la coagulación; se mide entonces el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo de fibrina. La determinación de TPTa posibilita la investigación rápida de los trastornos de los factores de la vía intrínseca, así como sus cofactores.

Realización: Pipetear en una cubeta precalentada a 37°C

Plasma citrado 100 ul

Neothromtin 100 ul

Incubar 2 min. a 37°C

Sol.de cloruro de calcio 100 ul

Medir el tiempo de coagulación.

I.3. FIBRINOGENO. Modificación de método según Clauss.

Principio: El plasma citrado es coagulado por la adición de una cantidad relativamente grande de trombina. El tiempo de coagulación depende aquí principalmente de la concentración del fibrinógeno en la muestra de sangre; la presencia eventual de inhibidores de la coagulación no influye sobre los resultados de la determinación.

Se realizó una curva de referencia de fibrinógeno a partir de una solución estándar de fibrinógeno cuya dilución 1:10 con una solución amortiguadora de barbitol (código OTXG) corresponde a 570 mg/dl. Las diluciones adicionales de 1:20 y 1:40 corresponden a 285 y a 142 mg/dl respectivamente. Los tiempos encontrados para cada concentración se grafican en papel doble logarítmico.

I.4. FACTORES DE LA COAGULACION. El estudio se realizó para los grupos control, D2 y D10. Primeramente se realizaron las curvas de referencia para obtener la actividad de cada uno de los factores de la coagulación presentes en los plasmas de un grupo de ratas control (n=10) (FC II,V,VII,VIII,IX,X,XI,XII) a partir de un pool de plasmas citrados de las ratas control.

Para la determinación de cada una de las curvas de referencia se utilizaron como reactivo plasmas humanos deficientes en los factores de coagulación (plasma deficiente en factor II, plasma deficiente en factor V, plasma deficiente en factor VII, etc.) comprados a Behringwerke, así como un amortiguador de dietilbarbiturato-acetato $\text{pH}=7.6$ para la preparación de las diluciones de los plasmas requeridas en este método.

Para la determinación de la actividad de los factores II, V, VII y X (vía extrínseca) las diluciones empleadas para los plasmas fueron las siguientes: 1:20 (100% de actividad), 1:40 (50%), 1:80 (25%), 1:200 (10%), 1:400 (5%), 1:1000 (2%), 1:2000 (1%).

Se incubaron en una celdilla de reacción del Fibrintimer, que contiene un agitador magnético, 0.1 ml del plasma deficiente en el factor correspondiente junto con 0.1 ml de la dilución correspondiente del pool de plasmas controles, se mezclaron y se dejaron incubar por un período de 60 seg. a 37°C . Al concluir este período se adicionan 0.2 ml de tromboplastina cálcica de origen humano (Thromborel S Behring). Al adicionar este último reactivo se acciona automáticamente el cronómetro del aparato determinando el tiempo transcurrido desde la adición del Thromborel hasta la formación del coágulo de fibrina. Estas determinaciones se realizan para cada una de las diluciones de cada uno de los factores de esta vía de la coagulación.

Los tiempos de coagulación encontrados (ordenadas) se grafican en papel doble logarítmico contra los factores de actividad dados en porcentajes (abscisas) y así obtener las curvas de referencia para cada uno de los factores.

Para la determinación de la actividad de los factores de la

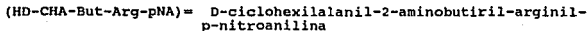
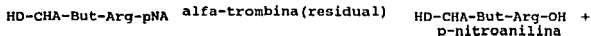
coagulación de la vía intrínseca (VIII, IX, XI, XII) se realizaron las siguientes diluciones del pool de plasmas controles con el amortiguador de dietilbarbiturato-acetato pH=7.6, 1:5 (100% de actividad), 1:10 (50%), 1:50 (10%), 1:100 (5%), 1:250 (2%), 1:500 (1%) y el procedimiento que se siguió para la determinación fue el siguiente: se pipeteó en una celdilla de reacción del Fibrintimer precalentada a 37°C, 0.1 ml del plasma deficiente en el factor a determinar, 0.1 ml de la dilución correspondiente del pool de plasmas controles y 0.1 ml de Neothromtin Behring (fosfolípidos y un activador) y se incubó por un período de 2 minutos a la misma temperatura. Transcurrido este tiempo se pipetó 0.1 ml de una solución de cloruro de calcio 0.025 mol/l a 37°C, al adicionar este último reactivo se puso en marcha automáticamente el cronómetro del Fibrintimer para determinar el tiempo de formación del coágulo. Al igual que los factores anteriores, los tiempos de coagulación hallados (ordenados), se grafican en papel doble logarítmico contra los factores de actividad dados en porcentajes (abscisas) para así obtener las curvas de referencia para los valores ensayados. Los tiempos normales de coagulación para cada factor serán los que correspondan al 100% de actividad para cada factor. En cuanto a la determinación de la actividad plasmática de los factores de coagulación para los grupos D2 y D10, se utilizará la misma metodología que en la realización de las curvas de referencia, comenzando siempre por la dilución de los plasmas (esta vez de manera individual para cada grupo) que corresponda al 100% de la actividad para cada factor, con la opción de realizar diluciones adicionales ya sean mayores o menores según su comportamiento ante la curva y

determinar de esta manera su % de actividad.

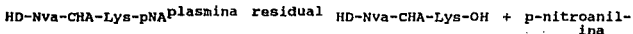
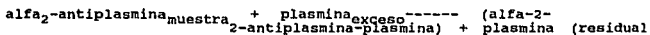
EN ORINA. Para la determinación de la actividad de los factores de la coagulación en la orina de los grupos control, D2 y D10 se realizaron diluciones 1:5 con una solución amortiguadora de dietilbarbiturato-acetato pH=7.6, teniendo también la opción de realizar diluciones adicionales según el comportamiento de las muestras frente a la curva de referencia de cada factor.

J) DETERMINACION DE AT III Y ALFA₂-APL.- La AT III y la alfa₂-APL se midieron por métodos cromogénicos en el Chromotimer. El valor del 100% se obtuvo con un pool de plasmas de 10 ratas normales. El porcentaje de actividad se calculó directamente en el Chromotimer.

La AT III de la muestra, en presencia de heparina, se convierte en un inhibidor inmediato e inactiva al excedente agregado de alfa-trombina. La tasa residual de trombina se determina en una prueba cinética por la degradación de un sustrato cromogénico a 405 nm según el siguiente esquema de la reacción:



La alfa₂-antiplasmina de la muestra inactiva la plasmina presente en el reactivo. La tasa residual de plasmina se determina por una prueba cinética con aumento de la extinción a 405 nm según el siguiente esquema de reacción:



(HD-Nva-CHA-Lys-pNA) = D-Norvalyl-ciclooxylalanyl-lysyl-p-nitroanilina.

K) ANALISIS ESTADISTICO. Los datos están expresados como media ± DS de 8-10 animales. Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico True EPISTAT 4.0 (Epistat Services, Richardson, Texas, USA). El análisis de los datos con la distribución normal se hizo por análisis de varianza de una sola vía seguida por el método de Bonferroni de comparaciones múltiples; y por análisis de varianza de Kruskal Wallis seguido de comparaciones múltiples por el método de Dunn en datos con distribución no normal. Los valores de p menores o iguales a 0.05 se consideraron significativos.

V RESULTADOS

En la tabla 5 se muestran los tiempos de coagulación obtenidos en diluciones crecientes de un pool de plasmas y que se usaron para trazar las curvas de referencia para la determinación de la actividad de los factores de la coagulación. El porcentaje de actividad de los plasmas y orinas fué calculado en estas curvas de referencia de acuerdo con las intrucciones de los fabricantes. El pool de plasmas se diluyó en forma seriada con una solución amortiguadora pH 7.6 (para detalles ver Material y Métodos).

TABLA 5. CURVAS DE REFERENCIA PARA LA DETERMINACION DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION OBTENIDOS POR DILUCIONES SERIADAS DE UN POOL DE PLASMAS DE RATAS CONTROLES.

FC	PORCIENTO DE ACTIVIDAD						
	100%	50%	25%	10%	5%	2%	1%
II	29.2	38.6	54.3	74.8	227.8	-	-
V	22.1	27.2	33.3	44.5	56.8	70.5	80.0
VII	22.1	25.4	30.5	38.9	48.6	53.7	58.6
X	53.8	81.8	110.4	153.7	204.8	231.6	261.1
VIII	41.4	46.0	-	65.4	80.0	87.3	97.1
IX	48.1	60.2	-	100.6	121.4	141.7	158.3
XI	53.6	72.5	-	102.2	123.1	128.8	133.7
XII	46.9	60.3	-	121.8	153.2	180.5	188.4

Los resultados están expresados en segundos. La actividad obtenida por la dilución 1:20 de los FC II, V, VII y X fue considerada como 100% de actividad. La actividad obtenida por la dilución 1:5 de los FC VIII, IX, XI y XII fué considerada como 100% de actividad. Para detalles ver material y métodos.

Las ratas inyectadas con ANP desarrollaron en el día 10 las características del SN: proteinuria, hipoproteinemia, hipercolesterolemia y poliuria (tabla 6). Sin embargo, el grupo del día 2 no mostró alteraciones en los parámetros antes mencionados (tabla 6), por lo tanto, este día fué considerado como el estado pre-nefrótico. El peso corporal no cambió en todos los grupos de ratas estudiados.

TABLA 6. DATOS BIOQUIMICOS EN RATAS CONTROL, PRE-NEFROTICAS (DIA 2) Y NEFROTICAS (DIA 10).

	CONTROL	INYECTADAS-ANP	
		DIA 2	DIA 10
Peso corporal, g	407±18	398±35	377±40
Proteínas plasmáticas g/dl	6.12±0.37	6.66±0.43	4.23±0.29 ^a
Albumina plasmática, g/dl	2.17±0.23	1.94±0.28	0.62±0.09 ^b
Colesterol en plasma, mg/dl	49±13	43±11	265±28 ^c
Proteínas urinarias, mg/24 h	26±3	30±16	602±103 ^c
Volumen urinario, ml/24 h	17.4±6	16.5±7	26.2±5 ^b
Creatinina en plasma mg/dl	0.3±0.04	0.37±0.04	1.48±0.36 ^d
Urea en plasma mg/dl	14.1±2.7	25.22±5.09	68.75±10.97 ^e
Depuración de creatinina ml/min.	2.16±0.66	1.64±0.28	0.26±0.08 ^f

Los datos están como media ± DS de 8-10 animales. ^ap<0.0000002 ^bp<0.02, ^cp<0.0004, ^dp<0.03, ^ep<0.00002, ^fp<0.00008

En la tabla 7 se presentan los resultados de TP, TPTa, factores de la coagulación, AT III y alfa₂-APL en plasma y orina de ratas controles y de ratas inyectadas con ANP de los días 2 y 10. El TP y el TPTa y las actividades de los FC, AT III y alfa₂-APL no se detectaron en orina del grupo control y del grupo del día 2 inyectadas con ANP. En el día 10 el TP y el TPTa disminuyeron en plasma y están ausentes en orina. En el día 10 los FC I y V aumentaron en plasma y no aparecieron en orina. En el día 2, el CF VIII disminuyó significativamente, así como una ligera disminución plasmática de AT III, los FC VII, X y XI se elevaron en plasma y en la orina del día 10. El factor VIII aumentó en plasma y orina del día 10.

La actividad de los FC IX y XII no cambió en plasma pero apareció en altas concentraciones en orina del día 10. La AT III disminuyó intensamente en el plasma y aumentó en la orina del día 10, finalmente la alfa₂-APL permaneció normal en plasma y no apareció en orina del día 10.

TABLE 7. TP, TPTa, FC, AT III, Y ALFA₂-APL EN PLASMA Y ORINA DE RATAS CONTROL E INYECTADAS CON ANP.

		CONTROL	PAN-INJECTED	
			DAY 2	DAY 10
TP (sec.)	PLASMA ORINA	12.8±1.2 ND	13.9±1.3 ND	10.0±0.07 ^a ND
TPTa (sec.)	PLASMA ORINA	22.8±2.1 ND	21.7±1.6 ND	16.3±2.7 ^a ND
FACTOR I (mg/dl)	PLASMA ORINA	99±7 ND	92±12 ND	183±30 ^b ND
FACTOR II (%)	PLASMA ORINA	95±5 ND	113±19 ND	132±24 ^d 8±6
FACTOR V (%)	PLASMA ORINA	94±7 ND	87±32 ND	453±46 ^e ND
FACTOR VII (%)	PLASMA ORINA	99±3 ND	119±36 ND	366±28 ^f 148±75
FACTOR VIII (%)	PLASMA ORINA	100±1 ND	42±16 ^c ND	378±83 ^c 7±3
FACTOR IX (%)	PLASMA ORINA	93±6 ND	72±11 ND	119±24 30±14
FACTOR X (%)	PLASMA ORINA	96±4 ND	101±20 ND	242±25 ^d 63±17
FACTOR XI (%)	PLASMA URINE	88±8 ND	80±9 ND	210±17 ^g 69±21
FACTOR XII (%)	PLASMA ORINA	92±6 ND	83±4 ND	94±6 56±30
ATIII (%)	PLASMA ORINA	102±6 ND	86±8 ^e ND	111±17 ^g 88±36
ALPHA ₂ -APL (%)	PLASMA ORINA	95±3 ND	98±10 ND	97±4 ND

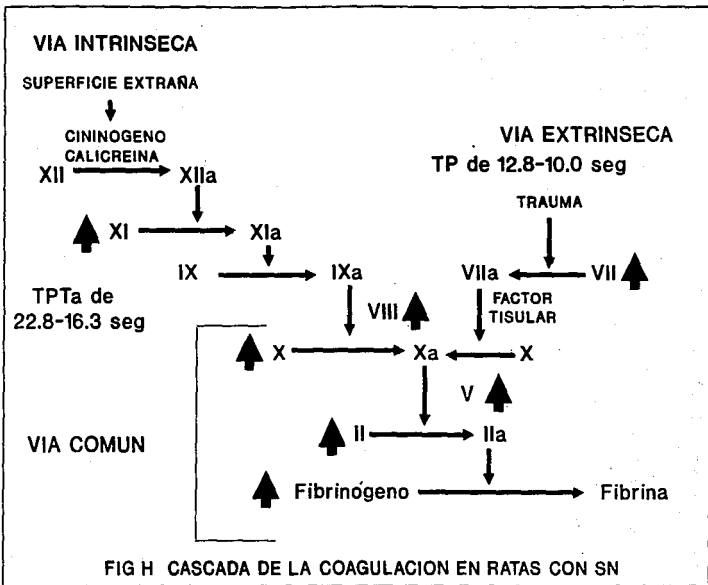
Los datos están expresados como media ± DS de 8-10 animales. ND= No detectable, TP= tiempo de protombina, TPTa= tiempo de tromboplastina activada, AT III= antitrombina III, ALFA₂-APL= Alfa₂-antiplasmina
^ap<0.00003, ^bp<0.003, ^cp<0.04, ^dp<0.0009, ^ep<0.02, ^fp<0.002, ^gp<0.0000001

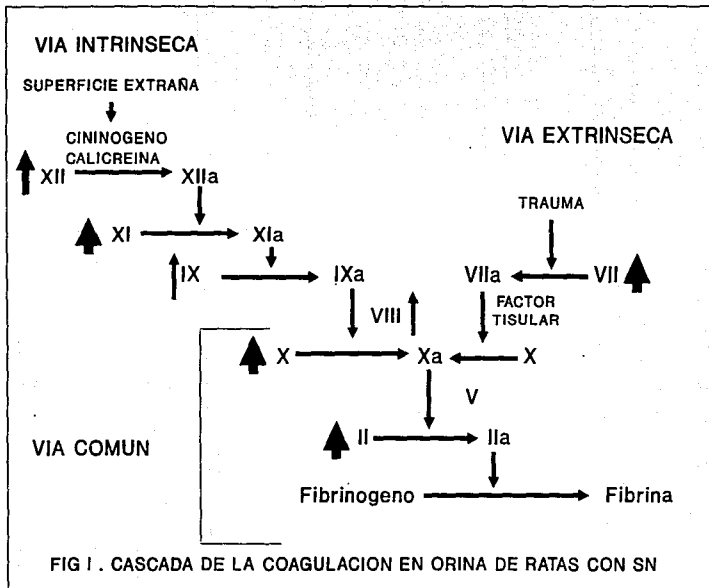
En la figura H se muestra a manera de resumen las alteraciones de las actividades de los FC observadas en los plasmas ratas de la etapa nefrótica (día 10) ilustradas en la cascada de la coagulación. Las flechas indican por su magnitud y dirección el comportamiento de estas proteínas en este modelo experimental.

En la figura I se muestran las proteínas de la coagulación detectadas en la orina de las ratas nefróticas. Se ilustran a manera de cascada de coagulación para visualizarlo mejor ya que no hay cascada de coagulación en orina.

En la figura J se muestra una comparación entre las alteraciones de la cascada de coagulación de ratas con SN y la más comunmente encontrada en humanos con SN y del comportamiento encontrado para cada una de sus FC en cada especie.

En la tabla 8 se muestra un resumen de las alteraciones en plasma y orina encontrados en el día 10 de todas las proteínas estudiadas así como sus respectivos pesos moleculares.





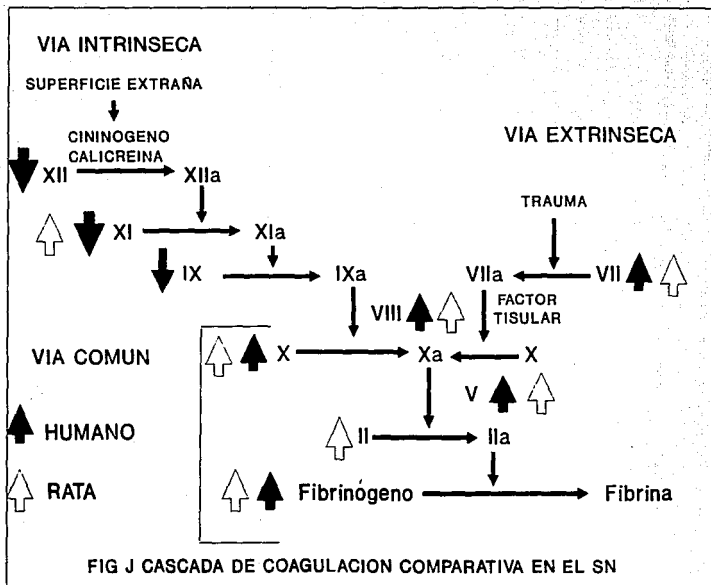


Tabla 8

RESUMEN DE RESULTADOS

PROTEINA	PM (KDa)	% ORINA	% PLASMA
FACTOR I	340	ND	↑ 185
COFACTOR V	330	ND	↑ 453
COFACTOR VIII	330	↑ 7	↑ 378
FACTOR XI	169	↑ 69	↑ 210
FACTOR XII	80	↑ 56	= 94
FACTOR II	72	↑ 8	↑ 132
FACTOR X	72	↑ 63	↑ 242
ALFA-2 APL	70	ND	= 97
AT-III	65	↑ 88	↓ 11
FACTOR IX	56	↑ 30	= 119
FACTOR VII	56	↑ 148	↑ 366

RESUMEN DE RESULTADOS

1. No se detectó actividad de ninguna de las proteínas estudiadas en orina de ratas controles y de ratas experimentales el día 2.
2. El TP y TPTa disminuyó en el plasma de ratas del día 10.
3. El FC II aumentó, y la AT III y el CF VIII disminuyeron en plasma en el día 2.
4. La actividad plasmática de los FC I, II, VII, X y XI y de los CF V y VIII aumentó, la de AT III disminuyó, y la de los FC IX y XII y de alfa₂-APL no cambió en el día 10.
5. La AT III, los FC II, VII, IX, X, XI y XII y el CF VIII aparecieron en orina en proporciones variables en el día 10.

VI DISCUSION

El SN inducido por el ANP ha sido usado como un buen modelo del síndrome nefrótico de cambios mínimos observado en humanos (2,5,6). Para la realización de este estudio se usó este modelo para explorar la relación entre las alteraciones metabólicas características del SN experimental y la actividad plasmática de las proteínas involucradas en los procesos de coagulación.

Como se ha informado en la literatura(29-37), el SN afecta marcadamente el metabolismo de las proteínas plasmáticas (de transporte, enzimas, etc) tanto en humanos como en ratas no exceptuando las que forman parte de los sistemas que mantienen la homeostasis (34,38-51,92), la que probablemente causan una elevada tendencia a la trombosis venosa y arterial en pacientes con SN (53).

Se sabe por lo reportado en la literatura, que existen alteraciones plasmáticas en algunas proteínas de la coagulación en ratas con SN (38,87,92), pero no se han realizado estudios sistemáticos acerca de las demás proteínas de la coagulación durante el SN.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, manifiestan una clara tendencia al aumento de la actividad plasmática de casi todos los FC en el día 10 que representa la etapa nefrótica excepto los FC IX y XII los cuales no mostraron variaciones significativas.

El grupo experimental día 2 (pre-nefrótico) no presentó variaciones significativas con respecto al grupo control según lo muestra el análisis estadístico realizado para ello, excepto el FC VIII y AT III. Las alteraciones observadas en este día se pueden deber al efecto directo y transitorio del ANP sobre el hígado (93).

El aumento en la actividad plasmática de los FC I, II, V, VII, VIII, X y XI en el día 10 concuerda con los informados por algunos autores para el SN en humanos (39-51), así como con los cambios en los FC I, II en el SN en las ratas (34). Por otra parte, la pérdida urinaria de los FC no guardó una estricta relación con respecto a su PM. Los FC de mayor PM tales como el I y el V, de un PM aproximado de 330 KDa no aparecieron en la orina de las ratas nefróticas, pero las proteínas de menor PM aparecieron en orina con un porcentaje variable de actividad que no guarda relación alguna con el PM. Así el FC XI de PM 169 KDa apareció en la orina con una actividad de 69% mientras que la alfa₂-APL de PM 70 KDa no apareció en orina y proteínas de un mismo PM como los FC II y X (72 KDa) y los FC IX y VII (56 KDa) presentaron actividades diferentes (Ver tabla de resultados). Esto sugiere que la excreción urinaria de los FC no está determinada exclusivamente por su PM, sino que también podrían estar involucradas características tales como: la carga neta de las proteínas y el grado en que son reabsorbidas en el túbulo proximal. Además se debe tener presente que solo se cuantificó la actividad y no la concentración urinaria, por lo que estos FC pudieran encontrarse presentes en la orina aunque sin actividad, lo cual podría explicar su nula actividad urinaria. Lo cierto es que estas proteínas no guardaron relación entre su excreción urinaria y su PM.

Los cambios en los niveles plasmáticos de los FC, principalmente el aumento en su actividad durante este estudio, pueden deberse a: aumento en su síntesis, disminución en su catabolismo y/o cambios en su distribución corporal. En los humanos con SN está documentado el aumento en los niveles plasmáticos y en la síntesis hepática del

fibrinógeno sin cambios en su catabolismo (46) y un aumento en la síntesis de los FC V y VIII (94) durante el SN. No hay datos acerca de los cambios en la síntesis de los demás FC, aunque podemos sugerir que el aumento que estos presentaron se debe a un aumento en su síntesis debido a que forman parte de un sistema enzimático y la activación de cada una de estas enzimas implica un consumo de su precursor inactivo y la elevada actividad de los FC en el SN implica una gran cantidad de los precursores (zimógenos).

También el inhibidor de la coagulación AT III presentó alteraciones en su actividad plasmática en el día 10. La disminución en la actividad plasmática de AT III debido al SN en los humanos se atribuye a su pérdida urinaria (42,57,68-71). Aunque no ha sido determinada la proporción de su síntesis, degradación y distribución tanto en los humanos como en las ratas, es muy probable que la pérdida urinaria de AT III contribuya a la disminución de su actividad plasmática. Los FC II (59), VIII (61), IX (47,54,66,67), XI (61), XII (47,56,61-63) también se pierden por la orina de los humanos con SN. Además las actividades en orina de la proteína C y la Proteína S se reportan elevadas en pacientes humanos con SN (48). La alfa₂-APL no manifestó ningún cambio significativo en el día 10 de ratas con SN inducido con ANP respecto al grupo control, mientras que en la literatura los hallazgos más frecuentemente informados en el SN de los humanos, acerca de la alfa₂-APL es que no cambia (43) o que aumenta (40,43,73-75).

De los datos obtenidos en este estudio no se pueden sacar conclusiones acerca de la actividad del sistema fibrinolítico en las ratas co SN inducido con ANP, ya que solo se midió la alfa₂-APL. En otro trabajo se ha encontrado que el sistema fibrinolítico esta

disminuido en ratas con SN inducido con ANP (87) y por adriamicina (92). En humanos se encontró un aumento en la actividad total de antiplasmina y una disminución de plasminógeno (52). En humanos no existe consenso ya que la actividad del sistema fibrinolítico se ha encontrado alta (51) y baja (40).

A pesar de las alteraciones más comunes presentes en SN de humanos referentes a la coagulación en donde algunos FC tales como el XII y IX tienden a disminuir, algunos autores reportan TP y TPTa normales (54,76), mientras que otros autores reportan TP y TPTa prolongados (47,70). Estos valores encontrados nos muestran las discrepancias referentes las alteraciones de la coagulación en el SN de humanos, mientras que en el SN experimental con ANP se encontró un TP y un TPTa disminuido, probablemente debido a que los cambios en las proteínas de la coagulación en las ratas fueron más intensos y en la misma dirección.

El comportamiento de los FC de ratas y humanos con SN parecen mostrar una cierta similitud en la vía extrínseca y en la vía común y en la disminución plasmática y pérdida urinaria de AT III, mientras que las diferencias fueron evidentes en la vía intrínseca y en los niveles plasmáticos y urinarios de alfa₂-APL.

La relación que existe entre las alteraciones de las proteínas involucradas en la coagulación y el riesgo de trombosis durante el SN es realmente poca (95) a pesar del aumento plasmático de los FC I, V, VIII (46,94). Se ha propuesto que factores físicos como la hipovolemia y el aumento en la viscosidad de la sangre (53), así como en la cuenta y la agregabilidad plaquetaria, están involucrados en este fenómeno. La viscosidad sanguínea total está aumentada como

consecuencia del aumento en el hematocrito y del aumento en la viscosidad del plasma por los altos niveles de fibrinógeno (53,94). Otros autores han sugerido que la hipoalbuminemia quizás sea el factor más importante de riesgo a la trombosis (94). Pero en general el riesgo de trombosis en el SN no es muy frecuente a pesar de las alteraciones presentes. En el SN experimental no se han estudiado estos parámetros que quizás sea conveniente conocerlos y que riesgo presentan a trombosis.

Conociendo las similitudes existentes en los parámetros estudiados entre humanos y ratas con SN podrían continuarse los estudios a este respecto principiando por explorar como se encuentran las demás propiedades de la sangre (viscosidad, agregación y actividad plaquetaria, etc.) que pudieran influir en complicaciones trombóticas en la rata; posteriormente conociendo que las vías extrínseca y común de la rata y el humano con SN son muy similares respecto a su comportamiento, investigar como es que esta regulada esta actividad y si está aumentada la síntesis hepática de tales FC, investigar a nivel de biología celular los niveles de RNAm específico para cada una de estas proteínas en esta enfermedad y tratar con ello de explicar lo que sucede con el SN de los humanos. Sin embargo, se debe considerar que el SN con ANP es muy parecido al de cambios mínimos de los humanos y que las condiciones de esta enfermedad están controladas mientras que, en la de los humanos esta enfermedad esta acompañada de numerosas complicaciones adicionales al daño renal además del origen del daño renal.

VII CONCLUSIONES

Las alteraciones metabólicas más profundas se encuentran en las ratas inyectadas con ANP del grupo D10 que corresponden al estado nefrótico siendo la mayor parte de los valores encontrados significativamente diferentes al grupo control y al grupo D2.

Se encontraron marcadas alteraciones en la mayoría de las proteínas involucradas en los procesos de coagulación manifestandose por un estado francamente hipercoagulable en el grupo de ratas del día 10 al igual que la aparición de actividad urinaria de casi todos los factores de la coagulación.

Las pérdidas urinarias de estas proteínas fueron variables.

El hecho de que la actividad plasmática de algunas proteínas no cambie e incluso de eleve a pesar de sus pérdidas urinarias sugiere que hay un aumento en su síntesis.

La deficiencia de AT III puede ser secundaria a sus pérdidas urinarias.

Los cambios observados en el día 2 (etapa pre-nefrótica) parecen deberse a un efecto directo del ANP.

Las alteraciones de la coagulación observadas en las ratas con SM son parecidas pero no idénticas a las observadas en pacientes con SN.

VIII REFERENCIAS

1. Skorecki KL, Nadler SP, Badr KF, Brenner BM. Renal and systemic manifestation of glomerular disease. En: *The Kidney*, Tercera edición. Editado por BM. Brenner FC. Rector Jr. WB Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania, 1986; pp 891-928.
2. Pedraza-Chaverri J. Efecto de la disminución de la presión coloidosmótica sobre la biosíntesis de la albúmina de rata. Tesis de Maestría. División de estudios de posgrado, Facultad de Química, UNAM, 1982.
3. Heymann W, Lund HZ. Nephrotic syndrome in rats. *Pediatr* 1951;7:691-706.
4. Marsh JB, Drabkin DL. Metabolic channeling in experimental nephrosis. II. Lipid metabolism. *J Biol Chem* 1955;212:633-639.
5. Frenk S, Antonowics I, Craig JM, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.
6. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis. *J Lab Clin Med* 1957;50:437-446.
7. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982;46:16-23.
- 7a. Morisaki N, Matsuoka N, Saito Y, Kumagai A. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism* 1984;33:405-410.
8. Bennet CM, Glasscock RJ, Change RLC, Deen WM, Robertson CR Brenner BM. Perm-selectivity of the glomerular capillary wall: studies of experimental glomerulonephritis in the rat using dextran sulfate. *J Clin Invest* 1976;57:1287-1294.
9. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM. Mechanism of the puromycin-induced defects in transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1967;60:152-161.
10. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8:219-232.
11. Brenner BM, Hostetter TM, Humes D. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N Engl J Med* 1978;298:826-833.
12. Olson JL, Rennke HG, Venkatchalam MA. Alteration in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab Invest* 1981;44:271-279.

13. Caulfield JP, Farquhar MG. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1984;39:613-618.
14. Kanwar YS, Jakubowski JL. Unaltered anionic sites of glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1984;25:613-618.
15. Kerjaschki D, Vernillo A, Farquhar MG. Reduced sialylation of podocaxilin, the major sialoprotein of rat kidney glomerulus in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1985;118:343-349.
16. Vernier RL, Klein DJ, Sisson SP, Mahan JD, Oegama TR, Brown DM. Heparan sulfate rich anionic sites in the human glomerular basement membrane. Decreased concentration in congenital nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1983;309:1001-1009.
17. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986;29:478-483.
18. Beaman M, Birtwistle R, Howie 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.
19. Remuzzi G, Imberti L, Rossini M, Morelli C, Carminati C, Cattaneo, Bertani T. Increased glomerular thromboxane synthesis as a possible cause of proteinuria in experimental nephrosis. *J Clin Invest* 1985;75:94-101.
20. Lianons EA, Andres GA, Dunn MJ. Glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in rat nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 1983;72:1439-1448.
21. Bertani T, Livio M, Macconi D, Morigi M, Bisognno G, Patrono C, Remuzzi G. Platelet activating factor (PAF) as a mediator of injury in nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 1987;31:1248-1256.
22. Rullope L, Milletet VG, Alcazar JM, Priteo C, Tresguerras JAF, Garcia-Robles R, Sancho J, Rodicio JL. Participation of renal prostaglandins in the nephrotic syndrome. *Proc EDTA* 1982;19:738-743.
23. Zoja C, Benigni A, Verroux P, Ronco P, Bertani T, Remuzzi G. Indomethacin reduces proteinuria in passive Heymann nephritis in rats. *Kidney Int* 1987;31:1335-1345.
24. Baud L, Ardailou R. Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am J Physiol* 1986;251:F775-F776.
25. Dodds WJ. Hemostasis. En: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Editado por Kaneko JJ. Cuarto edición. Academic Press, New York, 1989;pp 274-312.
26. Apps DK, Bachelorid HS, Beinson R. The biochemistry of blood clotting: the digestion of a liquid to form a solid. *Essays in*

Biochemistry, Editado por K.F Tipton. Portland Press, London, U.K. 1992;27:17-35,

27. Behring Diagnostic, curso de coagulación 1991.

28. William WJ, Beuther E, Erslev AJ, Lichtmann MA. Biochemistry of plasma coagulation factors. En: Hematology 4a Edición, Mc Graw Hill Inc. New York, 1990;1267-1293.

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

30. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. Rev Invest Clin 1990;42:29-38.

31. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. In vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. Rev Invest Clin 1990;42:120-126.

32. Lewandowski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kent JD, Jefferson LS. Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. Am J Physiol 1988;214:C634-C642.

33. Beaman M, Oldfield S, MacLennan ICM, Michael J, Adu D. Hypogammaglobulinemia in nephrotic rats is attributable to hypercatabolism of IgG. Clin Exp Immunol 1988;74:425-430.

34. Girot R, León M, Jaubert M, Bellon B, Aiach M, Jusso F, Lepelletier O, Beguin S, Monnet JP. Albumin, fibrinogen, prothrombin and antithrombin III. Variations in blood, urines and liver in rat nephrotic syndrome (Heymann nephritis). Thromb Haemostas 1983;49:13-17.

35. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Activity of serum enzymes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. Renal Failure 1992;14:523-532.

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

37. Pedraza-Chaverri J, Calderón P, Cruz C. Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. Renal Failure 1993;15:149-155.

38. Kendall AG, Lohman RC, Dossetor JB. Nephrotic syndrome. A hypercoagulable state. Arch Inter Med 1971;127:1021-1027.

39. Kanfer A, Kleinknecht D, Broyer M, Jusso F. Coagulation studies

in 45 cases of the nephrotic syndrome without uremia. *Tromb Diath Haemorrh* 1979;24:562-571.

40. Thompson C, Forbes CD, Prentice CRM, Kennedy AC. Changes in blood coagulation and fibrinolysis in the nephrotic syndrome. *Q J Med* 1974;43:399-407.

41. Vaziri ND, Branson HE, Ness R. Changes of coagulation factors IX, VIII, VII, X and V in nephrotic syndrome. *Am J Med Sci* 1980;280:167-171.

42. Panicucci F, Sagripanti A, Vispi M, Pinori E, Lecchini L, Barsotti G, Giovannetti S. Comprehensive study of haemostasis in nephrotic syndrome. *Nephron* 1983;33:9-13.

43. Andrassy K, Ritz E, Bonner J. Hypercoagulability in the nephrotic syndrome. *Klin Wochenschr* 1980;58:1029-1036.

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

45. Vaziri ND, Gonzalez E, Barton CH, Chen HT, Nguyen Q, Arquilla. Factor XIII and its substrates, fibronectin, fibrinogen, and alpha₂-antiplasmin, in plasma and urine of patients with nephrosis. *J Lab Clin Med* 1991;117:152-156.

46. Takeda Y, Chen AY. Fibrinogen metabolism and distribution in patients with nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 1967;70:678-685.

47. Green D, Arruda J, Honig G, Muehrcke R. Urinary loss of clotting factors due to hereditary membranous glomerulopathy. *Am J Clin Pathol* 1976;65:376-383.

48. Cossio FG, Harker C, Batard MA, Brandt JT, Griffin JH. Plasma concentrations of the natural anticoagulants protein C and protein S in patients with proteinuria and antithrombinuria. *J Pediatr* 1980;96:390-392.

49. Koshy MC, Hashgarian M, Boreyko C. Factor IX deficiency in nephrotic syndrome. *Conn Med* 1975;39:472-474.

50. Epstein O, Bevan G, Siddiqui N, Ardeman S. Factor VII deficiency associated with nephrotic syndrome. *Br Med J* 1976;4:1361.

51. Jacobsson K. Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum. *Scand J Lab Clin Invest* 1955;7(supl 14):55-102.

52. Scheinman JI, Stiehm ER. Fibrinolytic studies in the nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 1971;5:206-212.

53. McGinley E, Lowe GDO, Boulton-Jones M, Forbes CD, Prentice CRM. Blood viscosity and hemostasis in the nephrotic syndrome. *Thromb Haemost* 1983;49:155-157.

54. Rahman R, Zanger B, Natelson EA. Factor IX deficiency in the

nephrotic syndrome: studies with prothrombin complex concentrate. *J Urol* 1975;113:853-855.

55. Honig GR, Lindley A. Deficiency of Hageman factor (factor XII) in patients with nephrotic syndrome. *J Pediatr* 1971;78:633-637.

56. Van Royen EA, Deboer JEG, Wilmink JM, Jenkins RSP, Ten Cate JW. Acquired factor XII deficiency in a patient with nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 1979;205:535-539.

57. Jorgensen KA, Stofferson E. Antithrombin III and the nephrotic syndrome. *Scand J Haematol* 1979;22:442-448.

58. Wagoner RD, Stanson AW, Holley KE, Winter CS. Renal vein thrombosis in idiopathic membranous glomerulopathy and nephrotic syndrome: incidence and significance. *Kidney Int* 1983;23:368-374.

59. Vaziri ND, Toohey JA, Paule P, Hung E, Darwish R, Barton CH, Alikhani S. Urinary excretion and deficiency of prothrombin in nephrotic syndrome. *Am J Med* 1984;77:433-436.

60. Thompson AR. Factor XII and other hemostatic protein abnormalities in nephrotic syndrome patients. *Thromb Haemost* 1982;48:27-32.

61. Lange LG, Carvalho A, Bagdasarian A, Lahiri B, Colman RW. Activation of Hageman factor in nephrotic syndrome. *Am J Med* 1974;56:565-569.

62. Vaziri ND, Ngo JT, Ibsen KH, Mahalwas K, Roy S. Deficiency and urinary losses of factor XII in adult nephrotic syndrome. *Nephron* 1982;32:342-346.

63. Saito K, Goodnough LT, Makker SP, Kallen RJ. Urinary Excretion of Hageman factor (factor XII) and presence of nonfunctional Hageman factor in the nephrotic syndrome. *Am J Med* 1981;70:531-534.

64. Hruby MA, Honig GR, Shapira E. Immunquantitation of Hageman factor in the urine and plasma of children with nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 1980;96:501-510.

65. Honig GR. Factor IX deficiency in nephroses. *Ann Inter Med* 1971;74:298-299.

66. Hanley DA, Lawrence JR. Factor IX deficiency in the nephrotic syndrome. *Lancet* 1967;i:1079-1081.

67. Natelson EA, Linch EC, Hetting RA, Alfrey CP. Acquired factor IX deficiency in the nephrotic syndrome. *Ann Inter Med* 1970;73:373-378.

68. Kauffman RH, De Graef J, Brutel De la Reviere G, Van Es LA. Unilateral renal vein thrombosis and nephrotic syndrome. Report of a case with protein selectivity and antithrombin III clearance studies. *Am J Med* 1976;60:1048-1054.

69. Mori R, Triolo L, De Stefano V, Giusti BP, De Sole P, Leone G. Plasma levels and loss of antithrombin III in chronic ambulatory peritoneal dialysis and nephrotic syndrome associated with plasminogenuria and antithrombinuria. *J Pediatr* 1980;96:390-392.
70. Lau SO, Tkachuk JY, Hasegawa DK, Edson JR. Plasminogen and antithrombin III deficiencies in the childhood nephrotic syndrome associated with plasminogenuria and antithrombinuria. *J Pediatr* 1980;96:390-392.
71. Thaler E, Balzar E, Kopsa H, Pinggera WF. Acquired antithrombin III deficiency in patients with glomerular proteinuria. *Haemostasis* 1978;7:257-272.
72. Boneu B, Boissou F, Abbal M, Sie P, Caranobe C, Barthe P. Comparisons of progressive antithrombin activity and concentration of three thrombin inhibitors in nephrotic syndrome. *Thromb Haemost* 1981;46:623-625.
73. Taberner DA, Ralston AJ, Ackrill P. Acquired alpha₂-antiplasmin deficiency in glomerular proteinuria. *Br Med J* 1981;282:1121.
74. Francis Jr RB, Sandler RM, Levitan D, Feinstein EI, Massry SG, Feinstein DI. Reduced alpha₂-antiplasmin levels in the nephrotic syndrome. *Nephron* 1985;325-329.
75. Alkjaersing N, Fletcher AP, Narayanan M, Robson AM. Course and resolution of the coagulopathy in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1987;31:772-780.
76. Vaziri ND, Paule P, Toohey J, Hung G, Alikhani S, Darwish R, Phal MV. Acquired deficiency and urinary excretion of antithrombin III in the nephrotic syndrome. *Arch Inter Med* 1984;144:1802-1803.
77. Cameron S, Davison AM, Grunfeld JP, Kerr D, Ritz E. Clinical consequences of the nephrotic syndrome. En : Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford medical publication, Oxfors university press, New York. 1992;276-296.
78. Alfrey AC, Hammon WS. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1990;37:1409-1413.
78. Mainero A, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Serum and urine ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome. *Clin Invest Med* 1991;15:295-300.
80. Chan YL, Mason RS, Parmentier M, Saude E, Lissner D, Poseman S. Vitamin D metabolism in the nephrotic rats. *Kidney Int* 1983;24:336-341.
81. Khamise G, Vaziri ND, Oveisi F, Ahmandnia MR, Ahmandnia 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.

82. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC. Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 1991;57:106-108.
83. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Sandoval AA, Tapia E, Peña JC. Effect of captopril on urinary excretion of renin and angiotensinogen in aminonucleoside nephrosis. *Renal Failure* 1992;14:155-159.
84. Housley J, Jones L, Harvey A. Serum alfa-macroglobulins in rat aminonucleoside nephrosis. *Clin Chim Acta* 1968;21:85-95.
85. 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;17:391-399.
86. 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.
87. Marsh NA. The fibrinolytic enzyme system of the rat: the effect of aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Br J Exp Pathol* 1969;50:1-12.
88. Schermer S. "The blood morphology of laboratory of laboratory animals". Tercera edición. Davis. Philadelphia Pennsylvania, 1967;43-49.
89. Tschopp TB, Zucker MB. Hereditary defect in platelet function in rats. *Blood* 1979;40:217-226.
90. Beller FK, Theiss W. Fibrin derivatives, plasma hemoglobin and glomerular fibrin deposition in experimental intravascular coagulation. *Thromb Diath Haemorr* 1973;29:363-374.
91. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
92. Poggi A, Karnblitt L, Delaini F, Colombo T, Mussoni L, Ryers I, Donati MB. Delayed hypercoagulability after a single dose of adriamycin to normal rats. *Thromb Res* 1979;16:639-650.
93. Lewin PK, Moscarello MA. Liver ultrastructural and biochemical changes in the nephrotic syndrome stage of aminonucleoside nephrosis. *Exp Mol Path* 1968;8:21-33.
94. Early LE, Havley RJ, Hopper J. Nephrotic syndrome. *California Med* 1971;115:12-41
95. Robert A, Olmer M, Sampol J, Gugliotta J, Casanova P. Clinical correlation between hypercoagulability and thromboembolic phenomena. *Kidney Int* 1987;31:830-835.