



00381
11
Z E J

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DISFUNCION EN EL EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS -
GONADA EN EL SINDROME NEFROTICO
DE LA RATA

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

M. EN C. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

DIRECTOR DE TESIS

DR. GREGORIO A. PEREZ PALACIOS

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo de tesis. También deseo expresar mi gratitud al Biólogo Felipe Vilchis, por su amistad y participación en la investigación realizada, al Dr. José Pedraza Chaverrí por su valiosa contribución y de manera muy especial mi agradecimiento al Dr. Gregorio Pérez Palacios por su apoyo a lo largo de mi formación profesional.

INDICE

	Pg.
Resumen	
Introducción	1
Antecedentes	2
I. Síndrome Nefrótico	2
1. Características del síndrome nefrótico.	
a. Proteinuria.	
b. Hipoproteinemia.	
c. Hiperlipidemia.	
c. Edema.	
2. Alteraciones de la función tiroidea.	
3. Alteración del calcio y vitamina D.	
4. Anormalidades en la coagulación.	
5. Alteraciones en la proteínas acarreadoras de metales.	
6. Alteraciones endócrinas reproductivas.	
7. Causas del síndrome nefrótico.	
a. Enfermedades glomerulares primarias.	
b. Secundario a otras enfermedades.	
8. Enfermedad de los cambios mínimos.	
9. Inducción experimental del síndrome nefrótico.	
II. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada	14
1. Hormonas hipotalámicas.	
2. Mecanismo de acción de LHRH.	
3. Hormonas hipofisiarias.	
4. Mecanismo de acción de gonadotropinas.	
a. Función en el testículo.	
b. Función en el ovario.	
5. Esteroidogénesis gonadal.	
6. Mecanismos regulatorios.	
7. Ciclo estral.	
Justificación	28
Objetivo	29
Objetivos específicos	29
Materiales y métodos	30
Resultados	35
Discusión	52
Conclusiones	59
Bibliografía	60
Publicaciones originales	65

RESUMEN

El síndrome nefrótico (SN) es un padecimiento renal que se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, hiperlipidemia y edema, estos cambios metabólicos son generalmente reversibles, pero con recaídas frecuentes. Este síndrome puede ser inducido experimentalmente inyectando suero antirriñón, daunomicina, adriamicina y aminonucleósido de puromicina (ANP). Pese a que es reconocida la presencia de trastornos reproductivos (impotencia, amenorrea, hipogonadismo) en pacientes con síndrome nefrótico, no existen estudios al respecto en seres humanos y los reportes en modelos animales son controversiales. En la rata macho Glass y cols. (1985) reportaron la presencia de hipogonadismo-hipogonadotrópico y por su parte Elias y cols. (1992) publicaron resultados que indican que existe hipoandrogenismo pero con altos niveles de hormona luteinizante.

Basados en los antecedentes mencionados el presente estudio tuvo como objetivo **estudiar las alteraciones que sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se presentan en la rata con síndrome nefrótico.**

El SN fue inducido administrando una dosis subcutánea única de ANP a ratas adultas de ambos sexos ($n=8$), los grupos controles recibieron solución salina. La función endócrina se valoró en base a las concentraciones hormonales, el ciclo estral, el peso de los tejidos andrógeno dependientes y la capacidad reproductiva. El estudio se realizó de la siguiente manera: a) en fase nefrótica (día 10), b) secuencialmente (día 3, 7 y 10), y c) fase de remisión (día 30). En las fases establecidas se tomaron muestras de suero de cada grupo de animales para la cuantificación de proteínas y colesterol por métodos colorimétricos, así como para la cuantificación por radioinmunoanálisis de hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), prolactina (PrL), progesterona (P_4), estradiol (E_2), testosterona total (Tt) y libre (Tl), y androstendiona (A). Se colectó la orina de 24 h de cada rata para la cuantificación de proteínas y testosterona. Se registraron los pesos de los animales así como de los tejidos andrógeno dependientes (próstata ventral y vesícula seminal) en las ratas macho. En la rata hembra el ciclo estral fue monitoreado durante todo el estudio mediante exudados vaginales y el tejido ovárico colectado para su estudio histológico. La capacidad reproductiva se evaluó realizando montas de los animales nefróticos de ambos sexos con ratas fértiles en las fases aguda y de remisión.

Los resultados obtenidos en la fase nefrótica del síndrome, muestran que las concentraciones de E_2 , P_4 y LH disminuyen significativamente respecto de los grupos controles en la rata hembra; por su parte Tt, A, E_2 , LH y FSH disminuyen significativamente respecto de sus controles en la rata macho. El ciclo ovárico normal de 4 días se perdió completamente, estacionándose en la fase de diestro, lo cual junto con la disminución de E_2 , correlaciona perfectamente con la atresia folicular que se observó en el estudio histológico de los ovarios nefróticos. La falta de andrógeno en las rata macho se reflejó claramente en la disminución del peso de los tejidos andrógeno dependientes como próstata y vesícula seminal. La evaluación de la etapa de remisión mostró que la disfunción hormonal en ambos sexos, así como los trastornos en el ciclo estral, son completamente reversibles en la fase de remisión. El estudio realizado para analizar la capacidad reproductiva en la rata con síndrome nefrótico, mostró incapacidad de fertilización en la rata hembra durante la fase aguda, en base a la ausencia de ovulación. Interesantemente en la rata macho hubo fertilización aunque disminuida a 37 por ciento. La capacidad reproductiva en ambos sexos se restaura a los niveles normales en la fase de remisión.

Los resultados aportados por este estudio nos permiten concluir que existe una disfunción en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en la rata con síndrome nefrótico, la disfunción endócrina encontrada se manifiesta en la rata macho por hipogonadismo-hipogonadotrópico, disminución del peso de los tejidos andrógeno dependientes y disminución transitoria de la capacidad reproductiva en la fase aguda del síndrome; en la rata hembra la disfunción endócrina conduce a hipogonadismo-hipogonadotrópico, pérdida del ciclo estral, presencia de atresia folicular y a una pérdida total, aunque transitoria, de la capacidad reproductiva en la fase aguda del padecimiento.

INTRODUCCION

La característica distintiva del sistema endócrino es el control por retroalimentación de la producción hormonal. La base de este control por retroalimentación es la interacción del hipotálamo y la glándula hipofisiaria con la tiroides, adrenales, y gónadas. Este fino sistema de control homeostático se rompe ante la mas mínima falla en sus componentes, así, este eje se ve adversamente afectado en padecimientos como la diabetes mellitus, la cual se ha asociado con reducción en la síntesis de andrógenos y disminución en el peso de los órganos sexuales accesorios (1). La insuficiencia renal crónica es otro padecimiento que cursa con trastornos endocrinológicos, la presencia de hipogonadismo en pacientes de ambos sexos, así como el retraso en la pubertad y anomalías en los ejes tirotrópico, lactotrópico y somatotrópico, son ejemplos de alteraciones específicas de la función endócrina que ocurren en los diferentes estadios de la insuficiencia renal (2-5).

El síndrome nefrótico (SN) es un padecimiento de alta frecuencia dentro de los trastornos renales. Motivo por el cual ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, a pesar de que en los pacientes nefróticos es reconocida la presencia de anormalidades en la función reproductiva, que afecta principalmente al sexo masculino, no existen en la actualidad estudios que analicen las posibles alteraciones endócrinas, así como los posibles mecanismos fisiopatológicos involucrados en la disfunción del eje reproductor. Por lo que el presente trabajo de tesis incursionó en este tema para establecer las bases de las alteraciones endócrinas reproductivas que se presentan en el SN en el modelo experimental de la rata.

ANTECEDENTES

I. Síndrome nefrótico

El SN se caracteriza por proteinuria, albuminuria, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia, hiperlipidemia, anormalidades en la coagulación y alteraciones en la concentración de casi todas las proteínas plasmáticas (6). Estas alteraciones son las consecuencias directas o indirectas de un aumento en la permeabilidad glomerular de las proteínas del plasma hacia la orina. La alteración de la pared capilar glomerular que sufre una filtración excesiva de las proteínas del plasma puede originarse como consecuencia de una amplia variedad de procesos patológicos, incluyendo trastornos inmunitarios, lesiones tóxicas, alteraciones metabólicas, defectos bioquímicos y trastornos vasculares. Así pues, el SN deberá ser visto como el punto final común de una variedad de procesos patológicos que dañan las propiedades de permeabilidad de la pared de los capilares glomerulares (6).

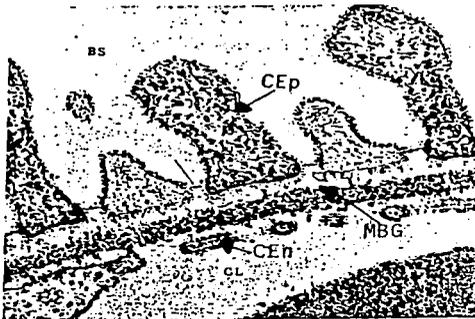
1. Características del síndrome nefrótico

a. Proteinuria

La proteinuria abundante es la distinción del estado nefrótico. Arbitrariamente, los ritmos de excreción excesiva de proteínas de 3.5 g por 1.73 m² por día en el humano, se considera que están en el límite nefrótico, principalmente debido a que rara vez se observa proteinuria de esta magnitud en las enfermedades túbulo intersticiales y vasculares del riñón (6). A menudo, aunque no invariablemente, la proteinuria abundante sostenida se acompaña de hipoalbuminemia.

El mecanismo por el cual se produce la proteinuria en el humano no está completamente dilucidado. Sin embargo las evidencias indican que existe un daño en la barrera de filtración glomerular. Esta barrera está constituida por la pared capilar glomerular, la cual consta de tres componentes (Fig.1):

Figura 1.



1) las células endoteliales (CEn), las cuales están dispuestas a lo largo de la parte interna de la membrana basal glomerular, por lo que están en contacto con la sangre. Miden aproximadamente 40 nm de grosor y una de sus características es que presentan agujeros o fenestras que no tienen diafragmas que los cierren (7-8). La superficie celular polianiónica de estas células se debe a la presencia de una sialoproteína llamada podocalixina (9).

2) la membrana basal glomerular (MBG) compuesta por tres capas: lámina rara interna, lámina densa y lámina rara externa. En el humano el espesor total de la MBG es de 240-340 nm y cada capa ocupa aproximadamente una tercera parte del total. Los componentes de la MBG han sido difíciles de identificar dado que en los procesos de filtración hay elementos que parecen haber sido atrapados por la matriz de la MBG y por tanto son contaminantes (10-11). Dentro de los componentes que se reconocen como constituyentes básicos de la MBG están: colágena tipo IV (12), proteoglicanos heparán sulfato (HS-PG) (13), laminina (14), nidogen (15), fibronectina (16) y entactina(17).

3) Células epiteliales (CEp) o podocitos, estas células están parcialmente embebidos en la capa externa o lámina rara externa a una profundidad de 40-50 nm. Los podocitos constituyen la parte más externa de la barrera de filtración glomerular y están en contacto directo con el espacio urinario. En los podocitos se realizan procesos de filtración denominados procesos podocíticos, ellos contienen manojos de elementos contráctiles como microfilamentos y microtúbulos (18). Otro constituyente importante es la sialoproteína podocalixina que es más abundante en los podocitos que en las células endoteliales (19). Entre las interdigitaciones de los podocitos están los agujeros epiteliales, tienen un ancho de 20-30 nm en su punto más angosto, en donde presentan un diafragma delgado de 4-6 nm de grosor conocido como diafragma de filtración, cuya composición química es desconocida a la fecha (20).

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

En la nefrosis inducida por aminonucleosido de puromicina (ANP), la depuración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga se encuentra muy elevada, lo que sugiere que la selectividad, tanto de tamaño como de carga, esta alterada (21-22). La lesión renal característica del SN es la fusión de los procesos podocíticos, la cual parece deberse a la pérdida de la carga negativa de su superficie (23). Esto se apoya en el hecho de que la administración de policationes al riñón produce proteinuria y fusión de podocitos. No está claro si los HS-PG de la barrera de filtración glomerular disminuyen en la nefrosis por ANP;

sin embargo, en los pacientes con SN congénito, los sitios aniónicos ricos en heparán sulfato, están prácticamente ausentes (24-25).

Estudios en animales nefróticos inducidos con ANP indican la presencia de proteinuria no selectiva en esta enfermedad. Todas las fracciones incrementan en la orina durante los 8-10 días posteriores a la administración de la droga (26). Asimismo se ha reportado un aumento en la transcripción del gen de la albúmina en el hígado de ratas nefróticas (27-28).

Las consideraciones anteriores muestran que la proteinuria es el resultado de múltiples factores tales como: aberraciones funcionales, defectos estructurales, o anomalías bioquímicas en la barrera de filtración glomerular.

b. Hipoproteinemia

En el SN, sólo una fracción de las proteínas filtradas aparece en orina, el resto se reabsorben y metabolizan en el túbulo proximal. Esto produce pérdida de proteína del espacio intravascular mucho mayor que la esperada por la magnitud de la proteinuria. El resultado es un incremento importante en el catabolismo de las proteínas que la síntesis hepática no alcanza a compensar, lo que trae como consecuencia la hipoproteinemia. En ocasiones la hipoalbuminemia abundante puede coincidir con excesiva reducción del volumen plasmático, hipotensión postural, con síncope y choque, y a veces con insuficiencia renal aguda (6, 25).

c. Hiperlipidemia

Parece que la disminución de la presión oncótica del plasma estimula la síntesis hepática de las lipoproteínas, y por tanto, la hiperlipidemia es un acompañante frecuente del

estado nefrótico (29). En el SN están elevadas prácticamente todas las fracciones de lípidos y lipoproteínas séricas, incluyendo el colesterol y todas sus fracciones (total, libre, esterificado), así como los fosfolípidos, en tanto que los triglicéridos no siempre se elevan (30). Los ácidos grasos libres son normales, aunque la fracción unida a albúmina está reducida. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las de densidad intermedia (IDL) y las de baja densidad (LDL) se encuentran aumentadas, mientras que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) no siempre aumentan e incluso pueden disminuir (31). La composición molecular de las lipoproteínas está alterada ya que su proporción de colesterol y triglicéridos es mayor que lo normal. Además existen alteraciones en la composición y cantidad de las apoproteínas. Estos trastornos se normalizan con rapidez al remitir el SN (6, 24). Otro factor que contribuye a la hipercolesterolemia del SN es el aumento en la síntesis de colesterol inducido por la elevación del ácido mevalónico, que a su vez se debe a disminución de su catabolismo renal (32).

d. Edema

De acuerdo con la hipótesis clásica, la hipoalbuminemia es el paso inicial en la formación del edema y en la retención de sodio (24). La hipoalbuminemia produce disminución de la presión coloidosmótica de la sangre, lo que favorece el movimiento de agua y solutos al espacio intersticial causando hipovolemia. Esto activa a los sensores de volumen y a los barorreceptores, los cuales por medio de una variedad de mecanismos neurohormonales y hemodinámicos, envían señales al riñón que se traduce en retención de sodio y agua (33). De acuerdo con esta hipótesis los pacientes con SN deberían tener las siguientes características: 1) volumen sanguíneo bajo durante la formación del edema, 2) diuresis y natriuresis en respuesta a maniobras que aumentan el volumen sanguíneo, y 3)

evidencia funcional de hipovolemia. Sin embargo esto no se ha demostrado en la mayor parte de los casos (24).

2. Alteraciones de la función tiroidea

En el SN son importantes las pérdidas por la orina de otras proteínas del plasma además de la albúmina. Se ha reportado reducción en suero de la globulina de unión de tiroxina (TBG) (34), así como de la proteína de unión a corticosteroides (CBG) (35). En pacientes con SN estas alteraciones pueden producir alteraciones en las pruebas de la función tiroidea que incluyen una T_4 baja y un aumento de la captación de la resina T_4 (34). En modelos experimentales se ha demostrado que los bajos niveles en suero de T_4 y altos de T_3 , están relacionados con una aceleración en la depuración de T_4 así como un incremento en la depuración de T_3 y un aumento en la conversión periférica de T_4 a T_3 (36).

3. Alteraciones del calcio y de vitamina D

En el SN se presenta hipocalcemia, hipocalciuria y absorción intestinal de calcio defectuosa, lo cual se ha asociado a una disminución en los niveles sanguíneos de vitamina D_3 y sus metabolitos (37). En pacientes nefróticos se ha reportado un bloqueo de la respuesta calcémica a la hormona paratiroidea (PTH), es decir que se bloquea la resorción del calcio de los huesos hacia la sangre, observándose elevados niveles de PTH en pacientes con SN, lo que provoca hiperparatiroidismo secundario.

4. Anormalidades en la coagulación

La mayoría de los pacientes nefróticos presentan un estado hipercoagulante en el SN. Las anormalidades de la coagulación más características del estado nefrótico son: aumento de los factores V, VIII y del fibrinógeno; disminución de antitrombina III; trombocitosis y aumento en la agregación plaquetaria (6, 38).

5. Alteraciones en las proteínas acarreadoras de metales

El aumento en la excreción urinaria de transferrina puede causar en muchos casos anemia microcítica hipocrómica resistente a hierro (39). Debido a las pérdidas urinarias de las proteínas de unión a los metales, albúmina y ceruloplasmina, pueden producirse además, deficiencias de zinc y cobre (40).

6. Alteraciones endócrinas reproductivas

Este tipo de alteraciones han sido pobremente estudiadas en el SN, hasta donde hemos podido investigar, sólo existen dos reportes que evalúan la función endócrina reproductiva en modelos experimentales. Estas investigaciones realizadas en ratas macho a las que se les induce el SN con ANP son controversiales, así Glass y cols. (41) reportan concentraciones disminuidas de testosterona (T) y hormona luteinizante (LH), con respuestas normales a nivel testicular e hipofisiario por estímulo de hCG y LHRH respectivamente, Elias y cols. (42) informan acerca de la presencia de hipogonadismo con altos niveles de LH circulantes.

7. Causas del síndrome nefrótico

El SN puede desarrollarse por diversas causas, en base a lo cual se clasifican de la siguiente manera:

a. Enfermedades glomerulares primarias

Enfermedad de cambios mínimos, glomerulonefritis proliferativa del mesangio, glomerulo-esclerosis focal y segmentaria, glomerulopatía membranosa y glomerulonefritis membranoproliferativa.

b. Secundario a otras enfermedades

Infecciones, medicamentos, neoplasia, multisistémicas (diabetes mellitus, lupus eritematoso) y heredofamiliar (6).

Las enfermedades glomerulares primarias son conocidas como SN idiopático, cuyo diagnóstico se hace por exclusión entre las causas conocidas del SN. Además, las formas idiopáticas del SN se clasifican de acuerdo con las características morfológicas que se encuentran en la biopsia renal. Se requiere hacer una biopsia renal al menos en los adultos para asegurar el diagnóstico de SN idiopático y para la formulación de un plan racional de tratamiento. Los niños no siempre necesitan someterse a biopsia renal, puesto que a menudo un estudio clínico cuidadoso puede llevar al diagnóstico seguro (6).

8. Enfermedad de cambios mínimos

La enfermedad de los cambios mínimos es la forma más frecuente de SN idiopático que se encuentra en los niños, 70-80 %. En el adulto es frecuente y representa el 15-20 % de casos en pacientes mayores de 16 años, presentándose con mayor porcentaje en los hombres que en las mujeres. En esta forma del SN idiopático el microscopio de luz no muestra alteraciones de los capilares glomerulares (de aquí la designación de "cambios mínimos"), sin embargo con el microscopio electrónico es notable un borramiento difuso de los procesos podales del epitelio. El microscopio de inmunofluorescencia revela depósitos irregulares e inespecíficos de inmunoglobulinas o de componentes del complemento, que también pueden estar ausentes.

Típicamente, los pacientes se presentan con SN declarado, presión arterial normal, velocidad de filtración glomerular normal o reducida ligeramente y un sedimento urinario benigno. Inexplicablemente casi siempre se presentan remisiones y recaídas espontáneas con proteinuria abundante. El tratamiento es empírico y sintomático, si se toma en cuenta que se desconocen la etiología y la patogénesis. Hay muchas pruebas de que los corticosteroides aumentan notablemente la tendencia natural de esta enfermedad a tener remisiones espontáneas, pero aún así el tratamiento diario o en días alternos con esteroides por vía oral parece ser igualmente efectivo (6).

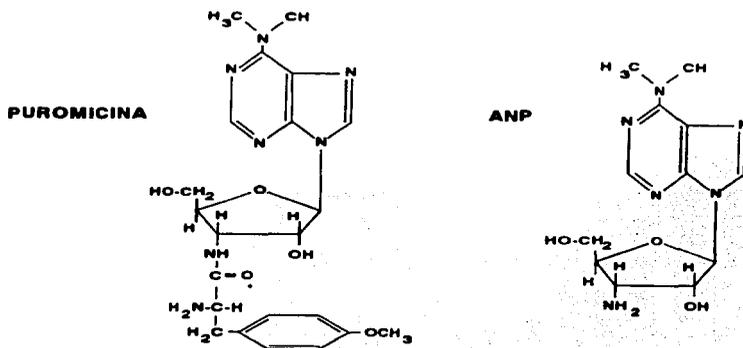
9. Inducción experimental del síndrome nefrótico

El SN puede ser inducido experimentalmente inyectando suero antirriñón, daunomicina, adriamicina y ANP (43-45).

a. Aminonucleósido de puromicina

El aminonucleósido de puromicina [6-dimetilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi-β-D-ribofuranosil)purina] es un derivado de la puromicina (Fig.2). Este último se obtiene del hongo actinomiceto *Streptomyces alboniger*; se presenta de forma cristalina y transparente en el suelo donde vive el hongo. La puromicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas debido a que su estructura es muy semejante al aminoacil ARN de transferencia (ARNt), lo que impide la unión del fragmento aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma (46) y evita la transferencia de aminoácidos del ARNt a la proteína, es decir que el crecimiento de la cadena peptídica se interrumpe en el ribosoma (47) lo que permite la formación de pequeños péptidos a partir de los aminoácidos unidos originalmente al ARNt (48).

Figura 2.



El ANP fue sintetizado en 1954 por Baker (49) a partir del residuo p-metoxitirosil unido al grupo amino del azúcar de la puromicina (50). La estructura de la puromicina está constituida de dos partes: un anillo de purina con un grupo dimetilamino en la posición 6, y un aminoazúcar desoxirribosídico en posición 3' (51). Se ha observado que ninguna de las partes estructurales constituyentes del ANP por si sola es el agente nefrotóxico, y ni aún administrando las dos partes por separado puede inducirse nefrotoxicidad, por lo que solo el ANP integro tiene esta capacidad (51). El ANP presenta una actividad de tripanicida de tres a cuatro veces mayor que el de la puromicina e inhibe el crecimiento tumoral mamario en ratones mejor que la puromicina. También se ha administrado en pacientes con cáncer y parece más tóxico que la puromicina, las dosis diarias de 3-4 mg/Kg por 15 días causan severa proteinuria y descamación de las superficies ventrales de manos y pies (52).

Muchos autores se refieren indistintamente a la puromicina y al ANP, esto ha creado cierta confusión, ya que, aunque el mecanismo de acción aún no está definido para el ANP, se sabe que inhibe la síntesis de ARN pero no la síntesis de proteínas (47, 53-54) como se ha descrito para la puromicina (53). El ANP, a diferencia de la puromicina, no presenta efecto en la incorporación de aminoácidos dentro de la proteína total celular (47) o sobre la actividad de los sistemas sintetizadores de proteínas libres (53). El mecanismo por el que el ANP interfiere con la síntesis de ARN no se conoce, pero se ha sugerido que el ANP interfiere en la ruta del metabolismo de las purinas, bloqueando las vías enzimáticas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y nucleoproteínas (55). También se desconoce el mecanismo por el cual el ANP causa daño renal, pero existen estudios que indican que el daño celular es mediado por la presencia de radicales libres del oxígeno y sus especies

reactivas tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iones superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH), que son productos del metabolismo del ANP (56).

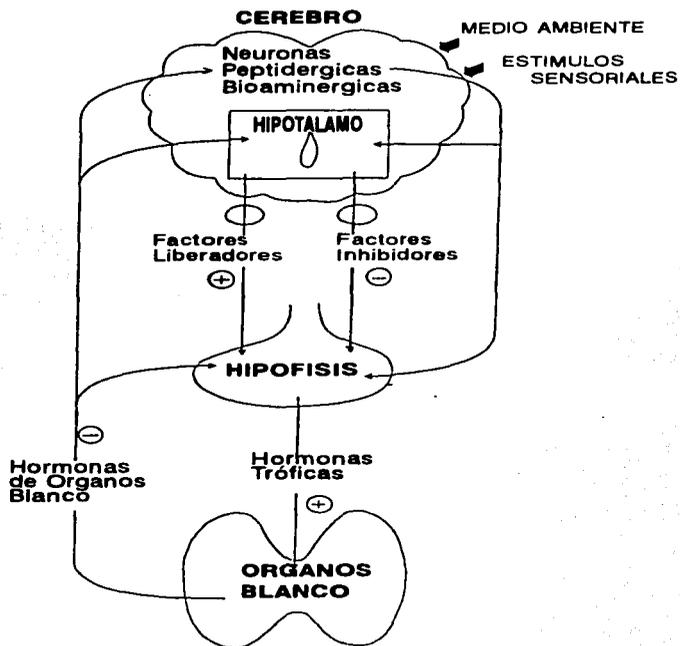
Se ha encontrado que el ANP es especie específico ya que presenta alta nefrotoxicidad en la rata (57), en el hombre (58), y en el mono en pequeñas dosis produce SN (59) observándose que en estos la enfermedad es menos severa que en las ratas. En el perro se observa mediana nefrotoxicidad ya que se presentan lesiones renales microscópicas semejantes a las descritas en ratas, así como proteinuria e hipoalbuminemia, pero no presentan edema, ni hipercolesterolemia (60). En el cobayo no se produce nefrotoxicidad pero si toxicidad (61).

El ANP es un compuesto muy utilizado para el estudio del SN dado que en especies animales como la rata, su administración en dosis que varían alrededor de 15 mg/100g de peso, induce el padecimiento con las características del SN denominado de cambios mínimos del humano, principalmente entre los días 7-10 (62). De la dosis administrada de ANP, en la rata el 80 % se excreta en 24 horas (63), otros autores indican que el 90 % se excreta en orina en 8 horas y de este entre el 90-60 % se eliminan en la primera hora (64).

II. Eje hipotálamo-hipófisis-gónada

El hipotálamo constituye el punto de unión entre el cerebro y la glándula hipofisiaria. La secreción de hormonas adenohipofisiarias es controlada positiva y negativamente por factores hipotalámicos. Las hormonas hipofisiarias, liberadas a la circulación periférica, regulan el crecimiento celular, la diferenciación, así como actividades funcionales en los órganos blanco (Fig.3). El mantenimiento del medio ambiente interno requiere múltiples señales que convergen sobre el sistema neuronal del hipotálamo, el cual según el caso provee a través de las hormonas hipofisiarias una respuesta endócrina-metabólica específica (65).

Figura 3.



La íntima asociación anatómica y funcional de la glándula hipofisiaria con el hipotálamo se lleva a cabo entre la eminencia media hipotalámica y la adenohipófisis, por medio de un sistema microvascular portal, el cual provee un delimitado paso de sustancias provenientes del cerebro, tales como el factor liberador de gonadotropinas (GnRh), que es el responsable del control de la glándula hipofisiaria anterior. Aunque múltiples hormonas liberadas por el hipotálamo han sido aisladas y sus estructuras determinadas, no se sabe si todos los factores relevantes han sido ya encontrados y qué moduladores controlan su secreción. Estudios recientes demuestran que la arquitectura de la unidad hipotalámica-hipofisiaria es mucho más compleja de lo que se pensaba y que la red vascular existente entre el cerebro y la hipófisis está dispuesta de tal manera que la glándula hipofisiaria puede también controlar la secreción hipotalámica (65).

1. Hormonas hipotalámicas

El hipotálamo juega un papel importante en la regulación hormonal de la función hormonal reproductiva. En la conexión hipotálamo-hipófisis, la dirección del flujo sanguíneo se da principalmente en dirección a la hipófisis, la interrupción de ésta conexión conduce a una disminución de los niveles de gonadotropinas así como a una eventual atrofia gonadal y la consecuente falla en la secreción de esteroides (66). Existe también un flujo retrógrado en el sistema vascular portal, el cual constituye el asa corta del sistema de control por retroalimentación entre el hipotálamo y la hipófisis (67).

El área preóptica y la región media basal del hipotálamo contienen importantes centros para el control de la secreción de gonadotropinas. Neuronas peptidérgicas en esta región

secretan la hormona liberadora de gonadotropinas llamada GnRH o LHRH. Neuronas de otras regiones del cerebro presentan terminales en esta área e influyen en la síntesis y liberación de LHRH vía mecanismos catecolaminérgicos, dopaminérgicos, y otros más relacionados con endorfinas (68-69). El péptido LHRH constituye el vínculo humoral entre el componente neural y el endócrino de la función reproductiva. LHRH es un decapeptido cuya estructura fue elucidada en 1971 por el grupo del Dr. Schally (70). Estudios recientes basados en la secuencia genómica de LHRH muestran que esta molécula es producto del procesamiento de una molécula precursora de 92 aminoácidos (pre-pro-LHRH) (71). LHRH está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central así como en otros tejidos. Sin embargo su papel en sitios distintos de la hipófisis aún se desconoce. La vida media de LHRH es muy corta (2-4 min), y su depuración metabólica promedio es de 800 L/d/m² de superficie corporal (72).

2. Mecanismo de acción de LHRH

El primer paso en la acción de LHRH es mediado vía el reconocimiento específico de receptores localizados exclusivamente en la membrana de los gonadotropos hipofisarios. El receptor de LHRH es una glicoproteína de 60 kilodaltons. El acoplamiento de LHRH a su receptor induce dimerización y agrupamiento de receptores que posteriormente se internalizan. En los lisosomas ocurre una importante degradación del complejo hormona-receptor y un rápido proceso de reciclaje de receptores hacia la superficie celular (73). La unión hormona-receptor induce una serie compleja de respuestas celulares que dan lugar a la secreción y biosíntesis de las subunidades alfa y beta de LH y FSH, la dimerización de ambas subunidades y la activación de los procesos de glicosilación. Mediadas todas estas

acciones por mecanismos dependientes de calcio e independientes de AMPc (74). La secreción de LHRH a la hipófisis es episódica, resultando esta liberación pulsátil en una secreción igualmente pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias y una respuesta episódica en las células blanco de LH y FSH (75). La cantidad de LH y FSH que es liberada en respuesta a LHRH depende de la edad y del estatus hormonal (65).

3. Hormonas hipofisarias

Las hormonas hipofisarias que controlan las gónadas son la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulante (FSH). Ambas hormonas son secretadas por las mismas células basófilas en la hipófisis por estímulo de LHRH. LH y FSH al igual que la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica (hCG), son glicoproteínas compuestas de dos cadenas polipeptídicas designadas como subunidades alfa y beta. La subunidad alfa de cada una de las cuatro hormonas es idéntica, parece ser así que un único gen codifica para la expresión de esta subunidad, el cual se sabe consta de 92 aminoácidos y dos cadenas laterales de carbohidratos (76). La cadena beta de cada glicoproteína es la que finalmente determina las características inmunológicas y funcionales de cada hormona (77). La subunidad beta de LH y FSH está compuesta de 115 aminoácidos, una cadena lateral de carbohidratos en la LH y dos en la FSH. La subunidad beta de la LH y la hCG son similares, excepto que el extremo carboxilo de la hCG contiene 30 aminoácidos adicionales y más residuos de carbohidratos (77). El peso molecular de LH es aproximadamente de 28,000 y FSH de 33,000, aunque este peso no es exacto por la gran variabilidad de los carbohidratos que constituyen estas moléculas. Los residuos de monosacáridos presentes en ambas gonadotropinas son manosa, galactosa, N-

acetilgalactosamina y ácido siálico. Las diferencias dadas por el tipo y número de carbohidratos en las gonadotropinas son responsables de la variación en los puntos isoeléctricos y en la vida media de las isoformas de estas moléculas. La remoción enzimática del ácido siálico conduce a una disminución de la actividad biológica de la FSH, por reducir su vida media plasmática (78-80). La vida media de la LH se describe con un comportamiento exponencial en dos fases, una inicial de 40 minutos y la segunda de 120 minutos. La hCG por estar más glicosilada, presenta una vida media aún mayor (81). La tasa de depuración metabólica de la LH es de 25 ml/min (82). Sólo una pequeña fracción de la LH secretada aparece en la orina (83). La FSH tiene una vida media con un comportamiento doble exponencial como la LH, y sus vidas medias son de 3.9 y 70 h en cada fase (84). La tasa de depuración de FSH es de 14 ml/min (85).

4. Mecanismo de acción de las gonadotropinas

Las funciones biológicas de LH y FSH son estimular la maduración y función del testículo y el ovario, así como regular la gametogénesis y la esteroidogénesis en las gónadas. Estas funciones son ejercidas a través de uniones específicas con receptores localizados en la membrana plasmática de las células gonadales. La unión hormona-receptor estimula la adenilato ciclasa unida a la membrana, que cataliza la formación de AMPc. La liberación de AMPc al interior citoplásmico es seguida de la unión de éste a la proteína cinasa, la cual se disocia de su subunidad reguladora y en consecuencia activa la subunidad catalítica. La activación de la proteína cinasa actúa mediante pasos intermedios que resultan finalmente en la estimulación de las enzimas responsables de la ruptura de la cadena lateral del colesterol que da lugar a la formación de pregnenolona (P_3). La ruptura del colesterol que constituye

el paso limitante en la esteroidogénesis, conduce de esta manera a un aumento en la síntesis de esteroides sexuales (86).

a. Función testicular de las gonadotropinas

El testículo contiene dos unidades funcionales: una red tubular que consta de células germinales y células de Sertoli, para la producción y transporte de espermatozoides al ducto excretor, y un sistema intersticial constituido por las células de Leydig, las cuales contienen toda la maquinaria enzimática para la producción de andrógenos (75).

En las células de Leydig, la función de la LH es la activación de la esteroidogénesis. En general es aceptado que la LH promueve la síntesis de esteroides en las células de Leydig, en base a cambio mínimo en la producción de AMPc, el cual incrementa la actividad de la proteína cinasa, fosforilación de componentes regulatorios celulares y síntesis de proteínas que modulan la ruta esteroidogénica (65). Al parecer existen receptores en exceso para LH en las células de Leydig, dado que la mayor respuesta fisiológica se produce cuando solo una fracción de estos sitios han sido ocupados (87). La regulación de la biosíntesis de testosterona (T) por LH ocurre en los estadios iniciales de su biosíntesis, principalmente en la conversión de colesterol a P_5 en la mitocondria.

La FSH en el testículo actúa principalmente en la maduración de los tubos seminíferos y la espermatogénesis (65). La presencia de la FSH es necesaria para la iniciación de la espermatogénesis, pero el mantenimiento de esta requiere de la presencia de altas concentraciones intratesticulares de andrógenos. En las células de Sertoli, la FSH se une a su receptor específico y da inicio a una serie de eventos bioquímicos similares a los

producidos por LH (88). En las células de Sertoli se activa la proteína cinasa dependiente de AMPc (89) y se estimula la transcripción y la síntesis proteica, la cual incluye la síntesis de proteínas unidoras de andrógenos (90), así como la activación del complejo de aromatasas que convierte T en estradiol (E_2) (91). La FSH juega además un papel indirecto en la esteroidogénesis, dado que induce la maduración de la células de Leydig durante el desarrollo e incrementa el número de receptores para LH en estas células (92).

b. Función ovárica de las gonadotropinas

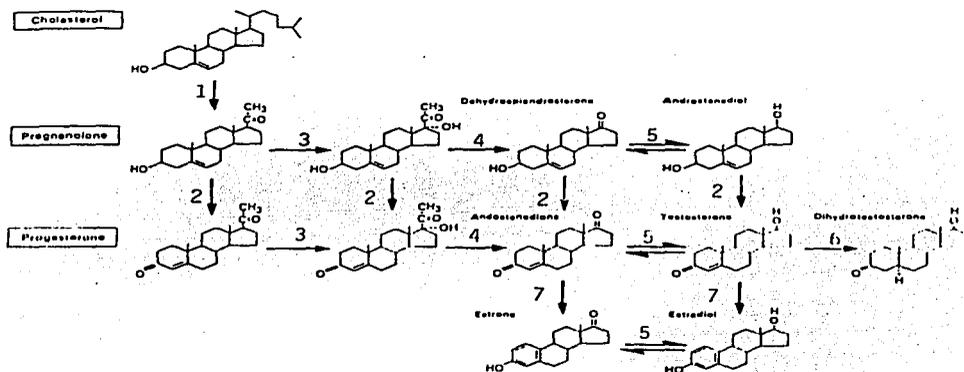
El ovario es una estructura multicompartamental con diferentes y variables propiedades biológicas, que puede ser dividido en dos compartimientos básicos: corteza y médula. La corteza contiene estructuras foliculares en diferentes estados de desarrollo circundadas por el estroma y las células intersticiales. La médula está constituida principalmente por vasos sanguíneos, nervios y fibras musculares (75). Durante el ciclo ovulatorio, un coordinado mecanismo multihormonal da por resultado el desarrollo y liberación de un gameto femenino.

En el ovario, la acción de LH y FSH se lleva a cabo en dos tipos de células foliculares: las células de la granulosa y las de la teca. En ambos tipos celulares LH y FSH activan la esteroidogénesis a través de sus receptores y en consecuencia, vía AMPc y proteína cinasa (93). Los receptores para FSH han sido encontrados únicamente en las células de la granulosa (94). Los receptores para LH se expresan en las células de la granulosa sólo en algunos estadios de maduración (95) y están presentes de manera constitutiva en las células de la teca ovárica (96).

5. Esteroidogénesis gonadal

En los mamíferos existen tres órganos endócrinos especializados en la producción de esteroides: la glándula suprarrenal, el ovario y el testículo. En estadios específicos como el embarazo, la placenta se presenta como la mayor fuente de hormonas esteroides (65). Las rutas bioquímicas y sus complejos enzimáticos son muy similares en todos los tejidos esteroidogénicos. Los esteroides son derivados del colesterol, el cual es producto de la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en forma de lípidos en el organismo; estas reservas se forman por síntesis *de novo* del colesterol o por transferencia de éste a las células a partir del torrente sanguíneo (97). La figura 4 muestra los principales pasos en la biosíntesis de esteroides.

Figura 4.



- 1) 20-esteroide hidroxilasa, 22-esteroide hidroxilasa, 20-22 esteroide deamolasa (P450_{11β})
- 2) 3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa, 3-cetoesteroide Δ⁴,Δ⁵ isomerasa (3β-HSD)
- 3) 17α-esteroide hidroxilasa (P450c17)
- 4) 17,20 esteroide deamolasa (P450c17)
- 5) 17β-hidroxiesteroide dehidrogenasa (17β-HSD)
- 6) 5α-reductasa (5α-RED)
- 7) P450 aromatasa (P450arom)

En las células de Leydig del testículo, el primer paso en la biosíntesis de andrógenos es la ruptura de la cadena lateral del colesterol, este paso lo realiza la enzima que rompe la cadena lateral conocida como P450_{scc}, la cual es en realidad un complejo enzimático asociado a la membrana mitocondrial y que cataliza tres reacciones separadas: 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y la escisión en C20 y C22 del colesterol, estas reacciones son consideradas el paso limitante en la esteroidogénesis (98). La P₃ resultante de la reacción anterior es convertida a progesterona (P₄) por una reacción catalizada por un complejo enzimático microsomal designado como 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 4- Δ 5isomerasa (3 β -HSD), este complejo produce la deshidrogenación e isomerización de esteroides C21 y C19, conectando así las vías denominadas como ruta- Δ 4 y ruta- Δ 5 (99). Los sustratos para esta enzima son además de la P₃, la 17 α -hidroxipregnenolona y la dehidroepiandrosterona (DHEA). La 17 α -hidroxilación de la P₃ o la P₄ que da por resultado la ruptura de las uniones en C17-C20, es catalizada por un complejo enzimático constituido por la 17 α -hidroxilasa citocromo P450 y la 17-20 esteroide desmolasa (P450_{c17}) (98). Esta constituye la reacción clave en la biosíntesis de andrógenos. El paso final en la biosíntesis de andrógenos en el testículo, es la reacción reversible entre la androstendiona (A) y la T por medio de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa testicular ó enzima tipo 3 (17 β -HSD) (100). El derivado activo de la T, la 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT), es formado a partir de T vía la 5 α -reducción que se realiza en muchos órganos blanco de los andrógenos como la próstata y cerebro (101-102).

En el ovario, la ruta metabólica para la formación de estrógenos a partir de colesterol vía la formación de esteroides C21 y C19, es prácticamente la misma que en el testículo (Fig.4). Los estrógenos son producidos por los folículos ováricos por un mecanismo que

interrelaciona las células de la granulosa con las de la teca. La granulosa es dependiente para la formación de estrógenos, de la disponibilidad del precursor principal, la androstendiona y en menor grado de la testosterona, suministrados por la teca (65). El paso final en la biosíntesis de E₂ en el ovario lo realizan la 17β-HSD y la aromatasas. La mayor actividad de 17β-HSD ovárica está dada por la isoforma de la enzima denominada como 17β-HSD tipo I, la cual ha sido asociada principalmente a la fracción citosólica de la granulosa en donde tiene una alta especificidad por estrógenos (103-104). La aromatasas es un complejo enzimático que consta de dos partes: citocromo P450 aromatasas y NADPH citocromo P450 reductasa, así el complejo que denominaremos como P450arom, cataliza la aromatización del anillo A de los andrógenos para la formación de un anillo A fenólico característico de los estrógenos (98).

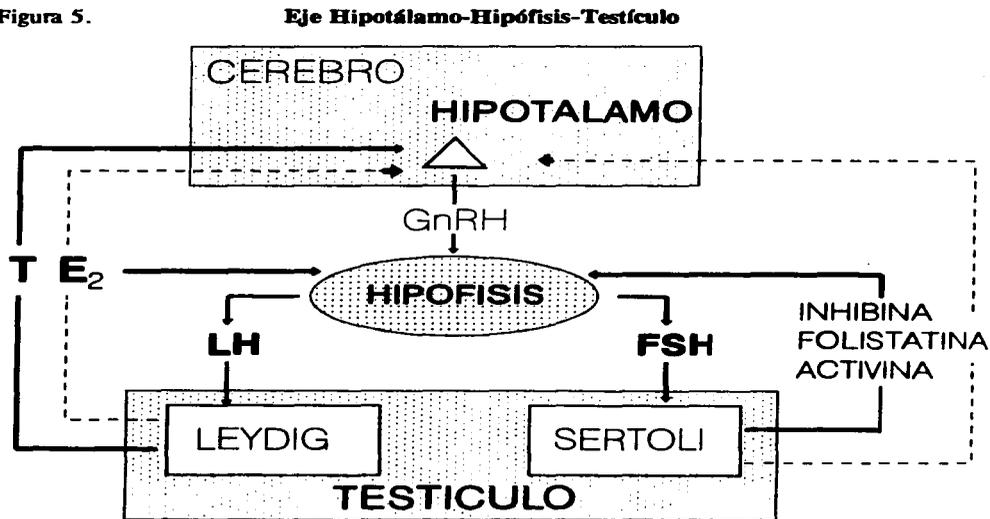
6. Mecanismos regulatorios

Dentro del eje hipotálamo-hipófisis-gónada operan una variedad de sistemas de control que regulan inicialmente la secreción de LH y FSH a partir de los gonadotropos hipofisarios. Estos sistemas incluyen la liberación pulsátil de LHRH de la eminencia media y las señales bioquímicas estimuladoras e inhibitorias provenientes de las gónadas y que actúan sobre la hipófisis y el hipotálamo.

En los mamíferos macho el eje hipotálamo-hipófisis-testículo opera de manera negativa, dado que los niveles normales de esteroides gonadales inhiben la secreción de LH y FSH (Fig.5). Tanto T como E₂ inhiben la secreción de LH. La T puede ser metabolizada a E₂ en el cerebro y la hipófisis, pero las dos hormonas actúan de manera independiente (75). La DHT, que como se mencionó anteriormente es un derivado de la T, es un

andrógeno no aromatizable que también ejerce un efecto negativo sobre la secreción de LH. La T parece tener acción negativa sobre la secreción de LH no sólo a nivel hipotalámico, sino que también a nivel de la glándula hipofisiaria, dado que en pacientes deficientes de LHRH, la administración exógena de T resulta en una disminución de la concentración de LH (105). El control regulatorio de FSH es mediado principalmente por esteroides gonadales a nivel hipotalámico e hipofisiario, sin embargo, existen factores de estructura no esterooidal como inhibina, folistatina y activina, que son péptidos de origen gonadal que participan en el control de la secreción de FSH (106). En modelos animales ha sido demostrada la importante participación de inhibina, ya que ni T, ni E₂ son capaces de inhibir completamente la liberación de FSH (107). Se sabe también que la concentración en suero de FSH aumenta en relación directa con la pérdida de elementos germinales en el testículo (108).

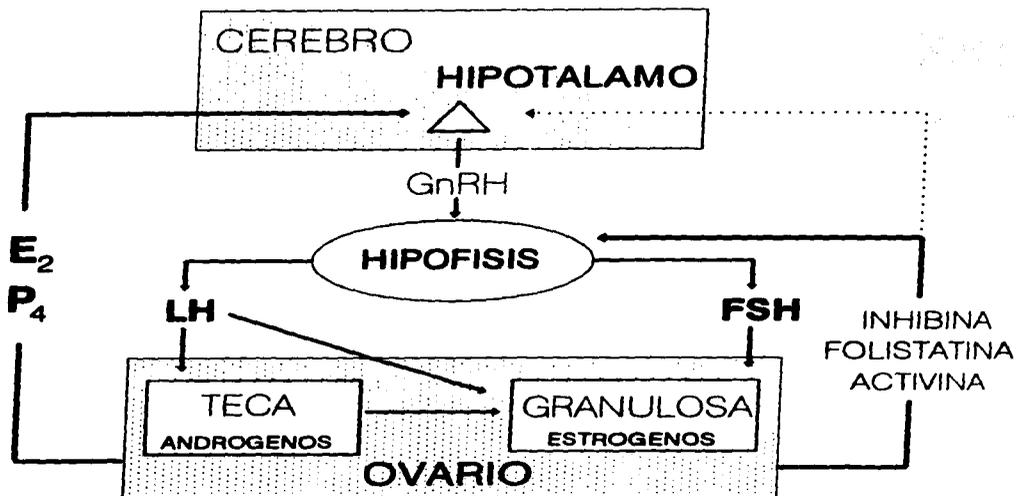
Figura 5.



El control de la función ovárica resulta de un mecanismo complejo de sistemas de retroalimentación denominado eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Fig.6), los cuales involucran hormonas gonadotrópicas hipofisiarias, esteroides y proteínas secretadas por los ovarios (109-110). La fluctuación característica en suero de las hormonas se asocia en los mamíferos hembra al ciclo ovulatorio. Al inicio del ciclo FSH estimula la producción de estrógenos por la granulosa, mientras LH induce la producción de andrógenos en las células de la teca de los pequeños folículos antrales (111-112). Los esteroides producidos así por el ovario pasan al torrente circulatorio e inhiben la liberación de gonadotropinas a nivel hipofisiario. La FSH estimula además la síntesis de inhibina, activina y folistatina en las células de la granulosa (113-115). Se ha demostrado que la inhibina y la folistatina pueden inhibir la síntesis y secreción de FSH en las células hipofisiarias. Por el contrario, la activina estimula la secreción de FSH. Con los estímulos hormonales mencionados algunos folículos se diferencian al estado preovulatorio y producen grandes cantidades de estrógenos. La concentración de E_2 alcanza su nivel máximo en esta fase, llegando al umbral que estimula la liberación de un pulso de LH de la hipófisis, constituyendo este el único efecto de retroalimentación positivo de E_2 . La ovulación es disparada cuando el folículo preovulatorio es expuesto al pulso de LH. Posteriormente las células foliculares de la teca y la granulosa sufren profundos cambios morfológicos y bioquímicos (116), en un proceso denominado luteinización que culmina con la formación del cuerpo luteo. En este período la granulosa adquiere la maquinaria biosintética para la producción de grandes cantidades de P_4 . Si no hay fertilización el cuerpo luteo es reemplazado por tejido fibroso. En este momento otros folículos primarios inician su crecimiento y maduración, iniciando un nuevo ciclo.

Figura 6.

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario



7. Ciclo estral

Muchos de los conocimientos que hoy en día tenemos acerca del ciclo ovárico de los mamíferos de ovulación espontánea, se basan en estudios realizados en el ciclo estral de la rata. El período de tiempo en que las hembras aceptan a los machos para copular se conoce como período de celo o estro. El ciclo estral comprende el período de tiempo entre un período de estro y el siguiente, en la rata la duración del ciclo es de 4 ó 5 días (117). Los primeros 2 ó 3 días corresponden a los períodos conocidos como diestro 1 (D1) y diestro 2 (D2) respectivamente, este período preovulatorio se caracteriza por bajos niveles de

gonadotropinas , crecimiento folicular y aumento progresivo en la secreción de estrógenos; el siguiente período se conoce como proestro (P), en esta etapa los folículos han alcanzado la etapa preovulatoria y el E2 llega a su máximo, disparando la liberación de LHRH y la liberación hipofisiaria de un pulso de LH, el cual da por resultado liberación del óvulo durante el período siguiente denominado estro (E) (117).

Las diferentes etapas del ciclo estral pueden ser monitoreadas por medio del estudio de los cambios del epitelio vaginal. En el frotis vaginal pueden ser observados uno ó más tipos celulares, y será el tipo celular predominante el que indique la etapa del ciclo estral en la que se encuentre la rata. Los tipos celulares que pueden ser observados en un frotis vaginal de rata son: células epiteliales nucleadas, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales superficiales o escamas. En la rata intacta se pueden observar las siguientes características: durante el D1, se observan leucocitos y células nucleadas, en el D2 en el frotis vaginal muestra abundancia de leucocitos, en el estadio de P se presenta predominancia de células nucleadas y finalmente en el E la citología vaginal muestra abundancia de escamas (117).

JUSTIFICACION

El balanceado y eficiente funcionamiento del sistema endócrino es esencial para la realización normal de los procesos reproductivos. Alteraciones a cualquier nivel dentro de los mecanismos endócrinos regulatorios traen como consecuencia serios trastornos que afectan no sólo la capacidad de reproducción, sino que también la conducta de las personas. Por tal motivo es de suma importancia recabar la máxima información posible acerca de los cambios endócrinos que se presentan en aquellos padecimientos en que se ve alterada la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, como en el caso del síndrome nefrótico, en el cual a pesar de que es ya conocida la existencia de anormalidades que afectan el eje tiroideo, y que la experiencia médica indica que se altera la función reproductiva, estas alteraciones no han sido documentadas. El estudio de los cambios endócrinos en este tipo de enfermedades permitirá avanzar en el conocimiento de los complejos mecanismos de control homeostático y establecer un mejor manejo terapéutico del paciente.

OBJETIVO

Estudiar las alteraciones que sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se presentan en el síndrome nefrótico de la rata.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Establecer el perfil endócrino reproductivo de la rata con SN en fase aguda.**
- 2.- Estudiar en la fase aguda del SN, los efectos de los cambios endócrinos sobre la capacidad reproductiva, los sitios disponibles del receptor de andrógenos (RA) y el peso de los tejidos andrógeno dependientes en la rata macho, así como sobre el ciclo estral en la rata hembra.**
- 3.- Estudiar de manera secuencial durante la instalación del SN, los cambios en el perfil endócrino reproductivo, en el peso de los tejidos andrógeno dependientes y en el ciclo estral.**
- 4.- Establecer el perfil endócrino reproductivo de la rata con SN en su fase de remisión.**
- 5.- Evaluar en la fase de remisión, la capacidad reproductiva, el peso de los tejidos andrógeno dependientes y el ciclo estral.**

MATERIALES Y METODOS

Reactivos:

El aminonucleosido de puromicina (ANP), se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El yodo radioactivo (^{125}I , $ae=80-100 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) y [$^{17}\alpha$ -metil- ^3H]dimetilnortestosterona (DMNT, $ae=89 \text{ Ci}/\text{mmol}$) se compraron a Amersham International (Londres, UK). La $7\alpha,17\alpha$ -dimetil-17 β -hidroxi-4-estren-3-ona (DMNT radioinerte) se adquirió de Steraloids Inc. (NY). Los demás reactivos fueron grado reactivo.

Animales:

Se emplearon ratas macho y hembra Wistar, adultas de 200-300 g de peso, mantenidas en ciclos de 14 h luz y 10 h oscuridad, con agua y comida ad libitum. El SN se les indujo inyectando una única dosis, vía SC, de ANP 15 mg/ 100 g de peso (día 0). Los grupos de ratas para cada fase fueron de 8 animales controles y 8 nefróticos. Para la evaluación de la capacidad reproductiva sólo se emplearon ratas intactas que presentaron 3 o más ciclos estrales de 4 días, así como machos con fertilidad probada.

Diseño Experimental:

El estudio se diseñó para explorar las alteraciones endócrinas reproductivas en las fases aguda y de remisión de la enfermedad, para ello se tomó como base los reportes de la literatura (26) que indican que el síndrome inducido por ANP en la rata se establece entre los días 7-10 y revierte de manera espontánea en los 30 días posteriores a la administración del ANP, por lo que consideramos al día 10 como fase

aguda del padecimiento y el día 30 como fase de remisión.

El protocolo experimental se dividió en 6 etapas, en cada una de las cuales se valoró el estado nefrótico en base a las características de proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia.

Etapas 1. Rata macho, fase aguda (día 10).

Para alcanzar parte de los objetivos 1 y 2, en esta etapa el estudio tuvo como fin establecer el perfil endócrino reproductivo en la rata macho en base a las cuantificaciones en suero de las siguientes hormonas: LH, FSH, PRL, Tt, Tl, E₂, P₄, y A, así como la determinación de los sitios disponibles del RA y los pesos de los tejidos andrógeno dependientes como próstata ventral y vesícula seminal.

Etapas 2. Rata macho, secuencial (días 3, 7, 10).

Para alcanzar parte del objetivo 3, en esta etapa se evaluaron los cambios endócrinos en la rata macho, en el período de tiempo en que se instala el síndrome agudo. Se cuantificó para ello un perfil hormonal que comprendió de LH, FSH, Tt, Tl y E₂ en suero, así como de T en orina (To). También se registró el peso de los tejidos andrógeno dependientes y el peso corporal de los animales.

Etapas 3. Rata hembra, fase aguda (día 10).

Para complementar los objetivos 1 y 2 del estudio, en esta etapa el estudio tuvo como fin establecer el perfil endócrino reproductivo en la rata hembra en base a las cuantificaciones en suero de las siguientes hormonas: LH, FSH, PRL, E₂, y P₄. En

esta etapa se evaluó también el estado del ovario mediante un estudio histológico del mismo.

Etapa 4. Rata hembra, secuencial (días 1, 3, 7, 10).

Para completar el objetivo 3 del estudio, en esta etapa se evaluaron los cambios endócrinos en la rata hembra, en el período de tiempo en que se instala el síndrome agudo. Se cuantificó para ello un perfil hormonal que comprendió de LH, FSH, P₄ y E₂ en suero, y se monitoreó diariamente el ciclo estral.

Etapa 5. Rata macho y hembra, fase de remisión (día 30).

Para alcanzar el objetivo 4 del estudio, se cuantificaron en la fase de remisión las concentraciones de LH y Tt en la rata macho, y de LH y E₂ en la rata hembra, teniendo como parámetro control grupos para evaluación hormonal en el día 10. También se realizó en esta etapa, el registro de los pesos de los tejidos andrógeno dependientes y el monitoreo del ciclo estral.

Etapa 6. Rata macho y hembra, capacidad reproductiva en las fases aguda y de remisión.

Para alcanzar el objetivo 5 del estudio, en esta etapa se procedió a realizar montas entre los animales nefróticos de ambos sexos en fase aguda y de remisión, con hembras y machos respectivamente, por períodos de 4 días consecutivos. En fase aguda la monta se realizó entre el día 7-10, y en la fase de remisión entre el día 30-33. En caso de fertilización positiva, el embarazo se dejó progresar para recabar información sobre las camadas, principalmente número de crías, sexo y peso al destete.

Monitoreo del ciclo estral:

Los ciclos ováricos fueron monitoreados basados en el examen diario por frotis vaginales de cada rata, considerando que el ciclo estral de la rata ocurre cada 4 días en patrones que comprenden 4 etapas diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P), y estro (E) (117).

Toma de muestras:

En los días referidos en las etapas a realizar se sacrificaron ratas por decapitación y se tomaron muestras de suero, las cuales se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Se colectaron muestras de orina de 24 h, en esos mismos días. En los casos necesarios se procedió a tomar muestras de tejidos, en la rata macho: próstata ventral y vesícula seminal, también se registró el peso corporal de cada uno de los animales.

Cuantificaciones:

Las mediciones bioquímicas realizadas fueron las siguientes: en suero, colesterol, albúmina y proteínas totales por método colorimétrico (26, 28), y en orina proteínas totales por método colorimétrico (26).

Las hormonas protéicas cuantificadas fueron: LH, FSH y PRL. La medición se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) con separación por segundo anticuerpo con reactivos donados por Los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH, NIADDK, Bethesda, MD), utilizando como estándares las preparaciones internacionales LH-RP-3, FSH-RP-2 y PRL-RP-2. Los coeficientes de variación intra-

e inter-análisis fueron de 5.1 % y 6.5 % para LH, 4% y 7.9% para FSH y de 3% y 8.2% para PRL.

Los esteroides P_4 , E_2 , A, Tt y TI en suero y Tt en orina, se cuantificaron por RIAs en fase sólida comprados a Diagnostic Product Corporation (Los Angeles, CA). Las variaciones intra- e inter-análisis fueron de 2.0% y 5.4% para P_4 , 6.1% y 7.4% para E_2 , 4.1% y 6.0% para A, 4.4% y 8.2% para Tt, y de 3.4% y 5.9% para TI.

Los sitios disponibles del RA fueron determinados por ensayo de unión en los tejidos andrógeno dependientes: próstata ventral y vesícula seminal, así como en tejidos sensibles a los andrógenos como: riñón, glándula de Harder, hipófisis e hipotálamo. El ensayo de unión se realizó empleando extractos citosólicos de los tejidos y como trazador a la $^3\text{HDMNT}$ y un exceso de 200 veces del esteroide radioinerte.

Examen Histológico

Los ovarios de las ratas nefróticas y las controles fueron fijados en solución de Karnovsky's (118), posteriormente fijados con OsO_4 al 1% en buffer Zetterkvist (119), y finalmente embebidos en Epon. El tejido se seccionó en cortes de $1 \mu\text{m}$ y se tiñó con azul de toluidina al 1 %.

Análisis Estadístico

Se empleó la prueba de "t" de Student no pareada para comparar los datos que presentaran una distribución normal, en caso contrario se empleó la "U" de Mann-Whitney, considerando como significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados se presentan siguiendo el orden de las etapas realizadas en el estudio:

Etapa 1. Rata macho, fase aguda. La tabla 1 muestra los resultados de las determinaciones bioquímicas realizadas el día 10 del SN. Se observa una disminución significativa en la concentración de proteínas y un aumento del colesterol en suero; las proteínas en orina aumentan significativamente respecto del control.

Tabla 1.

Datos Bioquímicos en la rata macho nefrótica

Día 10

	Suero			Orina
	Albúmina	Prot. T	Colesterol	Prot. T
	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/vol
Control	\bar{X} 3.6	8.6	73	5.7
	DS 0.26	1.04	17	2.19
	n 10	10	10	9
Nefrótica	\bar{X} * 1.60	* 5.77	* 330	* 494
	DS 0.23	0.43	69	205
	n 11	10	10	9

* p < 0.05

El perfil endócrino reproductivo de la rata macho con SN en fase aguda se presenta en la tabla 2. los resultados muestran una baja significativa de ambas gonadotropinas LH y FSH, así como de T tanto libre como total, las concentraciones de A, también disminuyeron y particularmente el E₂ bajó a niveles menores a la sensibilidad del RIA. No se observaron cambios significativos en las concentraciones de PRL y P₄ respecto del grupo control. El peso corporal de las ratas nefróticas disminuyó durante el período de estudio a pesar de la presencia de líquido de ascitis en estos animales llegó en algunos casos a superar los 60 ml.

Tabla 2.

Cambios Endócrinos en el SN de la Rata Macho

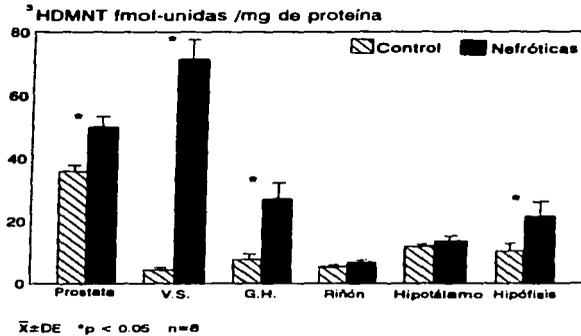
Día 10

GP	Peso g	LH ng/ml	PRL ng/ml	FSH ng/ml	Tt ng/ml	TI pg/ml	E2 pg/ml	P4 ng/ml	A ng/ml	n
C	303 ± 42	2,63 ±0.94	2,64 ±0.84	3,55 ±1.15	2,49 ±1.21	15,9 ±7.7	20,23 ±6.3	3,75 ±3.3	1,46 ±0.82	10
N	245 ± 37	* 1,00 ±0.93	2,95 ±0.97	* 0,40 ±0.39	* 0,07 ±0.09	* 0,44 ±0.48	* N.D.	1,75 ±1.67	* 0,37 ±0.19	10

$\bar{X} \pm DS$ N.D. = no detectable * p < 0.05

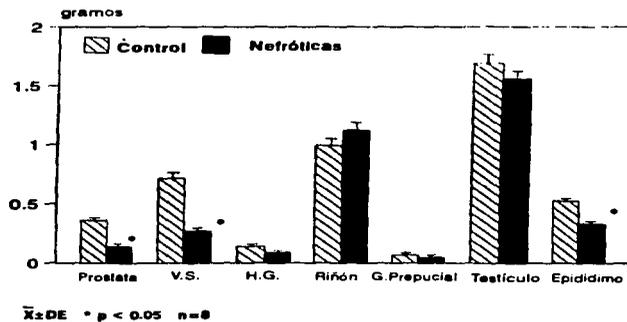
El efecto de los cambios endócrinos sobre el RA en la fase aguda del síndrome inducido en la rata macho se presenta en la figura 7. Se puede observar un aumento en el número de sitios disponibles para andrógenos en próstata, vesícula seminal, glándula de Harder e hipófisis. El riñón y el hipotálamo no presentaron cambio alguno.

Figura 7.



El efecto de los cambios endócrinos sobre el peso de los tejidos andrógeno dependientes y andrógeno sensibles se muestran en la figura 8. Se ven afectados únicamente los pesos de los tejidos andrógeno dependientes y el epidídimo, provenientes de animales nefróticos.

Figura 8.



Epata 2. Rata macho, secuencial. El estudio realizado en los días 3, 7 y 10 posteriores a la administración del ANP a ratas macho, aportó los siguientes resultados: la tabla 3 contiene los datos bioquímicos de manera secuencial, en ella se observa como la instalación del síndrome se dá entre los días 7 al 10 como lo reporta la literatura, con las características de disminución en las concentraciones de proteínas totales y albúmina, y un aumento en la concentración en suero de colesterol. En orina es también claro el aumento de proteínas totales entre el día 7 y 10.

Tabla 3.

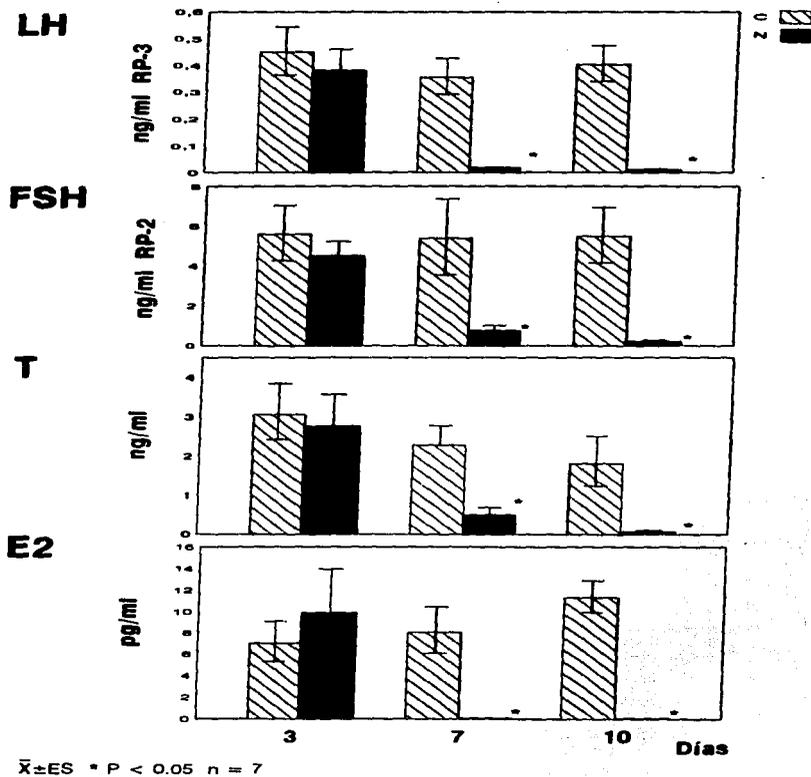
Determinaciones Bioquímicas en suero y orina de ratas macho control (C) y nefróticas (N).

Días		Proteínas Totales g/dl	Colesterol mg/dl	Albúmina g/dl	Proteínas en Orina mg/24h	n
3	C	7.3±0.2	56.3± 3	3.2± 0.1	15.3± 2	3
	N	5.9±0.4	80.4± 7	3.4± 0.2	27.7± 4	7
7	C	7.7±0.2	76.6± 4	3.4± 0.1	24.9± 4	3
	N	* 4.4±0.1	* 357.0± 21	* 1.4± 0.06	* 570.0± 44	7
10	C	* 8.3±0.4	* 62.2± 7	* 3.1± 0.08	* 29.8± 7	3
	N	5.0±0.1	324.0±16	1.2± 0.03	410.0± 56	9

$\bar{X} \pm ES$ * P < 0.05

El perfil endócrino estudiado secuencialmente se presenta en la figura 9, como puede verse existe una disminución significativa a partir del día 7 en las concentraciones de todas las hormonas evaluadas.

Figura 9.



Los cambios registrados durante el estudio secuencial en los pesos de los tejidos andrógono dependientes se presentan en las figuras 10 y 11. Tanto el peso de la próstata como el de la vesícula seminal se ven significativamente disminuidos prácticamente durante todo el estudio.

Figura 10.

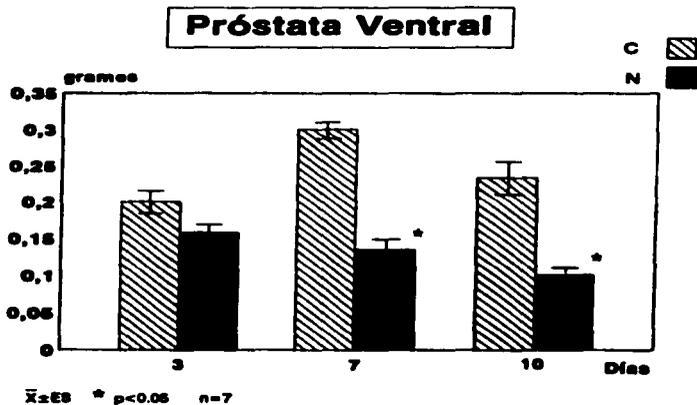
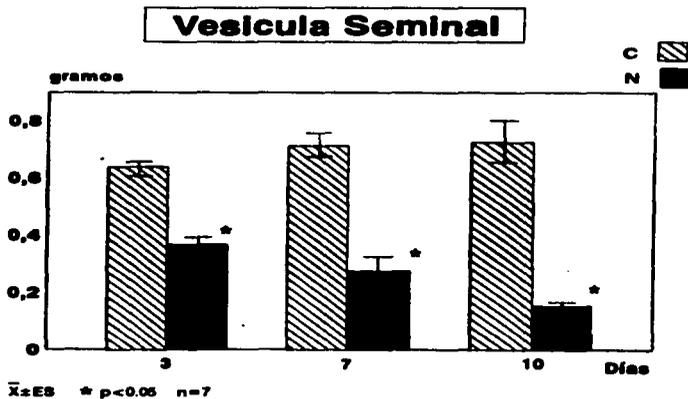
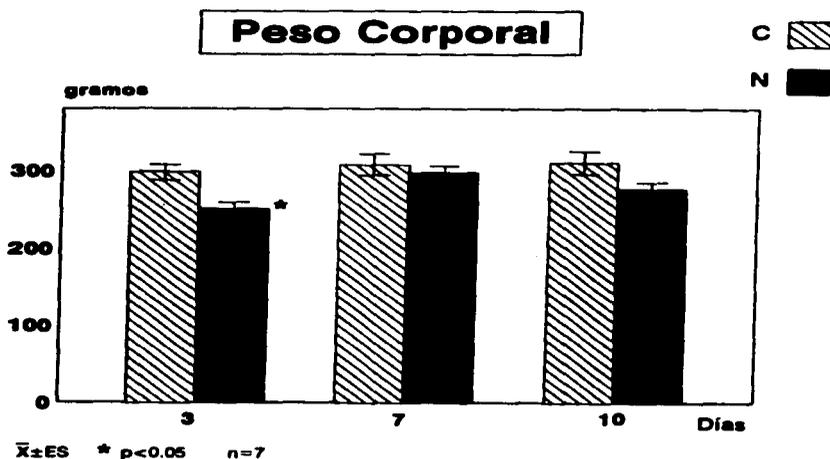


Figura 11.



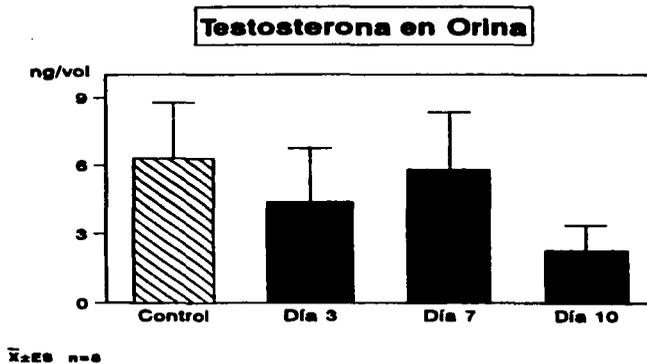
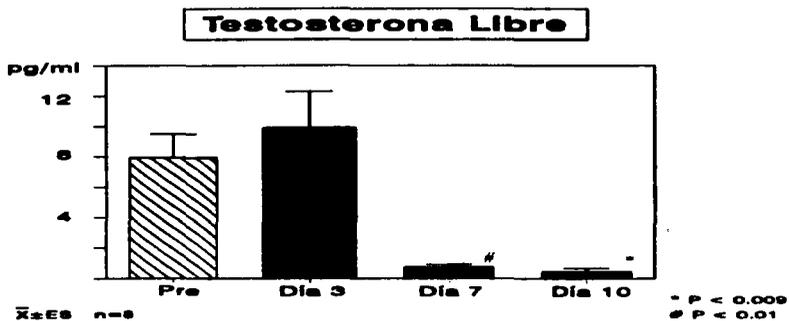
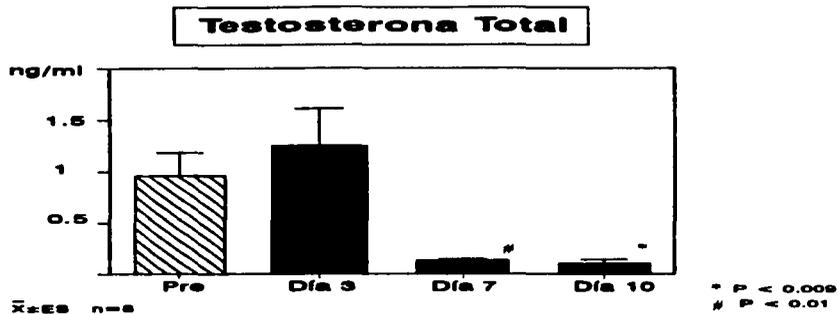
El registro secuencial de peso corporal en los días 3, 7 y 10, se muestra en la figura 12. No se observan cambios importantes en el peso corporal de los animales nefróticos, excepto en el día 3, sin embargo debemos hacer notar que estos animales presentaban abundancia de líquido de ascitis (volumen promedio recuperado de 35 ml).

Figra 12.



Los resultados de la evaluación secuencial de la T en sus fracciones total y libre en suero, así como su presencia en orina, se presenta en la figura 13. Los resultados muestran una disminución paralela de Tt y de Tl, las cuales están significativamente disminuidas en los días 7 y 10. La concentración de testosterona en orina no presentó cambios significativos a lo largo del estudio aunque mostró una tendencia a la baja en el día 10.

Figura 13.



Etapa 3. Rata hembra, fase aguda. El perfil endócrino reproductivo evaluado en el día 10 posterior a la administración del ANP se muestra en la tabla 4. Los resultados indican una disminución significativa de LH y P₄, así como una extraordinaria disminución de E₂ a niveles indetectables al realizar las comparaciones con los datos de nuestros controles, sin embargo cuando se comparan los valores de las ratas nefróticas con los reportados como normales en la fase de D en las que se estacionan las ratas, solamente el E₂ resulta estar fuera de estos límites, llegando a niveles indetectables.

Tabla 4.

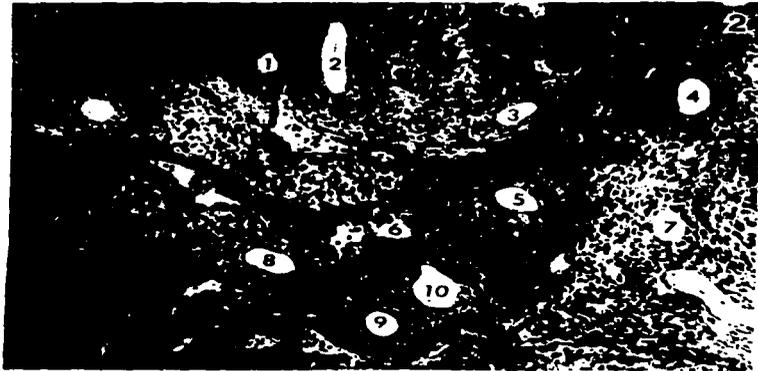
Perfil Endócrino de la rata hembra.

Día 10								
Grupo	Peso g	Fases Ciclo	LH ng/ml	FSH ng/ml	PRL ng/ml	P4 ng/ml	E2 pg/ml	n
C	249±17	PEDD	4.8± 1	5.0±1.7	26.5±20	16.8±3	28.6±7	17
N	241±19	DDDD	* 0.4±0.1	3.6±1.2	17.0± 6	* 6.4±1	* N.D.	15
C	Valores normales en fase D		0.2-1	2.2-6	10-30	3-28	20-45	

N= nefróticas C= controles D= diestro P= Proestro E= Estro
 X±SEM N.D.= no detectable * p<0.05

La figura 14 muestra los resultados del estudio histológico del ovario, el panel 1 presenta un corte de ovario control, en el se observan folículos en diferentes estadios de desarrollo (af= folículos antrales y aa= folículos atrésicos), en el panel 2 se muestra un corte de ovario de rata en estado nefrótico, en el se observan exclusivamente folículos atrésicos.

Figura 14.



Etapa 4. Rata hembra, secuencial. Los resultados de la evaluación bioquímica en los días 1, 3, 7 y 10 posteriores a la administración del ANP se presentan en la tabla 5. Los datos indican que las concentraciones de proteínas totales disminuyen significativamente entre los días 7 y 10, en este mismo período las concentraciones de colesterol aumentaron en suero. Las cuantificaciones de proteínas en orina indican un aumento significativo a partir del día 3, que llega a ser de hasta 9,000 % entre los días 7 y 10.

Tabla 5.

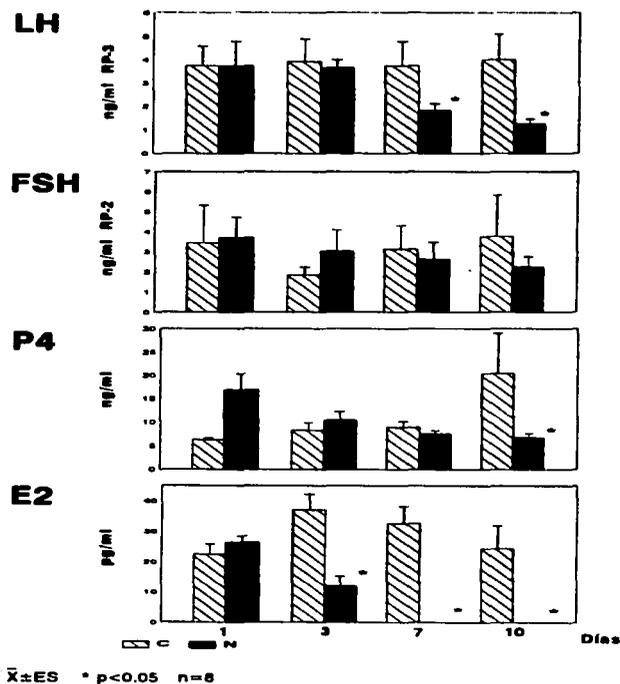
Determinaciones Bioquímicas en suero y orina de ratas control (c) y nefróticas (N).

Día		Proteínas Totales g/dl	Colesterol mg/dl	Proteínas en orina mg/24h	N
1	C	9.5±0.2	69.5± 18	5.9± 1	3
	N	9.2±0.1	84.5± 3	4.7± 1	8
3	C	9.4±0.4	77.0± 2	7.2± 2	3
	N	7.5±0.2	83.0± 6	* 22.0± 3	8
7	C	10.4±0.2	103.0± 4	* 4.7± 0.4	3
	N	* 5.7±0.1	* 364.0± 51	* 392.0± 33	8
10	C	9.3±0.4	* 62.5± 2	* 6.3± 2	3
	N	* 6.7±0.2	* 309.0± 33	* 576.0± 49	8

$\bar{x} \pm ES$ * P < 0.05

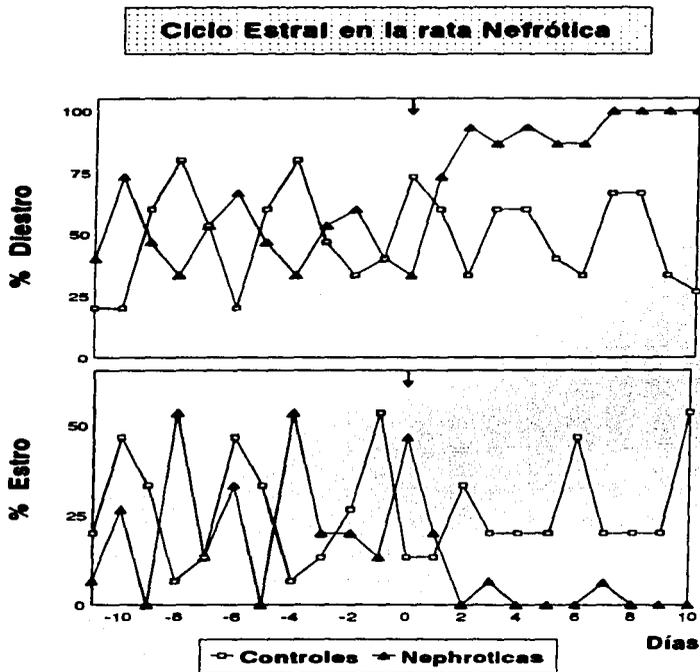
El perfil endócrino reproductivo estimado secuencialmente en la rata hembra se muestra en la figura 15. Las concentraciones de LH disminuyeron significativamente en los días 7 y 10, mientras la FSH no presentó cambio respecto de los grupos control a lo largo del estudio. Los valores de P_4 disminuyeron moderadamente en los primeros días hasta presentar una diferencia significativa en el día 10 del estudio. El E_2 bajó significativamente desde el día 3 llegando a niveles indetectables en los días 7 y 10.

Figura 15.



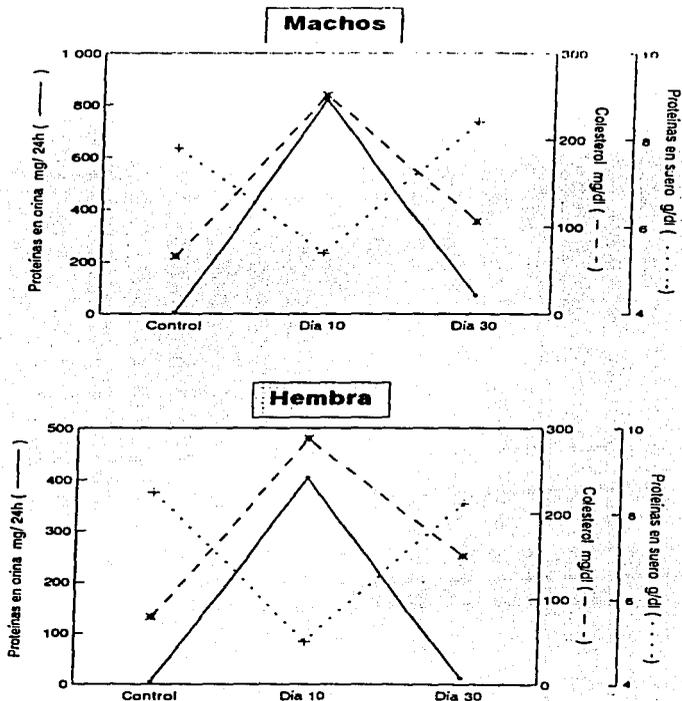
La figura 16 muestra el patrón diario del ciclo estral del estudio secuencial de 10 días. Se observa claramente la pérdida del ciclo a partir de los primeros cuatro días posteriores a la administración del ANP. Los animales se estacionan en la fase de D y no presentan E en la fase aguda.

Figura 16.



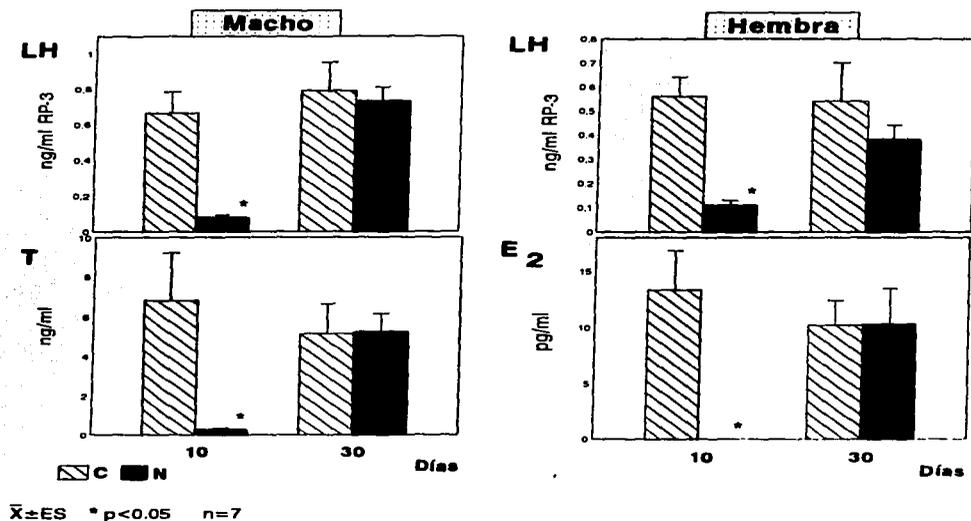
Etapa 5. Rata macho y hembra, fase de remisión. La figura 17 muestra los resultados de las cuantificaciones bioquímicas tanto de animales controles como de nefróticos en las fases aguda y de remisión. Estos resultados muestran la existencia de reversibilidad en el día 30 de las alteraciones en los valores de proteínas y colesterol en suero, así como de proteínas en orina.

Figura 17.



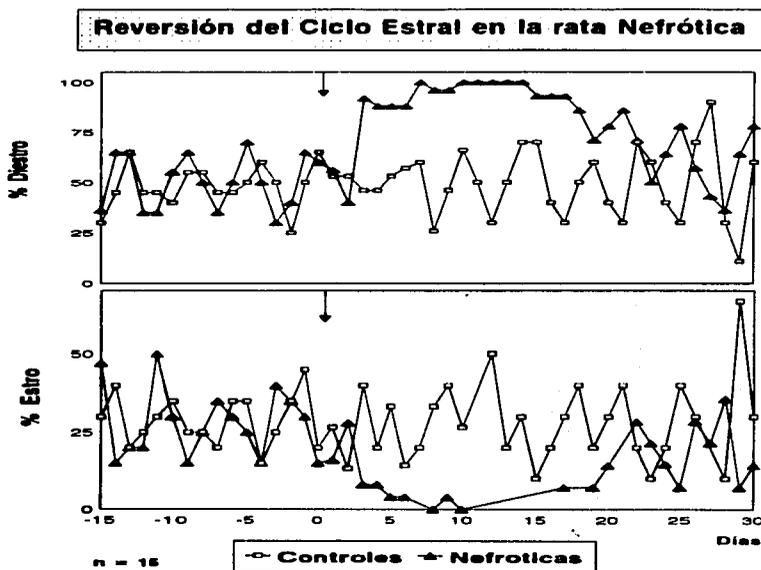
En esta etapa del estudio se realizaron mediciones en fase de remisión de animales nefróticos teniendo como control animales nefróticos en fase aguda. La figura 18 muestra los resultados obtenidos, se puede observar una clara reversión en los valores de LH y T en la rata macho, así como de LH y E₂ en la rata hembra hacia el día 30 del estudio.

Figura 18.



Para detectar cambios en el ciclo estral en las dos fases del padecimiento se monitoreó el ciclo durante 15 días previos a la administración del ANP y por los 30 días restantes. En la figura 19 se muestran los resultados del seguimiento del ciclo durante el estudio, se observa en este patrón una pérdida pasajera de ciclicidad de alrededor de 20 días, después de lo cual los animales comienzan nuevamente a tener ciclos regulares de 4 días.

Figura 19.



Etapa 6. Rata macho y hembra, capacidad reproductiva en las fases aguda y de remisión. La tabla 6 muestra los resultados de la evaluación de la capacidad reproductiva medida en base a la tasa de fertilidad (número de animales en la monta / número de preñados) que se expresa también como porcentaje de fertilización de ratas nefróticas de ambos sexos. Se puede observar en base a estos valores que durante la fase aguda del síndrome, el porcentaje de fertilidad disminuyó a cero en la hembra y a 37 en el macho, y que este porcentaje se reestablece a lo normal en la fase de remisión. La tabla muestra además el número de productos promedio por camada, el porcentaje de sexo y el peso al destete en las camadas, todos estos valores fueron similares en todas las camadas.

Tabla 6.

Capacidad Reproductiva en la rata Nefrótica

		Tasa de Fertilidad	Fertilidad %	Productos ^a n	Sexo F M	Peso ^{a,b} g	
Hembra	día 10	Controles	4/4	100	11±2	51 49	60±6
		Nefróticas	0/5	0	---	-- --	---
	día 30	Controles	4/4	100	10±1	56 43	57±7
		Nefróticas	5/5	100	12±1.8	58 42	57±6
Macho	día 10	Controles	8/9	89	9±3	44 56	60±6
		Nefróticas	6/16	37	8.5±4	41 59	60±6
	día 30	Controles	6/6	100	11±4	48 51	58±7
		Nefróticas	5/6	83	9.5±4	59 40	55±10

^a = $\bar{x} \pm DS$ ^b = peso 21 días después de nacidos

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio establecen la existencia de alteraciones endócrinas en la rata con SN inducido por ANP. Estas alteraciones afectan claramente la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en las ratas de ambos sexos.

En la etapa inicial del estudio, previa caracterización del SN en la rata macho en base a la presencia de proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia, el perfil hormonal evaluado indicó que en la fase aguda del SN la rata macho desarrolla hipogonadismo hipogonadotrópico manifestado por disminución significativa en las concentraciones circulantes de las gonadotropinas LH y FSH, así como de esteroides sexuales tales como A, Tt, Tl y E₂. La pérdida de andrógenos se reflejó en una disminución del peso de los tejidos andrógeno dependientes, condición que no afectó a tejidos como riñón, glándula prepucial, glándula de Harder y testículo. Es probable que el testículo no se haya afectado por la duración tan corta en la instauración de la fase aguda del síndrome. También se encontró un aumento de los sitios de unión disponibles del RA tanto en próstata como en vesícula seminal, e interesantemente encontramos un aumento del RA en la hipófisis. Este aumento de sitios de unión del RA en la hipófisis pudiera apoyar la teoría expuesta por Glass y cols. (41) que propone la existencia de hipersensibilidad hipotalámica-hipofisiaria a los andrógenos como causa del hipogonadismo en el SN de la rata, condición que también ha sido sugerida en padecimientos multisistémicos como la diabetes, como causante de la falla en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en este padecimiento (1). La concentración de P₄ tuvo tendencia a la baja en el día 10, esta disminución pudiera indicarnos una alteración generalizada sobre toda la ruta metabólica de biosíntesis de esteroides, que pudiera iniciarse con una falla en la

activación de la enzima P450_{cc} mediada por LH, que conduciría a una falta de disponibilidad de sustratos para la síntesis de andrógenos.

Aunque el SN tiene similitudes con la insuficiencia renal crónica, observamos una clara diferencia respecto del control sobre la secreción de PRL, la cual en nuestro modelo no presentó cambio alguno, mientras en la insuficiencia renal crónica es característica la hiperprolactinemia (120).

Para definir los cambios cronológicos del patrón hormonal, en la etapa 2 del estudio se analizaron las concentraciones de gonadotropinas y de esteroides sexuales durante la instalación de la fase aguda del SN en la rata macho. Las mediciones bioquímicas indican que tal como se ha reportado en la literatura el síndrome se presenta entre los días 7 y 10 después de la administración del ANP, no encontramos alteración significativa en las concentraciones de colesterol y proteínas en suero y orina en el día 3, aunque se denota una tendencia hacia la proteinuria, hipercolesterolemia e hipoproteinemia. De igual forma el perfil hormonal no mostró cambio significativo, sino una tendencia a la baja en las concentraciones de LH, FSH, T y E₂ en el día 3, indicando que las alteraciones hormonales se presentan en forma paralela a la instauración de SN. Todas las hormonas medidas disminuyeron significativamente en los días 7 y 10. El peso de la próstata y la vesícula analizados de manera secuencial muestran una disminución progresiva a lo largo del estudio, la cual en la vesícula se detecta significativamente desde el día 3, indicando que la disponibilidad y actividad de los andrógenos se altera desde etapas muy tempranas del padecimiento. Con objeto de analizar si la falla en la actividad androgénica en los tejidos

andrógeno dependientes ó la supuesta hipersensibilidad hipofisiaria a T, se debía a un aumento en la fracción libre de T y por consiguiente un aumento en su depuración urinaria, en el presente trabajo se realizaron las mediciones correspondientes, las cuales muestran que no existe un incremento en la fracción libre de T, la cual podría haber estado aumentada por la pérdida de la proteína transportadora de andrógenos (ABP) dada la magnitud de la proteinuria en el estado nefrótico, sin embargo tanto la TI como la urinaria disminuyen en la fase aguda. El peso corporal de los animales nefróticos no es contundente puesto que la presencia de líquido de ascitis impide la valoración real de este parámetro. El conjunto de datos aportados en el modelo de la rata macho con SN, nos permiten aseverar que existe un daño hipofisiario-gonadal que no excluye la participación del hipotálamo, y que sugiere alteraciones en la liberación de gonadotropinas hipofisarias, así como en la ruptura de la cadena lateral del colesterol ó de la esteroidogénesis misma por falta de cofactores para las enzimas tales como zinc, fierro, cobre y magnesio, que se sabe se pierden en la fase aguda del SN (41).

EL estudio de las alteraciones endócrinas en la rata hembra con SN indica que existe daño en la función hipofisiaria-ovárica en estos animales durante la fase aguda del síndrome. En el día 10 posterior a la administración del ANP, fue clara la ausencia de cambios cíclicos en el epitelio vaginal de las ratas nefróticas, reflejando una pérdida del ciclo estral al mismo tiempo que el patrón hormonal presentó valores disminuidos para LH y P₄, e indetectables para E₂. Las concentraciones de FSH y PRL tuvieron sólo una ligera disminución. Debemos hacer notar que todos estos cambios en las concentraciones hormonales resultaron de la comparación entre los grupos de ratas nefróticas y los controles, pero si se toma en cuenta

el intervalo normal reportado para la fase D del ciclo, en la cual se estacionan las ratas nefróticas, solamente el E_2 se encuentra fuera del intervalo normal. El estudio histológico del ovario muestra atresia folicular masiva en las ratas tratadas con ANP, lo cual puede explicar la ausencia de E_2 en la fase aguda, dado que esta bien establecido que las células foliculares son la fuente principal de este esteroide (117). El estudio cronológico de los cambios endócrinos en la rata hembra con SN mostró un comportamiento similar al de los machos respecto a la instauración del SN, con las características de proteinuria, hipoproteinemia e hiperlipidemia entre los días 7 y 10. El perfil hormonal determinado de manera secuencial muestra discrepancia entre las gonadotropinas LH y FSH, mientras LH presenta una disminución significativa en los días 7 y 10, FSH no tiene cambios, esto puede explicarse por el distinto mecanismo regulatorio que opera para ambas hormonas (121). Sin embargo la drástica caída de las concentraciones de E_2 a partir del día 3, aún con niveles normales de LH, señala una falla en la activación de la esteroidogénesis mediada por LH vía receptores membranales de las células de la teca ovárica. La posterior baja en los niveles de LH paralela a la progresiva disminución de E_2 nos indica una pérdida de la función hipotalámica-hipofisaria en este síndrome, la cual puede deberse a un daño en el patrón de secreción pulsátil de LH, así como a la pérdida de los mecanismo de retroalimentación positiva del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. No obstante, no se puede descartar como factor responsable de estas alteraciones, una posible falla en los mecanismos de liberación de LHRH hipotalámica. La lenta disminución de P_4 a lo largo del estudio puede ser interpretada de acuerdo a la literatura, como un producto residual liberado por cuerpos luteos de ciclos anteriores (117).

El SN es un padecimiento que como se mencionó anteriormente presenta remisiones y recaídas frecuentes, por lo que el presente protocolo exploró la posible reversibilidad de las alteraciones endócrinas encontradas en la fase aguda. Los datos aportados en el estudio corroboran la información reportada en la literatura que indica que las características bioquímicas del SN revierten en la fase denominada de remisión. Nuestros resultados muestran que las alteraciones asociadas con daño en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en la fase aguda del padecimiento, espontáneamente revierten después de 30 días de la aplicación del ANP. Las hormonas analizadas LH y T en la rata macho, así como LH y E₂ en la rata hembra recuperaron sus niveles normales en la fase de remisión. El monitoreo del ciclo estral en esta etapa muestra una carencia de ciclos ovulatorios en la fase aguda del padecimiento y su posterior recuperación hacia el día 23 posterior a la inducción del síndrome. Estos hallazgos nos permiten establecer la reversibilidad de las alteraciones endócrinas en el SN, aunque esto no descarta que las recaídas produzcan alteraciones crónicas.

En la etapa final del estudio se analizó la influencia de las alteraciones endócrinas sobre la capacidad reproductiva tanto en la fase aguda como en la de remisión en ambos sexos. Los resultados indican que los cambios endócrinos afectan de manera diferente la capacidad de fertilización en ratas macho y hembras. En la rata macho nefrótica, el porcentaje de fertilización disminuyó en un 63 por ciento durante la fase aguda, mientras en la rata hembra la capacidad reproductiva se perdió totalmente. Esta diferencia con seguridad tiene su fundamento en el diferente período de evolución necesario para la formación de un gameto masculino y uno femenino. La maduración folicular en la rata hembra es un proceso

que toma 4 días para la liberación del óvulo, mientras el proceso espermatogénico dura 48 días en la rata, por tal motivo en la evolución del SN inducido por ANP, se ve más severamente afectada la capacidad reproductiva en la hembra. En paralelo con la recuperación de los valores hormonales durante la fase de remisión, la capacidad reproductiva en ambos sexos fue recuperada a sus porcentajes normales, de tal forma que podemos postular que existen alteraciones sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en el SN y que éstas se presentan de manera transitoria en el SN inducido por primera vez.

Si bien los resultados aportados por el presente trabajo claramente indican que la rata con SN desarrolla un desorden endócrino, no nos permiten establecer el mecanismo por el cual se produce la alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, a pesar de haber realizado mediciones secuenciales de los diferentes parámetros endócrinos en el período previo a la instauración del síndrome. Sin embargo es posible señalar que se trata de un daño específico, dado que la administración de una sola dosis de ANP conduce a la instalación del SN agudo, mientras múltiples ó mayores dosis de ANP producen insuficiencia renal crónica, el cual es un padecimiento renal que presenta características endócrinas distintas a las encontradas en el SN, principalmente hiperprolactinemia e hiperestrogenismo (120-122).

El modelo del SN inducido por ANP en la rata, al igual que cualquier otro modelo experimental, presenta limitaciones, no se puede descartar completamente la participación directa del ANP en la disfunción endócrina encontrada, sin embargo, el hecho de que éste compuesto se excrete en las primeras 8 horas posteriores a su administración y que como se ha señalado, altera los mecanismos de transcripción, nos haría esperar una alteración endócrina en el día posterior a su aplicación. Por otro lado, es claro en nuestro estudio que

todos los cambios endócrinos evaluados se presentaron en paralelo con la aparición de las características propias de la instalación del SN en las ratas de ambos sexos; de igual forma, la remisión de las alteraciones hormonales, ciclo estral, peso de los tejidos andrógeno dependientes, así como la capacidad reproductiva, remitieron a su estado normal en relación directa con la remisión del síndrome. Podemos así confiar que la disfunción endócrina encontrada no es producto directo del compuesto administrado para la inducción del SN, sino una alteración que se presenta asociada al padecimiento mismo.

CONCLUSIONES

1. Los datos aportados por el presente protocolo nos permiten concluir que existe disfunción endócrina en la rata con SN inducido por ANP. Esta disfunción altera la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en ambos sexos.
 - a. En la rata macho la disfunción endócrina se manifiesta por disminución significativa de las concentraciones circulantes de LH, FSH y T, disminución del peso de los tejidos andrógeno dependientes, así como por pérdida significativa de la capacidad reproductiva.
 - b. En la rata hembra la disfunción endócrina se manifiesta por disminución significativa de las concentraciones de LH y E₂, pérdida del ciclo estral, atresia folicular y en consecuencia falta total de capacidad reproductiva.
2. Las alteraciones endócrinas en el SN se presentan transitoriamente durante la fase aguda, presentando una clara recuperación paralela a la remisión del padecimiento.
3. Las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada encontradas en ratas de ambos sexos, sugieren fuertemente una gama compleja de posibles alteraciones, de las que podemos mencionar: falla en la liberación de LHRH por el hipotálamo, daño en los mecanismos de liberación hipofisiaria de gonadotropinas, falla en la activación de la ruptura de la cadena lateral del colesterol mediada por LH en las gónadas, ó daño generalizado que afecta a las enzimas esteroideogénicas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Murray FT, Wyss HU, Thomas RG, Spevack M, Glaros AG. Gonadal dysfunction in diabetic men with organic impotence. *J Clin Endocrinol Metab* 65:127-135, 1987.
- 2.- Codwden EA, Ratcliffe WA, Ratcliffe JG, Kennedy AC. Hypothalamic-pituitary function in uraemia. *Acta Endocrinol (Copenh)* 98:488-494, 1981.
- 3.- Czernichow P, Dauzet MC, Broyer M, Rappaport R. Abnormal TSH, PRL and GH responses to TSH-releasing factor in chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 43:630-637, 1976.
- 4.- Gomez-Pan A, Alvarez-Ude F, Yen PPB, Hall R, Evered DC, Kerr DNS. Function of the hypothalamo-hypophyseal thyroid axis in chronic renal failure. *Clin Endocrinol* 11:567-574, 1979.
- 5.- Veldhuis JD, Iranmanesh, Wilkowski MJ, Samojlik E. Neuroendocrine alterations in the somatotrophic and lactotropic axes in uremic men. *Eur J Endocrinol* 131:489-498, 1994.
- 6.- Richard J. Glascock y Barry M. Brenner. Glomerulopatías Importantes. En: *Principios de medicina interna*. Harrison T.R. ed. Saunders, Filadelfia. 294:2277-2290, 1986.
- 7.- Karnovsky MJ. The ultrastructure of glomerular filtration. *Ann Rev Med* 30: 213-224, 1979.
- 8.- Dale AR. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am J Physiol* 253:F783-F794, 1987.
- 9.- Hovart R, Hovorka A, Dekan G, Pozewiski H, Kerjaschki D. Endothelial cell membranes contain podocalyxin the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol* 102:484-491, 1986.
- 10.- Parthasarathy N, Spiro RG. Characterization of the glycosaminoglycan component of the renal glomerular basement membrane and its relationship to the peptide portion. *J Biol Chem* 256:507-513, 1981.
- 11.- Fox JW, Butkowski RJ, Hudson BG. Detergent-prepared glomerular basement membrane is composed of a heterogeneous group of polipeptides. *J Biol Chem* 256:9313-9315, 1981.
- 12.- Kefalides NA. Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 6:63-104, 1973.
- 13.- Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1303-1307, 1979.
- 14.- Timpl R, Rohde H, Gehron Robey P, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254:9933-9937, 1979.
- 15.- Dziadek M, Paulsson M, Timpl R. Identification and interaction repertoire of large forms of the basement membrane protein nidogen. *EMBO J* 4:2513-2518, 1985.
- 16.- Sariola H, Kuseela P, Ekblom P. Cellular origin of fibronectin in interspecies hybrid kidneys. *J Cell Biol* 99:2099-2107, 1984.
- 17.- Carlin BE, Durkin ME, Bender B, Jaffe R, Chung AE. Synthesis of lamin and entactin by F9 cells induced with retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP. *J Biol Chem* 258:7729-7737, 1983.
- 18.- Orci L, Singh A, Amherdt M, Brown D, Perrel A. Microheterogeneity of protein and sterol content in kidney podocyte membrane. *Nature* 293:646-647, 1981.
- 19.- Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98:1591-1596, 1984.
- 20.- Rodenwal R, Karnowsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60:423-433, 1974.
- 21.- Bohrer MP, Baylis V, Humes HD, Glascock RJ, Robertson CR, Brenner BM. Permissibility of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations. *J Clin Invest* 61:72-78, 1978.
- 22.- Christensen EI, Carone FA, Rennke HG. Effect of molecular charge on endocytic uptake of ferritin in renal proximal tubule cells. *Lab Invest* 44:351-356, 1981.
- 23.- Bertolatus JA, Hunsicker LG. Glomerular sieving of anionic and neutral bovine albumins in proteinuric rats. *Kidney Int* 28:467-476, 1985.
- 24.- Amato D, Pedraza-Chaverrí J, Herrera-Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En: *Tratado de Nefrología*. Martínez-Maldonado M ed. Ediciones Norma, Madrid. 685-694, 1993.
- 25.- Brenner B, Coe F, Rector FC. Structure and function of the renal circulations. En: *Renal Physiology in Health and Disease*. Brenner, B, Coe F, Rector F. eds. WB Saunders Co. Filadelfia, 1987.
- 26.- Pedraza-Chaverrí J, Calderín P, Cruz C, Peña JC. Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Renal Failure* 15:149-155, 1993.

- 27.- Yamauchi A, Imai E, Noguchi T, Takana T, Yamamoto S, Mikami H, et al. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats. *Am J Physiol* 254:E676-E679, 1988.
- 28.- Pedraza-Chaverri J, Huberman A. Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats. *Nephron* 59:648-650, 1991.
- 29.- Appel GB, Blum CB, Chien S, Kunis CL, Appel AS. The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome. Relation to plasma albumin concentrations, oncotic pressure, and viscosity. *N Engl J Med* 312:1544-1548, 1985.
- 30.- Jensen H. Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 182:465-473, 1967.
- 31.- Muls E, Rosseneu M, Dancels R, Schurgers M, Boelaert J. Lipoprotein distribution and composition in the human nephrotic syndrome. *Atherosclerosis* 54:225-237, 1985.
- 32.- Golper TA, Schwart SH. Impaired renal mevalonate metabolism in nephrotic syndrome: a stimulus for increased hepatic cholesterologenesis independent of GFR and hypoalbuminemia. *Metabolism* 31:471-475, 1982.
- 33.- Bernard DB, Alexander EA. Edema formation in the nephrotic syndrome: pathophysiology mechanisms. *Cardiovasc Med* 4:605-625, 1979.
- 34.- Afrasiabi MA, Vaziri ND, Gwinup G, Mays DM, Barton CH, Ness RL, Valenta LJ. Thyroid function studies in the nephrotic syndrome. *Ann Int Med* 90:335-338, 1979.
- 35.- Musa BU, Seal US, Doe RP. Excretion of corticosteroid-binding globulin, thyroxine-binding globulin and total protein in adult males with nephrosis: effect of sex hormones. *J Clin Endocrinol* 27:768-774, 1967.
- 36.- Glass AR, Vigersky RA, Rajatanavin R, Partridge W, Smallridge RC, Wartofsky L, Burman KD. Low serum thyroxine and high serum triiodothyronine in nephrotic rats: etiology and implications for bioavailability of protein-bound hormone. *Endocrinology* 5:1745-1753, 1984.
- 37.- Godstein DA, Haldimann B, Sherman D, Norman AW, Massry SG. Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J Clin Endocrinol Metabol* 52:116-121, 1981.
- 38.- Ulach F. Hypercoagulability, renal vein thrombosis, and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. *Kidney Int* 28:429-434, 1985.
- 39.- Alfrey AC, Hammond WS. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 37:1409-1413, 1990.
- 40.- Pedraza-Chaverri J, Torres-Rodríguez A, Cruz C, Mainero A, Tapia E, Ibarra-Rubio M, Silencio JL. Copper and zinc metabolism in aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Nephron* 66:87-92, 1992.
- 41.- Glass AR, Beach J, Vigersky RA. Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increased sensitivity to negative feedback effects of testosterone. *Metabolism* 34:574-579, 1985.
- 42.- Elias AN, Carreon G, Vaziri ND, Pandian MR, Oveisi F. The pituitary-gonadal axis in experimental nephrotic syndrome in male rats. *J Lab Clin Med* 120:949-954, 1992.
- 43.- Moriasaki N, Matsuota N, Saito Y, Kumagai A. Lipid metabolism in nephrotic syndrome induced by daunomycin injection. *Metabolism* 33:405-410, 1984.
- 44.- 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* 46:16-23, 1982.
- 45.- Frenk S, Antonowicz VM, Craig JM, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolytes composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:424-427, 1955.
- 46.- Lesard J, Pestka S. Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. *J Biol Chem* 247:6909-6912, 1972.
- 47.- Rabinovitz M, Fisher JM. A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein synthesis by Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 232:477-481, 1962.
- 48.- Nathans D, Von Ehrenstein G, Monro R, Lipmann F. Protein synthesis from aminoacyl soluble ribonucleic acid. *Fed Proc* 21:127-130, 1962.
- 49.- Baker BR, Joseph JP, Williams JH. Puromycin synthetic studies. VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 76:2838-2839, 1954.
- 50.- Weening JJ, Beukers JJB, Grond, Elena JD. Genetic factors in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 29:789-798, 1986.
- 51.- Borowsky BA, Kessner DM, Recant L. Structural analogues of puromycin in production of experimental nephrosis in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 97:857-860, 1958.

- 52.- Karnofsky DA, Clarson BD. Cellular effects of anticancer drugs. *Annu Rev Pharmacol* 3:357-428, 1963.
- 53.- Nathas D, Neidle A. Structural requirements for puromycin inhibition of protein synthesis. *Nature* 197:1076-1077, 1963.
- 54.- Farham A. Effect of aminonucleoside (of puromycin) on normal and encephalomyocarditis (EMC) virus-infected L cells. *Virology* 27:73-79, 1965.
- 55.- Dickie N, Alexander CS, Nagasawa HT. Inhibition of nucleic acid synthesis in *Escherichia coli* B by puromycin aminonucleoside. *Biochim Biophys Acta* 95:156-169, 1965.
- 56.- Diamond JR, Bonventre JV, Karnofsky DA. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 29:478-483, 1986.
- 57.- Nagasawa HT. Identification and synthesis of the major nucleoside metabolite in rabbit urine after administration of puromycin aminonucleoside. *J Med Chem* 15:177-181, 1972.
- 58.- Nussenzveig I, Villela de Faria C, López de Faria J, Barros Magaldi J. Aminonucleoside induced nephrotic syndrome in human beings: report of five cases. 2nd Int Congress of Nephrol, *Excerpta Med Found.* Amsterdam 506-510, 1964.
- 59.- Michael AF. Experimental renal disease in monkeys. I. Aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 11:1266-1278, 1962.
- 60.- Yamauchi H, Cheu D, Rooney P, Hopper J. Renal lesions induced by aminonucleoside in dogs. *Arch Pathol* 77:20-26, 1964.
- 61.- Nagasawa HT, Swingle KF, Alexander CS. Metabolism of aminonucleoside-8-¹⁴C in the rat and guinea pig. *Biochem Pharmacol* 16:2211-2219, 1967.
- 62.- Frenk S, Antonowicz VM, Craig JM, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolytes composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:424-427, 1955.
- 63.- Alexander CS, Nagasawa HT, Filbin D. Distribution and excretion of aminonucleoside-8-¹⁴C in normal and nephrotic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:521-526, 1962.
- 64.- Derr RF, Alexander CS, Nagasawa HT. Metabolism of puromycin aminonucleoside in the normal, "pre-nephrotic" and nephrotic rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 125:248-252, 1967.
- 65.- Yen SSC. The hypothalamic control of pituitary hormone secretion. En: *Reproductive endocrinology*. Yen SSC, Jaffe RB, eds. Saunders, Philadelphia, 65-104, 1991.
- 66.- Green JD, Harris GW. Observation of the hypophysoportal vessels of living rat. *J Physiol (Lond)* 108:359-361, 1949.
- 67.- Oliver C, Mical RS, Porter JC. Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology* 101:598-604, 1977.
- 68.- Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM. Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology* 104:1749-1757, 1979.
- 69.- Evans WS, Rogol AD, MacLeod RM. Dopaminergic mechanisms and luteinizing hormone secretion. I. Acute administration of the dopamine agonist bromocriptine does not inhibit luteinizing hormone release in hyperprolactinemic women. *J Clin Endocrinol Metab* 50:103-107, 1980.
- 70.- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone: I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339, 1971.
- 71.- Seeburg PH, Adelman JP. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311:666-672, 1984.
- 72.- Husman CA, Kelch RP. Gonadotropin response and metabolism of synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during constant infusion of GnRH in men and boys with delayed adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 47:1325-1331, 1978.
- 73.- Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action: I. The GnRH receptor. *Endocr Rev* 9:379-383, 1988.
- 74.- Conn PM. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocr Rev* 7:3-10, 1986.
- 75.- Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract. En: *Williams Textbook of Endocrinology*. Wilson and Foster eds. Saunders, Philadelphia, 799-838, 1992.
- 76.- Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes for human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* 40:43-78, 1984.
- 77.- Vaitukaitis JL, Ross GD, Braunstein GD. Gonadotropin and their subunits: basic and clinical studies. *Recent Prog Horm Res* 32:289-331, 1976.

- 78.- Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod* 30:382-387, 1984.
- 79.- Ulloa-Aguirre A, Espinosa R, Danián Matsumura P, Chappel SC. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Rep* 3:491-501, 1988.
- 80.- Ulloa-Aguirre A, Espinosa R, Danián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Domínguez R. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 38:70-78, 1988.
- 81.- Van-Hall EV, Vaitukaitis JL, Ross GT. Effects of progressive desialylation on the rate of disappearance of immunoreactive hCG from plasma in rats. *Endocrinology* 89:11-15, 1971.
- 82.- Veldhuis JD, Fraioli F, Rogol AD. Metabolic clearance of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 77:1122-1128, 1986.
- 83.- Keller PJ. The renal clearance of follicle-stimulating and luteinizing hormone in postmenopausal women. *Acta Endocrinol (Copenh)* 53:225-233, 1966.
- 84.- Yen SSC, Llerena LA, Pearson OH. Disappearance rates of endogenous follicle-stimulating hormone in serum following surgical hypophysectomy in man. *J Clin Endocrinol* 30:325-329, 1970.
- 85.- Coble YD Jr, Kohler PO, Cargille CM. Production rates and metabolic clearance rates of human follicle-stimulating hormone in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Invest* 48:359-363, 1969.
- 86.- Simpson ER. Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P₄₅₀, and the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 13:213-217, 1979.
- 87.- Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ. Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J Biol Chem* 250:8818-8823, 1975.
- 88.- Means AR, Vaitukaitis JL. Peptide hormone receptors: specific binding of ³H-FSH to testis. *Endocrinology* 90:39-46, 1972.
- 89.- Fakunding JL, Means AR. Characterization and follicle-stimulating hormone activation of Sertoli cell cyclic MP-dependent protein kinases. *Endocrinology* 101:1358-1368, 1977.
- 90.- Means AR, Fakunding JL, Huckins C. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 32:477-527, 1976.
- 91.- Dorrington JH, Armstrong DT. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17 β synthesis in culture Sertoli cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2677-2681, 1975.
- 92.- Ketelsleger JM, Hetzel WD, Sherins RJ. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology* 103:212-222, 1978.
- 93.- Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* 43:231-276, 1987.
- 94.- Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5:1405-1417, 1991.
- 95.- Piquette GN, Lapolt PS, Oikawa M, Hsueh AJW. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in culture rat granulosa cells. *Endocrinology* 128:2449-2456, 1991.
- 96.- Segaloff DL, Wang H, Richards JS. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4:1856-1865, 1990.
- 97.- Gwynne JT, Strauss JL. The role of lipoproteins in the steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 3:299-329, 1982.
- 98.- Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9:295-318, 1988.
- 99.- Labrie F, Simard J, LuuThe V, Bélanger A, Pelletier G. Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:805-826, 1992.
- 100.- Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel Sushma, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Anderson S. Male pseudohermaphroditism caused by mutation of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature Genetics* 7:34-39, 1994.
- 101.- Bruchovsky N, Wilson JD. The conversion of testosterone to 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 243:2012-2021, 1968.

- 102.- Massa R, Stupnicka E, Kniewald Z, Martini L. The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and anterior pituitary. *J Steroid Biochem* 3:385-399, 1972.
- 103.- Barbieri RL, Rein MS, Horstein MD, Ryan KJ. Rat Leydig cell and granulosa cell 17-ketosteroid reductase activity: subcellular localization and substrate specificity. *Am J Obstet Gynecol* 159:1564-1569, 1988.
- 104.- Pittaway DE, Andersen RN. Characterization of human ovarian oestradiol-17 β oxidoreductase activity. *Acta Endocr (Copenh)* 85:624-635, 1977.
- 105.- Scheekter CB, Matsumoto AM, Bremner WJ. Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect directly on the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 68:397-401, 1989.
- 106.- Shao-Yao Y. Inhibin, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9:267-293, 1988.
- 107.- Dubey AK, Zelenik AJ, Plant TM. In the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), the negative feedback regulation of follicle-stimulating hormone secretion by an action of testicular hormone directly at the level of the anterior pituitary gland cannot be accounted for by either testosterone or estradiol. *Endocrinology* 121:2229-2237, 1987.
- 108.- Baker HWG, Bremner WJ, Burger HC. Testicular control of follicle-stimulating hormone secretion. *Recent Prog Horm Res*, 98:997-1004, 1976.
- 109.- Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51-89, 1980.
- 110.- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-232, 1994.
- 111.- Hillier SG. Ovarian manipulation with pure gonadotrophins. *J Endocrinol* 127:1-4, 1990.
- 112.- Le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, De Ziegler D, Bouchard P. Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 77:439-442, 1993.
- 113.- Turner IM, Saunders PTK, Shimasaki S, Hillier SG. Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in culture rat granulosa cells. *Endocrinology* 125:2790-2792, 1989.
- 114.- Rabinovici J, Spencer SJ, Doldi N, Goldsmith PC, Schwall R, Jaffe R. Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin Invest* 89:1528-1536, 1992.
- 115.- Michel U, McMaster JW, Findlay JK. Regulation of steady state of follistatin messenger RNA levels in rat granulosa cells *in vitro*. *J Mol Endocrinol* 9:147-156, 1992.
- 116.- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH. Hormonal regulation of the differentiation of culture ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5:76-127, 1984.
- 117.- Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. *En: The physiology of reproduction*. Knobil E, Neill J eds. Raven Press, New York, 1893-1927, 1988.
- 118.- Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A, 1965.
- 119.- Zetterkvist H. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. (Tesis), Karolinska Institute, Stockholm, 1956.
- 120.- Paniagua R, Arreola F, Herrera J, Pérez A, Díaz S, Mondragón L, Sereno O, Villalpando S, Exaire E, Bermúdez A. Zinc, prolactin, gonadotropins and androgen levels in uremic men. *Arch Androl* 8:271-275, 1982.
- 121.- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 4:179-211, 1983.
- 122.- Chirito E, Gonda A, Friesen H. Prolactin in renal failure. *Clin Res* 20:423-428, 1972.

Publicaciones originales

TESIS SIN PAGINACION

COMPLETA LA INFORMACION

Pituitary-ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome

Marta Menjivar¹, Felipe Vilchis¹, Mario Cárdenas¹, Cristino Cruz², Horacio Merchant¹, Gregorio Pérez-Palacios¹ and José Pedraza-Chaverrí^{2*}

Departments of Reproductive Biology¹ and Nephrology², Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico; Department of Cell Biology¹, IIB, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Merchant H, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverrí J. Pituitary-ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:502-6. ISSN 0804-4643

The reproductive hormonal profile was evaluated in female rats with experimental nephrotic syndrome induced with a single subcutaneous dose of puromycin aminonucleoside (PAN). Serum concentrations of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), progesterone (P₄), testosterone and 17 β -estradiol (E₂) were determined sequentially in control and experimental groups on days 1, 3, 7 and 10 after PAN administration. Prolactin levels were also assessed on day 10. In both groups, vaginal smears were taken daily throughout the study to evaluate cyclic histological changes. At the end of the experiment the histological appearance of the ovaries was evaluated by light microscopy. Nephrotic rats had a rapid loss of the estrous cycle starting on day 4, which set them at diestrus. At the same time the hormonal evaluation indicated a gradual decrease in E₂, LH and P₄ concentrations, starting from days 3, 7 and 10, respectively. No significant changes were noted in FSH or testosterone values. Besides, on day 10, prolactin concentrations remained unmodified. Even though most hormonal levels were found low on day 10, all values except E₂ (undetectable) corresponded to the interval reported for the diestrus phase. Likewise, histological examination of ovarian tissue from nephrotic rats showed a considerable increase in the number of atretic follicles. These findings indicate that female rats with nephrotic syndrome develop an important endocrine dysfunction that probably involves steroidogenic tissues (ovary and/or adrenal gland), and suggest the existence of a hypothalamic-hypophyseal impairment.

Marta Menjivar, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga N.15, Tlalpan 14000, México, D.F.

Nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside (PAN) is an experimental model of the human disease characterized by proteinuria, hypoproteinemia, hyperlipidemia and edema (1, 2). The presence of non-selective proteinuria reported for this disease indicates that all protein fractions increase in urine within 8-10 days after drug administration (3). Likewise, the albumin gene transcription is enhanced in the liver of nephrotic rats (4, 5). Studies on hormonal disorders in male nephrotic rats have been contradictory, showing evidence that indicates the existence of hypogonadotropic hypogonadism (6) or the presence of hypoandrogenism with a significant elevation of serum luteinizing hormone (7). Disturbances of the pituitary-thyroid axis have also been reported (8).

Abnormalities at different levels of the hypothalamic-pituitary-testicular axis are observed commonly in both nephrotic animals and those with experimental chronic renal failure (6, 9). In both renal diseases,

however, the female-related endocrine changes have been poorly studied.

Despite the fact that hormonal disorders are also known to occur in nephrotic patients, little has been studied in males and, to our knowledge, there are no report data concerning females (10). Accordingly, the aim of this study was to evaluate the endocrine profile of female rats with nephrotic syndrome, with particular attention to ovarian failure.

Materials and methods

Reagents

Puromycin aminonucleoside (PAN) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were reagent grade and available commercially.

Animals

Adult female Wistar rats weighing 200-250 g were maintained under 14-h light/10-h dark cycles. Water

*Present address: Dept. Biología, Fac. Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

and food pellets were available ad libitum. Only rats exhibiting three or more consistent 4-day estrous cycles were included in this study.

Monitoring the estrous cycle

The ovarian cycle was monitored throughout the study based on vaginal smear patterns, considering that ovulation occurs around every 4 days with proestrus (P), estrus (E), diestrus 1 (D1) and diestrus 2 (D2) phases (11).

Experimental design

Nephrotic syndrome was induced by a single subcutaneous injection of a 2% PAN solution (15 mg/100 g body wt) in 0.9% saline (3). The control group received a sham injection of saline. Estrous cycles were monitored throughout the study. Rats were kept in metabolic cages for 24 h before the experiments. Animals were killed by decapitation on days 1, 3, 7 and 10 after treatment. Serum and urine samples were collected and stored at -20°C until assayed.

Histological examination

Ovaries from nephrotic and control rats were fixed in Karnovsky's solution (12), postfixed with 1% OsO₄ in Zetterkvist buffer (13) and embedded in Epon. Semi-thin sections (1 µm) were stained with 1% toluidine blue.

Analytical determinations

Total protein in serum and urine and cholesterol were measured by colorimetric methods as described previously (14).

Hormone assays

Serum luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were measured on days 1, 3, 7 and 10; prolactin (PRL) was measured only on day 10 by a specific radioimmunoassay (RIA) using the double

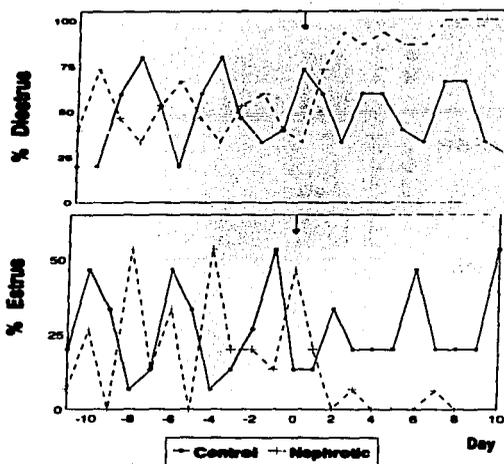


Fig. 1. Representative patterns of the 4-day estrous cycle in rats before and after puromycin aminonucleoside administration (day 0). Data were obtained from 15 animals per group.

antibody technique with reagents and protocols supplied by the National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 5.1% and 6.5% for LH, 4% and 7.9% for FSH and 3% and 8.2% for PRL. The results were expressed in µg/l of the international references standards NIH LH-RP-3, FSH-RP-2 and PRL-RP-2. Steroid hormones E₂, P₄ and testosterone were also measured by RIA using kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6.1% and 7.4% for E₂, 2.0% and 5.4% for P₄ and 4.4% and 8.2% for testosterone.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Unpaired Student's *t*-test as well as the Mann-Whitney U test were used to assess significance; *p* < 0.05 was considered to be significant.

Results

Administration of PAN to intact female rats resulted in a marked proteinuria, hypercholesterolemia and hypoproteinemia (Table 1). In addition, experimental

Table 1. Biochemical determinations in serum and urine from control (C) and nephrotic (N) rats.*

Day		Serum total protein (g/l)	Serum cholesterol (mg/l)	Urine total protein (mg/24 h)	N
1	C	95 ± 2	695 ± 180	5.9 ± 1	3
	N	92 ± 1	845 ± 10	4.7 ± 1	8
3	C	94 ± 4	770 ± 20	7.2 ± 2	3
	N	75 ± 2	810 ± 60	22.0 ± 3*	8
7	C	104 ± 2	1030 ± 40	4.7 ± 0.4	3
	N	57 ± 1*	3640 ± 510*	392.0 ± 33*	8
10	C	93 ± 4	625 ± 2	6.3 ± 2	3
	N	67 ± 2*	3090 ± 330*	576.0 ± 49*	8

* Values represent means ± SEM. **p* < 0.05.

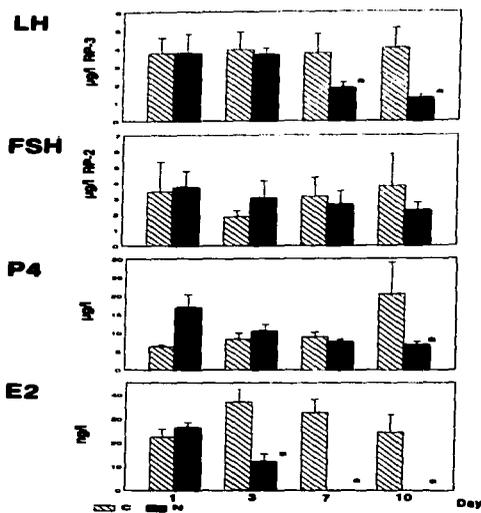


Fig. 2. Serum hormone concentrations in nephrotic female rats. Hormone levels were determined on different days after puromycin aminonucleoside administration (15 mg/100 g body wt). Values show the mean \pm SEM of eight animals per group. N: nephrotic; C: control. * $p < 0.05$ vs its respective control.

animals also presented an abnormal pancreatic growth, changes in hepatic pigmentation and intraperitoneal fluid retention up to 30 ml (data not shown). The nephrotic rats showed a rapid loss of the estrous cycle starting from day 4, which set all rats in the diestrus phase (Fig. 1). A pattern of abundant leukocytes was observed in the vaginal smears of nephrotic rats throughout the study, which agrees with a persistent

diestrus. Atypical estrus pictures were occasionally seen. The results of sequential evaluation of the reproductive hormones in rats with nephrotic syndrome are summarized in Fig. 2. It can be observed that certain hormones drop progressively after PAN administration. The LH concentration was significantly low on days 7 and 10, whereas FSH had only a moderate diminution (NS). After day 3, E_2 levels decreased and became undetectable on day 7 while P_4 decreased gradually until day 10 of the study. Testosterone levels were lower than the detection limit of $0.1 \mu\text{g/l}$ and remained unmodified during the sequential evaluation (data not shown). There were no differences in PRL concentration evaluated on day 10. The main endocrine changes obtained from three different experiments on day 10 after PAN administration are summarized in Table 2. These data were compared to groups of normally cycling rats and the interval reported for the diestrus phase. On day 10 we had similar results to those in the sequential evaluation (Fig. 2). On the other hand, the concentration of hormones in nephrotic rats was not different from those values corresponding to the interval reported for the diestrus phase, except for E_2 whose values were zero in all samples. The histological examination of the ovaries from treated rats showed an increased number of atretic follicles, reaching their maximum on day 10 (Fig. 3).

Discussion

The results of this study establish the existence of alterations of the pituitary-ovarian function in adult female rats bearing nephrotic syndrome. During the acute phase (day 10) of the illness we noted the absence of cyclic histological changes of the vaginal epithelium in PAN-treated rats, thus reflecting the lack of ovulatory cycles. At this time, all animals presented abnormalities in their hormonal patterns, which were characterized by decreased LH values, low P_4 and undetectable levels of E_2 . Interestingly, the circulating concentrations of FSH showed a little diminution, whereas PRL and testosterone remained unmodified, although within the normal range reported for the diestrus phase.

Contrary to what occurs in male rats, where

Table 2. Endocrine profile in nephrotic female rats on day 10 after puromycin aminonucleoside (PAN) administration.^a

Group	Body wt (g)	Cycle phase ^b	LH ($\mu\text{g/l}$)	FSH ($\mu\text{g/l}$)	PRL ($\mu\text{g/l}$)	P_4 ($\mu\text{g/l}$)	E_2 (ng/l)	N
Control	249 \pm 17	PEDD	4.8 \pm 1	5.0 \pm 1.7	26.5 \pm 2.0	16.8 \pm 3	28.6 \pm 7	17
Nephrotic	241 \pm 19	DDDD	0.4 \pm 0.1*	3.6 \pm 1.2	17.0 \pm 6	6.4 \pm 1*	ND*	15
Control	Normal values of D ^c		0.2-1	2.2-6	10-30	3-28	20-45	

^a Results are means \pm SEM; * $p < 0.05$ compared vs control; ND: undetectable.

^b D: diestrus; P: proestrus; E: estrus.

^c From Ref. 9.

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

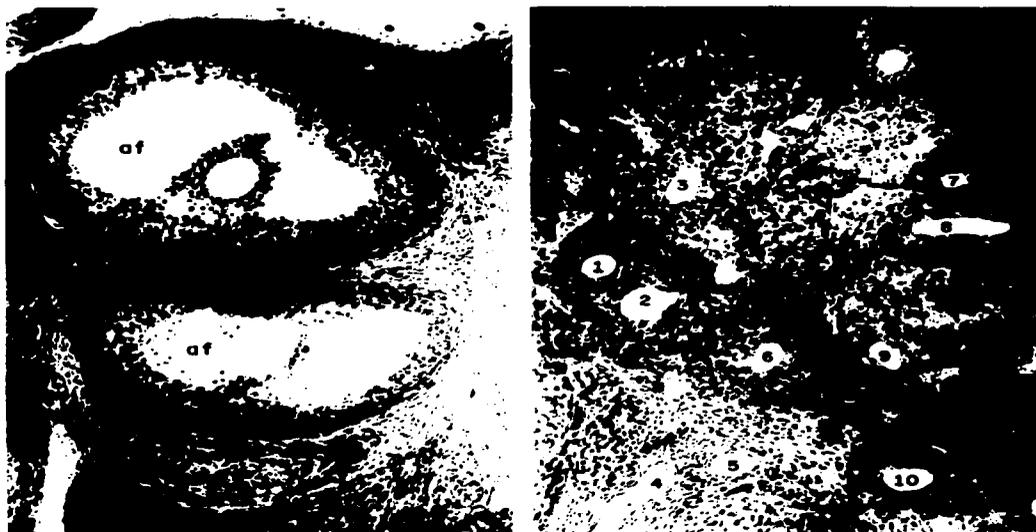


Fig. 3. This photomicrograph shows part of an ovary from an untreated rat (left) and from a nephrotic rat on day 10 after PAN administration. Ten remnants of zona pellucidae, identified as atretic follicles, can be seen (right). af: atretic follicles; af: antral follicles. Bar scale 100 μ m.

histological appearance of the testes is not affected in nephrotic animals (6), we did find profound alterations in the ovarian architecture of female rats with nephrotic syndrome. The histological ovarian examination showed a remarkable accumulation of atretic follicles and the disappearance of Graafian follicles (Fig. 3). The presence of a massive follicular atresia in PAN-treated rats may explain the drop in E_2 , because it has been well established that follicular cells are the main source of this compound (11).

It is well known that the administration of pharmacological doses of androgens might induce follicle atresia (15); however, it seems unlikely that androgens affect the ovarian cells because the circulating testosterone levels were found to be consistently low or almost undetectable throughout the study. On the other hand, the prevalence of rather low concentrations of LH in nephrotic rats was interpreted as residual products released by old corpora lutea (11).

In this work it is clearly shown that PAN-nephrotic rats have significantly low LH values and almost

unaltered FSH levels. Serum LH decreases to 25% compared to control values, whereas FSH only showed a moderate change. Such a discrepancy supports the concept of a different regulatory mechanism that operates in the control of both of the gonadotropins (16), as well as the existence of factors such as inhibin and/or activin, which are known to affect the secretion of FSH, but not that of LH , by the pituitary (17); however, the lack of a consistent increase of these hormones, even in the absence of E_2 , strongly suggests a breakdown in the feedback mechanism and therefore hypothalamic-hypophyseal damage. Similar observations were made in nephrotic male rats by Glass et al. (6).

The loss of the hypothalamic-pituitary function has been reported also in patients with chronic renal failure and in experimental uremic rats (9, 18). These reports, however, have been focused to explore the endocrine dysfunction of males. Although nephrotic syndrome appears to share certain hormonal alterations with this illness, we observed clear differences in the control of PRL secretion. While female nephrotic rats exhibit

normal PRL values, hyperprolactinemia is a common feature of chronic renal failure (18, 19).

To define more clearly the chronological modifications of the hormonal patterns, we analyzed gonadotropin and sex steroid hormone concentrations at different stages of nephrotic syndrome. Hormonal levels of nephrotic rats were measured on days 1, 3, 7 and 10 after drug administration. Based on E_2 values, it would appear that ovarian failure was the first manifestation of the endocrine dysfunction associated with the syndrome, because on day 3, E_2 concentrations were significantly reduced (Fig. 2) compared with those of untreated female animals. The progressive decline of circulating LH concentrations together with the drop of measurable quantities of estradiol on day 7 were unexpected because it is well known that both pituitary and plasma levels of LH rise after estrogen withdrawal (11). These findings could be explained by the loss of hypothalamic-pituitary function in this syndrome, including positive estrogen feedback and pulsatile patterns of LH release (18), as well as an inappropriate gonadotropin response throughout their specific ovarian receptors.

As mentioned above, the abnormalities of the endocrine reproductive function of nephrotic female rats resemble some aspects of those dysfunctions described for experimental uremia and could potentially be explained through the ontogenic regression hypothesis proposed by Handelsman and Dong (9). These authors state that the pivotal feature explaining gonadal dysfunction is the aberrant neuroendocrine regulation of GnRH secretion from which all changes in pituitary-gonadal function follow.

Nephrotic rats presented hypoproteinemia and proteinuria between days 7 and 10 after PAN treatment. During this stage of the disease, the plasma levels of E_2 were undetectable and correlated with an increase in both the number of atretic follicles (Fig. 3) and the percentage of diestrus (Fig. 1). The undetectable levels of E_2 found in nephrotic rats suggest a further impairment in estrogen biosynthesis that would involve not only gonads but also adrenal glands.

Finally, besides the endocrine abnormalities the nephrotic rats also exhibited a marked pancreatic growth, changes in hepatic pigmentation and intraperitoneal liquid retention, suggesting the existence of other extra-renal metabolic alterations.

In conclusion, the overall data presented herein indicate that female rats with induced nephrotic syndrome develop a clear endocrine dysfunction characterized by the loss of estrous cycle, the presence of follicular atresia, low circulating values of LH and undetectable levels of E_2 .

Acknowledgments. This work was supported partially by a grant from the Special Programme of Research, Training and Research Development in Human Reproduction of the World Health Organization (Geneva) and CONACyT (Mexico). The authors wish to thank

the National Hormone and Pituitary Program (Bethesda, MD) for providing rat LH, FSH and PRL biological material for the performance of assays, as well as to MJA F.I. García-Forment for revision of the English manuscript.

References

- Brenner B, Coe F, Rector FC, editors. *Renal physiology in health and disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1987.
- Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J. *Fisiopatología del síndrome nefrótico*. In: Martínez-Maldonado M, et al., editors. *Tratado de nefrología*. Madrid: Ediciones Norma, 1993:685-94.
- Pedraza-Chaverri J, Calderón P, Cruz C, Peña JC. Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Renal Failure* 1993;15:149-55.
- Yamauchi A, Imai E, Noguchi T, Takana T, Yamamoto S, Mikami H, et al. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats. *Am J Physiol* 1988;254:E676-9.
- Pedraza-Chaverri J, Huberman A. Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats. *Nephron* 1991;59:648-50.
- Glass AR, Beach J, Vigersky RA. Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increased sensitivity to negative feedback effects of testosterone. *Metabolism* 1985;34:574-9.
- Elias AN, Carreon G, Vaziri ND, Pandian MR, Oveisit F. The pituitary-gonadal axis in experimental nephrotic syndrome in male rats. *J Lab Clin Med* 1992;120:949-54.
- Glass AR, Vigersky RA, Rajatanavin R, Partridge W, Smallridge RC, Wartofsky L, et al. Low serum thyroxine and high serum triiodothyronine in nephrotic rats: etiology and implications for bioavailability of protein-bound hormone. *Endocrinology* 1984;114:1745-53.
- Handelsman DJ, Dong Q. Hypothalamo-pituitary-gonadal axis in chronic renal failure. In: Veldhuis JD, editor. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. Neuroendocrinology II. Philadelphia: WB Saunders, 1993:145-61.
- Vaziri ND. Endocrinological consequences of the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1993;13:360-4.
- Freeman MF. *The ovarian cycle of the rat*. In: Knobil E, Neill J, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988:1893-927.
- Kurnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy [abstracts]. *J Cell Biol* 1965;27:137A.
- Zetterkvist H. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum [thesis]. Stockholm: Karolinska Institute, 1956.
- Mahnera A, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Serum and urine ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome. *Clin Invest Med* 1992;15:295-300.
- Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 1985;6:371-99.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coufaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1983;4:179-211.
- Ying S. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1988;9:267-93.
- Handelsman DJ. Hypothalamic-pituitary gonadal dysfunction in renal failure. *Analysis and renal transplantation*. *Endocr Rev* 1985;6:151-82.
- Bermúdez JA, Panlagua R, Arzeola F, Herrera J, Pérez A, Díaz S, et al. Endocrine profile in patients with chronic renal failure under zinc replacement. *Arch Androl* 1981;9:167-9.

Received July 20th, 1994

Accepted November 29th, 1994

Enviado a: Journal of Reproduction and Fertility (1995).

**Transient Alteration of the reproductive
function in nephrotic rats.**

**M. Menjívar¹⁺, F. Vilchis¹, M. Cárdenas¹,
C. Cruz², G. Pérez-Palacios¹ and J. Pedraza-Chaverri^{2*}.**

**Departments of ¹Reproductive Biology and ²Nephrology, Instituto Nacional de la Nutrición
Salvador Zubirán, Mexico city, MEXICO.**

Keywords: Nephrotic syndrome, sex steroid hormones, gonadotrophins, estrous cycle,
reproductive capability.

Short title: The reproductive function in nephrotic syndrome.

+ Address correspondence:

Marta Menjívar. Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición
Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga N.15, Tlalpan 14000, México, D.F.
Fax: (525)655.9859

*** Present address:** Dept. Biología, Fac. Química, Universidad Nacional Autónoma de
México.

Abstract

The reproductive function of male and female rats with induced nephrotic syndrome was evaluated. Measurements were carried out on nephrotic stage (day 10) and on remission stage (day 30) after the drug administration (15 mg/ 100 g body wt. of puromycin aminonucleoside). The reproductive function was evaluated based on, hormone levels, the pattern of the estrous cycle and on fertility. Serum concentrations of luteinizing hormone and oestradiol in females as well as luteinizing hormone and testosterone in males, were assayed at both phases of the illness by specific radioimmunoassay; the estrous cycle was followed throughout the study with vaginal smears, while fertility was estimated by the rate of pregnancies (females) or pregnancy induction (males), and the litter size. The results showed that serum concentrations of luteinizing hormone and oestradiol in female as well as luteinizing hormone and testosterone in male rats with nephrotic syndrome were significantly lower in the nephrotic stage of the illness, returning to their normal values after 30 days. The ovulatory cycle of nephrotic rats was disrupted on day 3 and not restored until day 23, nevertheless the reproductive function, measured as a fertility index, was fully reinstated at the remission stage. Interestingly, the capacity of fertilization of the nephrotic males was not entirely abolished during the acute phase, since 37 % of the animals were fertile. Moreover, on day 30 the reproductive function in nephrotic males was totally recovered. The data from this study shows the existence of reversible neuroendocrine disorders in rats bearing nephrotic syndrome; such changes are manifested during the acute phase of the illness as a temporary cessation of the reproductive processes.

Introduction

The rat nephrotic syndrome, induced with puromycin aminonucleoside (PAN), is an experimental model, similar to the minimal change human disease (Fiegelson *et al.*, 1959). This illness is characterized by profound metabolic changes such as proteinuria, hypoproteinemia and hyperlipidemia (Bernard, 1982). Spontaneous remissions and relapses of heavy proteinuria occur frequently, treatment with glucocorticoids enhance the natural tendency for this disease to undergo spontaneous remission, although, it may also increase relapse rate (Glassock and Brenner, 1994). It has been reported that in nephrotic rats, the main biochemical changes return to normality 30 days after PAN-administration (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1993). Likewise, other specific proteins such as ceruloplasmin, exhibit a similar remission pattern (Mainero *et al.*, 1992).

Disorders in the female reproductive hormonal profile and abnormal ovulatory cycles have been recently reported (Menjívar *et al.*, 1995), indicating that female nephrotic rats develop an important endocrine dysfunction. Besides, it has been reported the existence of abnormalities in the testicular-pituitary function of nephrotic males. These results, however, remain controversial; since Glass *et al.* (1985) detected the presence of hypogonadotropic-hypogonadism, while Elias *et al.*, (1992) reported hipoandrogenism with high levels of luteinizing hormone (LH).

Accordingly, the present study was undertaken to examine to what extent the endocrine changes in nephrotic syndrome could alter the reproductive capability. Studies were performed in female and male rats during the acute and remission stages of the illness.

Materials and Methods

Reagents

Puromycin aminonucleoside (PAN) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were reagent grade and available commercially.

Animals

Adult unmated female and male Wistar rats weighing 200-250 g were maintained under 14:10 h light:darkness cycles. Water and food pellets were available ad libitum. Only rats exhibiting 3 or more consistent 4-day estrous cycles were included in this study.

Monitoring estrous cycle

The ovarian cycle was monitored throughout the study based on vaginal smear patterns, considering that ovulation occurs in a mean of every 4 days with proestrus (P), estrus (E), diestrus 1 (D1) and diestrus 2 (D2) phases (Freeman, 1988).

Experimental design

Nephrotic syndrome was induced by a single subcutaneous injection of a 2 % PAN solution (15 mg/100 g body wt.) in 0.9 % saline (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1991). The control groups received a sham-injection of saline. Rats were kept in metabolic cages for 24 h before the experiments to collect urine samples. Animals were killed by decapitation on days 10 and 30 after treatment. Prostate was immediately removed and weighed. Serum samples, were then collected and stored at -20°C until assayed.

Fertility evaluation

Fertility capacity of nephrotic males was evaluated during the acute phase of the illness (days 7-10 after PAN administration), by keeping for 4 days each nephrotic and control rat with two females, which had showed previously 2 consecutive estrous cycles. Subsequently, the number of pregnant rats as well as the weight, sex and size litter were registered. On the remission stage (days 27-30 after PAN-injection), both female and male nephrotic animals were kept in individual cages for mating with one fertile male and with 2 normal females respectively, for a 4-day period. If mating and fertilization occurred, the number of pregnancies and litter characteristics were recorded as above.

In each case, serum samples from 10 animals were used for analytical determinations.

Hormone Assay

Serum luteinizing hormone (LH) was measured by specific radioimmunoassay (RIA) using the double antibody technique with reagents and protocol supplied by the National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD). The intra- and inter-assay coefficients of variations were 5.1 and 6.5 respectively. The results were expressed in ng/ml of the international references standard NIH LH-RP-3. Serum concentrations of oestradiol (E_2) and testosterone (T) were measured by RIA, using kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6.1 and 7.4 and 4.4 and 8.2 for E_2 and T respectively.

Analytical Determinations

Total protein in serum and urine and cholesterol in serum were measured by colorimetric methods as described previously (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1993; Menjivar *et al.*, 1995).

Statistical Analysis

Unpaired Student's t-test and Mann-Whitney U test were used to assess significance. $p < 0.05$ was considered to be significant. Results are expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

The main biochemical changes that occur throughout the acute and remission phases of the nephrotic syndrome are presented in fig. 1. In male and female rats, the urinary protein excretion and cholesterol levels increased largely during the acute phase. Later on they tend to normalize within the remission stage. By contrast, serum total protein values decreased significantly on day 10, becoming normal after 30 days.

The serum hormone concentrations in male and female nephrotic rats are shown in fig. 2. Male rats had a significant reduction in LH and T concentrations during the acute phase of the illness, as compared with the control group. On day 30, there were no differences in LH and T levels between nephrotic and untreated male rats. Similar patterns for LH and E_2 were also found in female rats at both stages.

The register of tissular weigh, revealed that prostate was clearly decreased in nephrotic rats in comparison with control rats during the acute phase (10.1 ± 1 mg vs 23.3 ± 2 mg, $p < 0.05$). Whereas no differences were found in the remission stage (31 ± 6 mg vs 31 ± 6 mg, $p < 0.05$).

The endocrine status of nephrotic and control female rats was evaluated throughout the study by monitoring the pattern of estrous cycle. Figure 3 shows that starting from day 3 all nephrotic rats exhibited anovulatory cycles, between day 3-23 a pattern of abundant

leucocytes was observed in most of the vaginal smears of these animals, which agrees with a persistent diestrous, unlike control group, the number of estrous registered in nephrotic rats drop drastically, after this period, the percentage of estrous increased progressively in such a way that around day 30, all PAN-treated rats had already normal estrous cycles.

The reproductive capacity of the nephrotic rats was assessed on basis of the fertility rate. Table 1 shows the percentages of fertility of males and females as well as the litter characteristics of each group. Considering the absence of ovulatory cycles on the acute phase, the reproductive capacity was not tested to female nephrotic rats on this stage. As can be seen in table 1, male nephrotic rats had an unexpected 37 percent of successful mating on day 10. At the remission stage, nephrotic animals from both sexes achieve a normal fertility rate. All characteristics recorded from the litters of nephrotic rats were no different than those from the control litters.

Discussion

The present results indicate that the reproductive function in adults nephrotic rats is clearly altered in both sexes during the acute phase of the illness. This study also indicates that the pituitary-gonadal impairment in PAN-induced nephrotic syndrome is present in a reversible fashion.

As regards to males rats, in agreement with Glass *et al.* (1984) findings, the induction of nephrotic syndrome resulted in a marked hypoandrogenism during the acute period of the illness, manifested by low T levels as well as an important diminution of the prostate weight. The circulating gonadotrophin was also significantly low in this phase. However, an unexpected finding was that in some animals (37 %), the fertilization capability and sexual behavior was present in spite of their concentration of both androgens and gonadotrophin were significantly reduced. In this regards, although it is well recognized that the male sexual behavior pattern is primarily androgen dependent (Beer *et al.*, 1973), our data support a recently report which show that other steroid hormones as 3 and 3 β -androstandiols exert male sexual behavior effects in rodents (Morali *et al.*, 1994), and perhaps involve in our model an biosynthetic pathway described by Yamada *et al* (1974) which form androstandiols from progesterone, not mediating by T. Finally the hypogonadotropic-hypogonadism condition present during the acute phase of the illness was reverted at the same time that the main biochemical alterations return to the normal values during the remission stage. The reproductive capacity was also reinstalled after 30 days. Those results indicate that the pituitary-gonadal alterations observed in the nephrotic syndrome are deeply related with the renal damage and that at least the hormonal levels evaluated as well as the reproductive

capacity are restored to the normality during the remission stage of the induced nephrotic syndrome. Even so we can not exclude a possible permanent damage in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis not detected in our study.

Female nephrotic rats seem to lose the capacity of the ovarian follicles to synthesize E_2 , which is an essential requirement for ovum maturation, at the same time that gonadotrophin had an unexplained fall down. Thus, it is reasonable to assume that those animals lose the normal ovulatory cycle as well as their reproductive capability during the acute phase of nephrotic syndrome. These findings are in agreement with our previous study of acute nephrotic stage (Menjívar *et al.*, 1995). Interestingly, we found in the present study that those important changes associated with the hypothalamus-pituitary-gonadal system, spontaneously revert after 30 days. Female nephrotic rats started again their 4-day ovulatory cycle, 23 days after PAN treatment and restored their normal LH and E_2 concentration. The most drastic alteration upon the reproductive capacity in female rats during the acute phase of the syndrome, is because of the short period of time necessary to the ovulatory process of the rats, which takes only four days. Female animals unlike male rats do not have the possibility to develop an adaptability response to hypogonadic-hypogonadotropic condition to maintain the reproductive capacity. However it is clear that in the acute phase the female pituitary-gonadal alterations are also consistently related to the renal damage as well as restored at the remission stage.

In conclusion, PAN-nephrotic rats from both sexes develop a transient hypogonadism-hypogonadotropic during the acute phase of the syndrome, reflected by a significantly drop of the reproductive capacity, which particularly affect female animals.

Acknowledgments

This work was supported by Grants from PADEP, National University of México and CONACYT (México). The authors wish to thank the National Hormone and Pituitary Program (Bethesda, MD) for providing rat LH biological material for the performance of the assays.

References

- Beer C, Larsson K, Pérez-Palacios G and Morali G (1973)** Androgen structure and male sexual behavior in castrated rats *Horm Behav* **4** 99-108
- Bernard DB (1982)** Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome pp 85-114 Ed. Brenner and Stein. New York
- Elias AN, Carreon G, Vaziri ND, Pandian MR and Oveisi F (1992)** The pituitary axis in experimental nephrotic syndrome in male rats *J Lab Clin Med* **120** 949-954
- Flegelson EB, Drake JW and Recant L (1959)** Experimental aminonucleoside nephrosis in rats *J Lab Clin Med* **50** 437-446
- Freeman ME (1988)** The ovarian cycle of the rat In *The Physiology of Reproduction* pp 1893-1927 Ed. E Knobil, J Neill, New York
- Glass AR, Beach J and Vigersky RA (1985)** Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increased sensitivity to negative feed back effects of testosterone *Metabolism* **34** 574-579
- Glasscock RJ and Brenner BM (1994)** The major glomerulopathies In *Harrison's Principles of Internal Medicine* pp 1295-1306 Ed. Iselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. McGraw-Hill, New York
- Mainero A, Cruz C and Pedraza-Chaverrí J (1992)** Serum urinary ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome *Clin Invest Med* **15** 295-300
- Menjívar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Merchant H, Pérez-Palacios G and Pedraza-Chaverrí J (1995)** Pituitary-ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome *Eur J Endocrinol* **132** 502-506
- Morali G, Oropeza MV, Lemus AE and Pérez-Palacios G (1994)** Mechanisms regulating male sexual behavior in rat: role of 3- and 3 β -androstenediols *Biol Repr* **51** 562-571
- Pedraza-Chaverrí J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E and Peña JC (1991)** Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats *Nephron* **57** 106-108
- Pedraza-Chaverrí J, Calderón P, Cruz C and Peña JC (1993)** Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome *Renal Failure* **15** 149-155
- Yamada M and Matsumoto K (1974)** Pathway from progesterone to 5-reduced C₁₉ steroids not involving androstenedione and testosterone in immature rat testes in vitro *Endocrinology* **94** 777-784

Figure legends

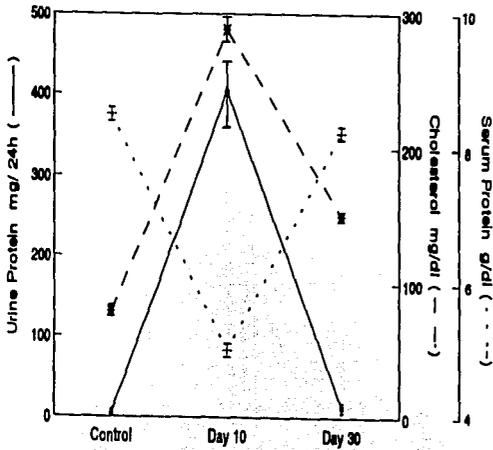
- Fig. 1.** Urine total protein, serum total protein and cholesterol, from controls and on days 10 and 30 after PAN administration.
- Fig. 2.** LH and T concentration in male rats (left panel) and LH and E₂ concentration in female rats (right panel) on days 10 and 30 after PAN-injection. * p < 0.05 vs. control group.
- Fig. 3.** Rat estrous cycle pattern expressed as estrus and diestrus percentage, 4 cycles before and 30 days after nephrotic syndrome induction (↓).

Table 1: Reproductive function in nephrotic rats

		Fertility Rate	% Fertility	Products # ^a	Sex F M	Weight ^{a,b} g	
Female	Day 30	Control	4/4	100	10±1	56 43	57±7
		Nephrotic	5/5	100	12±1.8	58 42	57±6
Male	day 10	Control	8/9	89	9±3	44 56	60±8
		Nephrotic	6/16	37	8.5±4	41 59	60±8
	day 30	Control	6/6	100	11±4	48 51	58±7
		Nephrotic	5/6	83	9.5±4	59 40	55±10

a = mean ± SD b = weight 21 days after birth

Female



Male

