

146
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Ciencias

EFFECTO DE LA PROTEINURIA SOBRE EL
BALANCE DE COBRE, ZINC Y HIERRO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

BEATRIZ RODARTE MURGUIA



1998

TESIS CON
FALLA DE CRIPEN

26 5006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Efecto de la proteinuria sobre el balance de cobre, zinc y hierro.

realizado por Beatriz Rodarte Murguía

con número de cuenta 8538768-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Alejandra Mainero del Paso	<i>Alejandra Mainero</i>
Propietario	Dr. Jose Pedraza Chaverri	<i>Pedraza</i>
Propietario	Dr. Rene de Jesus Cardenas Vazquez	<i>Rene de Jesus Cardenas V</i>
Suplente	Dra. Luisa Alvarina Alba Lois	<i>Luisa Alba</i>
Suplente	M. en I.B.B. Claudia A. Segal Kischinevzky	<i>CSF</i>

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

La presente tesis se realizó en los departamentos de Biología y de Química analítica de la Facultad de Química y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri y la Dra. Alejandra Mainero del Paso

Este trabajo de investigación recibió apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA Proyecto No. IN200795

A MI MADRE

Que siempre me ha enseñado el camino con amor,
esperanza y fé continua en la vida

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Química y a la Facultad de Ciencias por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo de tesis. También deseo expresar mi gratitud al Dr. José Pedraza Chaverrí por su valiosa contribución en la investigación realizada, y de manera muy especial a la Dra. Alejandra Mainero del Paso por su amistad y apoyo a lo largo de mi formación profesional.

INDICE

	Página
1. ANTECEDENTES	1
1.1 SÍNDROME NEFRÓTICO	1
2. INTRODUCCION	5
2.1 IMPORTANCIA DEL COBRE, ZINC Y HIERRO	5
2.11. Cobre	5
2.12. Zinc	7
2.13. Hierro	9
3. OBJETIVOS	12
4. HIPOTESIS	13
5. MATERIAL Y METODOS	14
A. REACTIVOS	14
B. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
C. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	15
C.1. Orina	15
C.2. Sangre	15
C.3. Heces	15
C.4. Tejidos	15
C.5. Pelo	15
C.6. Alimento	15
C.7. Digestión	16
D. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	16
D.1. Minerales	16
D.2. Proteínas totales	17
D.3. Ceruloplasmina	18
D.4. Albúmina y transferrina	19
D.5. Biometría hemática	20
D.6. Reticulocitos	20
D.7. Creatinina	20
D.8. Nitrógeno de urea	20

D.9. Colesterol	21
E. CÁLCULOS	21
E.1. Concentracion de minerales	21
E.2. Concentraciòn de ceruloplasmina	21
E.3. Depuraciòn de creatinina, minerales y proteínas transportadoras	21
E.4. Excreciòn fraccional de minerales y proteínas transportadoras	21
E.5. Cocientes mineral/proteína transportadora	22
E.6. Correlaciones mineral vs proteínas totales y mineral vs proteínas transportadoras	22
E.7. Balance de minerales	22
F. ANÁLISIS DE RESULTADOS	22
6. RESULTADOS	23
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFIA	46

RESUMEN

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida urinaria de muchas proteínas plasmáticas, por lo que se ha propuesto que durante el síndrome nefrótico en humano se pierden proteínas que se encargan de transportar metales como ceruloplasmina, albúmina y transferrina y que la pérdida de estos metales en algunos casos podría provocar alguna deficiencia, sin embargo esta relación ha sido pobremente estudiada.

En este trabajo se evaluó la alteración de estos minerales y sus proteínas transportadoras así como las posibles consecuencias durante el SN.

El SN se indujo administrando una dosis subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP) de 15 mg/100 g de peso a ratas macho de la cepa Wistar de 200-250 gr de peso, el grupo control (n=10) recibió solo solución salina.

El contenido de Cu, Fe y Zn se determinó por espectrofotometría de emisión atómica acoplada inductivamente a plasma, en orina, suero, alimento, heces y tejidos. Para las determinaciones en orina y heces ambos grupos se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas desde el día 0 hasta el día 10, en que concluyó el estudio con el fin de recolectar muestras diariamente.

Las ratas se sacrificaron el día 10; la proteinuria se presentó a partir del día 4 con un pico máximo el día 8; y la excreción urinaria de Cu, Fe y Zn aumentó los días 4 al 10.

En el día 10 las ratas presentaron hipoalbuminemia, hipoproteinemia, altos niveles de ceruloplasmina, transferrina y albúmina en orina y bajos niveles en suero, así como un aumento en la depuración y excreción fraccional de estas proteínas. Los niveles de Cu, Fe y Zn disminuyeron en suero y la depuración y la excreción fraccional de estos minerales aumentó.

Se encontró que los niveles de Cu disminuyeron en riñón, fémur e hígado; y aumentaron en pulmón. El contenido de Zn aumentó en riñón, testículos, fémur, hígado y músculo y disminuyó en cerebro. El contenido de Fe aumentó en riñón, testículos, pulmón, hígado y músculo. El consumo y la excreción fecal de Cu disminuyó claramente a partir del día 2 en las ratas con SN, mientras que el balance solo aumentó en el día 4. El consumo de Zn disminuyó significativamente a partir del día 6, mientras que su excreción disminuyó significativamente a partir del día 2. El balance no presentó diferencias. El consumo de Fe

disminuyó claramente los días 2, 6-10 mientras que la excreción fecal disminuyó significativamente a partir del día 2. El balance sólo aumentó el día 4.

En los estudios de biometría hemática realizados en las ratas con SN se observó una disminución significativa en el hematocrito, un aumento en la cantidad de glóbulos blancos, y un aumento significativo en el porcentaje de reticulocitos en las ratas nefróticas.

La excreción urinaria de Cu, Fe y Zn mostró una correlación positiva con las proteínas totales urinarias en los días 4-10, lo cual nos sugiere que el aumento en la excreción urinaria de estos minerales se debe a la excreción urinaria de las proteínas. Sin embargo la correlación plasmática entre las proteínas transportadoras y sus minerales no fue tan evidente.

Aun cuando existen cambios en la concentración de estos minerales en plasma, orina y heces, el balance no presentó cambios, lo cual nos sugiere que en las alteraciones de la concentración de minerales en los tejidos, están involucrados otros factores. Aún cuando no podemos afirmar rotundamente que existía algún tipo de deficiencia, los datos nos sugieren que si la proteinuria persiste por más tiempo los daños serían más marcados y severos y podríamos hablar ya de una deficiencia.

1. ANTECEDENTES

1.1. SÍNDROME NEFRÓTICO

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad que humanos se caracteriza por la pérdida urinaria de muchas proteínas plasmáticas y como consecuencia de esto se originan otras anormalidades como hipoproteinemía, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, alteraciones en el sistema inmunitario de tipo humoral y celular, retención de sodio, ascitis y edema, así como cambios en los niveles de casi todas las proteínas circulantes (1-3) (Fig. 1).

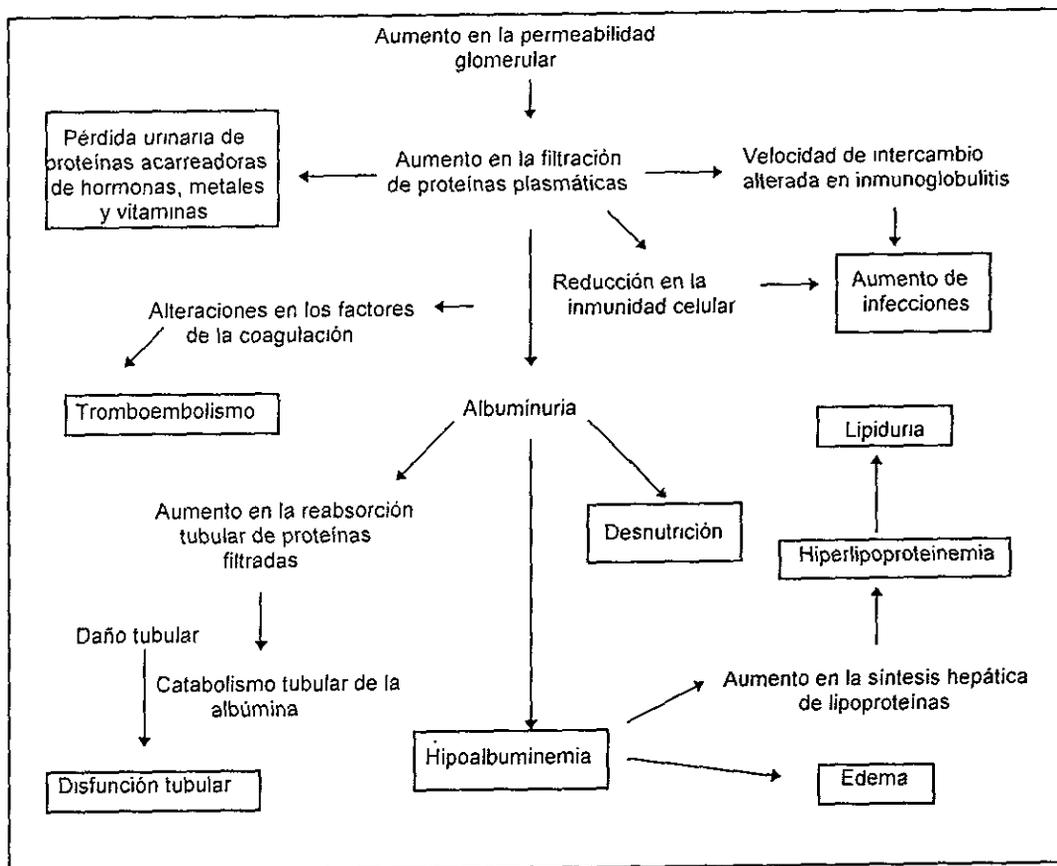


Figura. 1 Alteraciones metabólicas provocadas por el SN . Tomado de la referencia (4)

Estas alteraciones son la consecuencia directa o indirecta de un aumento en la permeabilidad glomerular. El principal daño en el SN se encuentra en la estructura de la barrera de filtración glomerular, que está constituida por células endoteliales, membrana basal glomerular y células epiteliales, las cuales forman una barrera de carga y de tamaño. La barrera de carga está constituida por glicoproteínas y heparán sulfato proteoglicanos, que le confieren la característica de ser una

barrera de cargas negativas. El sitio preciso de la barrera de tamaño no se conoce, pero es probable que sea la membrana basal glomerular (4).

Al parecer durante el SN existe una reducción en las cargas negativas de la barrera de filtración glomerular, así como la fusión de podocitos que permiten que se manifieste la proteinuria.

El SN puede clasificarse en primario o idiopático, del cual se desconocen sus causas; y secundario que es consecuencia de otras enfermedades o alteraciones sistemáticas como lupus eritematoso, nefritis progresiva hereditaria, diabetes mellitus y alergias (1).

Esta enfermedad puede ser inducida experimentalmente en ratas por la inyección de: a) suero antiriñón, b) aminonucleósido de puromicina (ANP), c) daunomicina, o d) adriamicina (5).

Debido a que el SN inducido en ratas con ANP se parece mucho al SN de cambios mínimos encontrado en humanos, se ha utilizado como modelo para estudiarlo. Existen dos modelos de nefrosis por ANP, el modelo agudo y el modelo crónico. El modelo agudo es reversible y sólo requiere de una dosis de ANP de 50 hasta 150 mg/kg de peso corporal. Al cabo de unas semanas la proteinuria disminuye hasta desaparecer. El modelo crónico se produce con inyecciones repetidas de ANP con dosis menores a las del modelo agudo y el daño es irreversible (6-10).

El mecanismo por el cual el ANP produce el daño renal no se ha esclarecido totalmente, sin embargo se piensa que las especies reactivas de oxígeno, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido e hidróxilo, producidos después de la administración del ANP, son los responsables del daño celular (11);

En el SN humano y experimental se han observado alteraciones en el metabolismo de proteínas plasmáticas después de presentarse la proteinuria. La concentración plasmática de una proteína depende de diferentes variables como: distribución corporal, síntesis, degradación y pérdidas corporales. Se ha observado que durante el SN la velocidad de síntesis de muchas proteínas aumenta, mientras que la de otras no cambia, lo que indica que el mecanismo de regulación de síntesis proteica en el SN no es el mismo para todas las proteínas (12).

Entre las proteínas plasmáticas que se pierden por orina en el SN se encuentran la albúmina, transferrina, ceruloplasmina, hormonas, inmunoglobulinas, y factores promotores e inhibidores de la coagulación.

Se ha observado que los cambios en los niveles de las proteínas plasmáticas que se encargan de transportar metales como la ceruloplasmina, albúmina y transferrina están implicadas en las alteraciones en la concentración de cobre (Cu), zinc (Zn) y hierro (Fe), respectivamente, en el organismo durante el SN (13-19) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los niveles de metales y proteínas transportadoras.

		HUMANOS CON SN ^a	RATAS CON SN ^a	Referencia
Cu	plasma	↓, =	↓	13,14,16,18,19
	orina	↑	↑	
Zn	plasma	↓	↓	16,18, 20-24
	orina	↑, =	↑	
Fe	plasma	↓		13,17,25-28
	orina	↑		
Ceruloplasmina	plasma	↓, =	↓	14-19
	orina	↑	↑	
Albúmina	plasma	↓	↓	14,18,20,21,24
	orina	↑	↑	
Transferrina	plasma	↓	↓	14,17,25-29
	orina	↑	↑	

^a ↓ concentración disminuida; ↑ concentración aumentada; = concentración sin cambio

En humanos con SN se ha observado un incremento en la excreción urinaria de Cu, sin embargo los niveles de este mineral en suero en algunos casos no se encuentran alterados (18,19), mientras que en otros pacientes se encuentran disminuídos (13-15).

Existen pocos estudios del balance de Cu durante el SN experimental inducido con ANP en ratas. En esos estudios se encontró que hay un aumento en la excreción urinaria y una disminución en los niveles plasmáticos de Cu y de Cp (18,19), este hecho es importante ya que se ha demostrado que la Cp es la proteína que une el 90% del Cu plasmático (33).

Existe un solo estudio donde se evaluó el balance de Cu en diferentes tejidos durante el SN agudo inducido experimentalmente en ratas (18). Se encontró que los niveles de Cu disminuyen en riñón e hígado, y no cambian en cerebro pulmones, testículo, bazo y corazón (18).

Por otro lado el Zn plasmático está unido principalmente a la albúmina, y una proporción menor a α_2 macroglobulinas y aminoácidos (30). La albúmina es una de las proteínas más abundantes en la orina de pacientes con SN.

En pacientes con SN o con proteinuria en rango nefrótico se ha demostrado que la concentración de Zn sérico es menor cuanto mayor es la pérdida urinaria de proteínas y cuanto menor es el contenido plasmático de albúmina. La disminución de Zn sérico de pacientes con SN se pueden explicar fácilmente por los bajos niveles de albúmina plasmática, consecuencia del aumento de su excreción urinaria (20).

En el SN experimental inducido con ANP, Freeman *et al* (21) encontraron bajos niveles de Zn en suero y fémur; altos en orina y músculo, normales en testículo y normales o altos en riñón. También se ha podido observar en otros estudios una clara relación entre la pérdida urinaria de proteínas plasmáticas y bajos niveles circulantes de Zn. Aunque en este mismo estudio no se observaron diferencias significativas en testículo, cerebro, riñones, hígado y corazón en el contenido de Zn, en bazo y pulmones se observó una disminución del 81 y 87% del valor control, respectivamente (18).

También se ha observado que existe una relación entre la pérdida urinaria de hierro y la disminución plasmática de éste en pacientes con SN. Esta hipoferrinemia ha sido atribuida al incremento en la excreción urinaria de transferrina (13,29,25), ya que se ha demostrado que los cambios en los niveles de hierro en plasma están asociados con la disminución en la concentración de transferrina; esta misma relación se ha observado en la orina donde los niveles de transferrina están incrementados al igual que los del hierro. Sin embargo no se puede descartar que esta deficiencia de hierro se deba también a un daño en la velocidad de síntesis de la transferrina (13,28).

En humanos con SN se han hecho muy pocos estudios en relación con estos elementos (Cu, Zn y Fe). De hecho, sólo se han medido los niveles de éstos principalmente en suero y orina. Aun cuando no todos los estudios son consistentes, se ha postulado que la deficiencia de uno o más de estos elementos pudiera estar involucrada en algunas complicaciones del metabolismo. Las funciones que cumplen los elementos químicos esenciales antes mencionados son muy diversas y están involucrados en muchos procesos biológicos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. IMPORTANCIA DEL COBRE, ZINC Y HIERRO

2.1.1. COBRE

El contenido total de Cu en el cuerpo humano de un peso de 70 kg es aproximadamente de 100 mg y las más altas concentraciones se encuentran en hígado, cerebro, corazón y riñones. Los tejidos con una concentración media son el intestino grueso y el bazo; mientras que las glándulas endócrinas, músculo y hueso presentan bajas concentraciones (Tabla 2). La concentración de Cu en el plasma es aproximadamente 5 veces más alta que la del hígado, 17 μM de Cu (31).

Tabla 2. Contenido de Cu en tejidos de humanos adultos (31).

ÓRGANO	$\mu\text{g Cu / gr DE TEJIDO}$
HIGADO	6.60
CEREBRO	5.40
CORAZÓN	4.00
RIÑÓN	2.90
INTESTINO	1.80
PULMON	1.30
OVARIO	1.20
BAZO	1.20
PRÓSTATA	1.10
TIROIDES	1.00
ÚTERO	1.00
MÚSCULO	0.90
TESTÍCULO	0.90
PIEL	0.70

Una dieta normal diaria, contiene de 2 a 5 mg de Cu (30-32). El Cu absorbido es transportado en el plasma predominantemente unido a la albúmina y alrededor del 15% en la transcupreina, proteína de 270 kDa (33) y en aminoácidos o péptidos (34). Esta pequeña fracción de Cu circulante, la cual en conjunto constituye alrededor del 5 al 10% de la cantidad total de Cu presente en el plasma humano, es rápidamente tomada por el hígado donde existe un receptor de reconocimiento en la membrana altamente eficiente para la unión de albúmina-cobre. La metalotioneína fija el Cu fuertemente y es

posible que desempeñe un papel en la aceptación del Cu unido a la albúmina del plasma al hígado, fijando cerca del 80% del Cu hepático (30).

Dentro de las células del hígado, una fracción del Cu es requerida para la síntesis de Cp, superóxido dismutasa, y otras proteínas que contienen Cu, y otra fracción mayor es excretada por la bilis y una fracción pequeña por la orina (31). Tanto la excreción biliar como el liberamiento de la Cp son los principales mecanismos de regulación homeostática que controlan los niveles de Cu en el hígado (34)

El Cu y el Zn son esenciales para la función del hígado porque forman grupos prostéticos de muchas enzimas o sirven como cofactor de la activación enzimática (30). Ejemplo de esto son la citocromo oxidasa (enzima que contiene hierro y cobre), la superóxido dismutasa (la cual contiene zinc y cobre), y la alcohol deshidrogenasa y fosfatasa alcalina (Tabla 3) (32).

Muchas de las cuproenzimas catalizan reacciones fisiológicas importantes. Sin embargo, la función fisiológica de algunas incluyendo la Cp no está bien establecida. Aparte de su actividad enzimática oxidativa, la Cp contiene el 90% del Cu del plasma, por lo que se cree que tiene un papel importante en el transporte de Cu desde el hígado a órganos extrahepáticos (30).

Como se mencionó anteriormente el Cu es esencial en la dieta debido a que está involucrado en la utilización adecuada de hierro y en la síntesis de muchas enzimas (35). Se han descrito cuatro defectos en el metabolismo de hierro cuando existe deficiencia de cobre en cerdos (31):

- a) Deterioro en la síntesis de hemo a partir de Fe III y protoporfirina;
- b) deterioro de la movilización de hierro desde las células retículo endoteliales a transferrina;
- c) deterioro en la movilización de hierro desde las células parenquimales hepáticas a transferrina; y
- d) deterioro de la absorción de hierro en el tracto gastrointestinal.

Se ha reportado que la Cp desempeña cuatro diferentes funciones: actividad de amino oxidasa; actividad de ferroxidasa; actividad de superóxido dismutasa y transporte de cobre, ninguna de las cuales es mutuamente excluyente (36,37).

La síntesis de Cp se lleva a cabo en el hígado, el corazón, el cerebro y el riñón, siendo máxima la producción en el hígado que es el único órgano que la secreta hacia la circulación. No se sabe exactamente cómo y cuándo es insertado el cobre en la proteína, pero esto ocurre solo en el hígado, ya que cuando sale apoceruloplasmina a la circulación, ésta no es capaz de incorporar cobre. La síntesis de Cp se lleva a cabo en los ribosomas unidos a membrana (70).

El peso molecular de la Cp es aproximadamente de 132 kD y tiene 7 átomos de Cu por molécula. Como su nombre lo indica, se encuentra en el plasma y su concentración normal es alrededor de 15 μ M (31). Curzón y O' Reilly (38) y Osaki y colaboradores (39) reportaron que la Cp cataliza la oxidación de

hierro por lo que la llamaron ferroxidasa. Ellos también propusieron que la Cp catalizaba la oxidación del hierro en el metabolismo. Acorde con esta hipótesis, el hierro está presente en la superficie de la célula en forma ferrosa y es oxidado a férrico para unirse a la transferrina.

En humanos, la deficiencia de Cu está acompañada de los siguientes síntomas: hipercolesterolemia, leucopenia, desmineralización de hueso, anemia, fragilidad de las arterias grandes y desmielinización del tejido neural. La desmineralización del hueso y la fragilidad de los vasos sanguíneos puede estar relacionada con los defectos en la formación de colágena y elastina. La hipercolesterolemia puede ser secundaria al aumento en la relación de ácidos grasos saturados a monoinsaturados. Además se ha observado hipertrofia cardíaca (aumento de la relación peso de corazón / peso corporal) en los animales deficientes de Cu (30,32,36) (Tabla 7).

Tabla 3. Enzimas dependientes de Cu^a

NOMBRE	FUNCIÓN	CONSECUENCIAS POSIBLES O CONOCIDAS DE LA DEFICIENCIA	LUGAR DONDE SE ENCUENTRA
Citocromo oxidasa	Cadena de transporte electrónico	Debilitamiento muscular; cardiomiopatía; degeneración cerebral	Mitocondria
Superoxido dismutasa	Dismutación de radicales libres	Daños en la membrana	Ampliamente distribuida
Tirosinasa	Producción de melanina	Daños de pigmentación	Melanomas y piel
Dopamina-β-hidroxilasa	Producción de catecolaminas	Efectos neurológicos	Glándula adrenal
Lisil oxidasa	Entrecruzamiento de la colágena y de la elastina	Ruptura vascular; osteoporosis; enfisema	Aorta y cartilago
Ceruloplasmina	Ferroxidasa, amino oxidasa y transporte de cu	Anemia, y deficiencia de Cu en tejidos	Plasma
Amino oxidasa	Desaminación oxidativa de aminos por oxígeno molecular		Riñón

^a Tomado de las referencias (31,32,36).

2.1.2. ZINC

Se ha encontrado que el hígado, riñón, hueso, retina, próstata y músculo son los órganos con más altas concentraciones de zinc (Tabla 4). La concentración de zinc en el plasma es de $112 \pm 12 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$, en las células rojas es de $42 \pm 6 \mu\text{g} / \text{g}$ hemoglobina (40).

El Zn, al igual que el Cu, es una elemento esencial en el organismo. Más de 170 enzimas contienen Zn y participan en las vías metabólicas principales. Estas metaloenzimas incluyen anhidrasa carbónica, carboxipeptidasas, aminopeptidasas y fosfatasa alcalina, entre otras (37,40,41) (Tabla 5).

Tabla 4. Concentración de Zn en algunos tejidos de humano y rata

TEJIDO	HUMANO ^a	RATA ^b
	µg Zn / g de peso seco	µg Zn / g de peso seco
HÍGADO	141-245	101 ± 13
RIÑÓN	184-230	91 ± 3
PULMÓN	67-86	81 ± 3
MÚSCULO	197-226	45 ± 5
PÁNCREAS	115-135	
CORAZÓN	100	73 ± 16
HUESO	218	168 ± 8
PRÓSTATA	520	
RETINA	571	
TESTÍCULO		176 ± 12
ESÓFAGO		108 ± 7

^a Distribución media de valores publicados

^b Valores expresados como media ± DE, tomado de la referencia 40

El Zn es esencial también para la síntesis de ADN, ARN y síntesis de proteínas. Este elemento estabiliza las membranas y ribosomas celulares durante la síntesis proteica; se requiere para la actividad de la polimerasa de ADN y ARN, y es esencial en la espermatogénesis y formación de óvulos (37, 38).

Tabla 5. Algunas enzimas dependientes de Zn.

ENZIMA	PAPEL DEL ZN ^a	COMENTARIO
Alcohol deshidrogenasa	C,E	También la retinol deshidrogenasa
Superóxido dismutasa	E	Actividad citosolica
Fosfatasa alcalina	C,E	En hueso, mucosa intestinal, hígado
Fructosa 1,6-difosfatasa	R,E	Gluconeogénesis
Aminopeptidasas	C	Hidrólisis de proteínas
Carboxipeptidasas	C	
Anhidrasa carbónica	C	Transporte de dióxido de carbono
Lactato deshidrogenasa	C	Glicólisis
Algunos factores de transcripción	E,(?R)	Conformación de los dedos de Zn
Malato deshidrogenasa	C	Ciclo de Krebs

^a C: catalítica; R: regulador; E: estructural.

Tomado de la referencia (41).

En la circulación portal el Zn se asocia a la albúmina, α^2 -macroglobulina y aminoácidos. Dos tercios del Zn presente en plasma están unidos a la albúmina. Una pequeña fracción del Zn total del cuerpo, aproximadamente el 3%, se almacena en el hígado. El jugo pancreático es una importante ruta de excreción del Zn, con una pequeña participación de la bilis y de la excreción fecal (30).

Es probable que el Zn sea tomado por los hepatocitos, unido a la albúmina y/o en su forma iónica, por una vía saturable dependiente de energía. En general, el músculo y los huesos representan grandes reservas de Zn. El Zn celular está distribuido entre varias metaloproteínas, organitos, macromoléculas y en membranas. Probablemente el Zn sólo retorna al plasma cuando en el hueso es movilizado para mantener la homeostasis del calcio. Un marcado incremento en el catabolismo del músculo puede favorecer la pérdida urinaria de Zn. La respuesta aguda al estrés fisiológico e infección involucra un decremento en la concentración plasmática de Zn, con una concomitante redistribución por los hepatocitos (43).

La salida de Cu y Zn del hígado indudablemente depende de muchos factores, especialmente intracelulares que pueden favorecer la retención de estos metales dentro de las células, y la disponibilidad de los ligandos en circulación que puedan transferir estos metales desde los hepatocitos. Aunque no se sabe con seguridad cuáles son los ligandos, se ha propuesto que la albúmina y algunos aminoácidos podrían ser los encargados de este transporte (43)

En los animales como la res y al rata, la deficiencia de Zn se manifiesta por retardo del crecimiento, pérdida de pelo, engrosamiento e hiperqueratinización de la epidermis y atrofia testicular; en los niños por deterioro del crecimiento y del desarrollo sexual y en los adultos y niños por retardo en la cicatrización (40) (Tabla 7).

2.1.3. HIERRO

El hierro ha sido considerado como uno de los elementos más importantes que constituyen a los seres vivos. El hierro está involucrado en la transferencia de electrones y en la transducción de energía formando parte de citocromos oxidables; en la activación del oxígeno, del nitrógeno y del hidrógeno moleculares; y en la formación de complejos con el oxígeno como parte constitutiva de proteínas especializadas en el transporte de este gas, como son la mioglobina y la hemoglobina, donde se encuentra alrededor de las dos terceras partes del hierro total de un organismo (44) (Tabla 6).

Dependiendo del pH y de la composición iónica de los fluidos fisiológicos, el hierro se encuentra en su mayor parte en plasma, en forma férrica (Fe^{3+}), siendo poco soluble, por lo que es necesario contar con un sistema de transporte así como de almacenaje para este elemento.

La transferrina es una glicoproteína de peso molecular entre los 78,000 y 80,000 Da cuyo centro principal de producción es el hígado, aunque puede sintetizarse también en médula ósea y bazo (46). Esta proteína es la encargada de la absorción y del transporte de hierro en plasma hacia los sitios de absorción, almacenamiento, utilización y excreción; ya que a pH fisiológico tiene una afinidad elevada por el hierro. El almacenaje de hierro ocurre en dos formas: en una proteína soluble llamada ferritina, cuya estructura tridimensional tiene una gran capacidad de retención de átomos de hierro, se encuentra principalmente en hígado, bazo, médula osea, suero y en células rojas; o como parte de la hemosiderina, que es una proteína no soluble, que se encuentra en forma de gránulos en hígado y médula ósea (47-48).

Tabla 6. Proteínas que contienen hierro^a

PROTEÍNA	DISTRIBUCIÓN	FUNCIÓN
Catalasa	Células rojas, peroxisomas	Descomposición de peróxido
Lactoperoxidasa	Leche	Descomposición de peróxido
NADH deshidrogenasa	Mitocondria	Transporte electrónico
Xantin oxidasa	Leche, tejidos	Hipoxantina → ácido úrico
Transferrina	Plasma	Transporte de hierro
Lactoferrina	Leche, secreciones	Transporte de hierro
Ferritina	Hígado, bazo, médula	Almacenaje de hierro
Hemosiderina	Hígado, bazo, médula	Almacenaje de hierro

^a Tomado de la referencia (49)

La distribución del hierro en el cuerpo humano es de 60 a 75% en la hemoglobina (eritrocitos), 5% en mioglobina, menos del 0.5% en enzimas que contienen hemo, 10% en enzimas sin hemo (incluyendo a la ferritina y la hemosiderina), y menos de 0.1% circulante, unido a la transferrina.

El almacenamiento de ferritina y hemosiderina en hígado, bazo y médula ósea, representan del 20 al 30% de las reservas de hierro. El hierro, tanto de la ferritina como de la hemosiderina, puede ser utilizado para la formación de hemoglobina. El hierro recientemente depositado en médula osea es utilizado para eritropoyesis.

El organismo no dispone de medios para eliminar cantidades importantes de hierro; sólo cantidades mínimas, del orden de 1 mg al día por medio de la descamación de las células de la piel y el tubo

digestivo, por migración de leucocitos hacia la luz intestinal, por la pérdida de cabello y por la excreción de mínimas cantidades de hierro en la orina, heces, bilis y sudor (49).

Los cambios en los niveles de hierro y transferrina en plasma que ocurren en la deficiencia de hierro puede llevar a efectos profundos en su metabolismo. Generalmente cuando existe una deficiencia de hierro o atransferrinemia se presenta una severa anemia hipocrómica microcítica (50).

Tabla 7. Consecuencias de la deficiencia de Cu, Zn y Fe.

DEFICIENCIA	CONSECUENCIAS
Cu ^a	Alteración en el metabolismo de hierro, anemia, neutropenia, leucopenia, fragilidad de las arterias grandes, hipercolesterolemia
Zn ^b	Dermatitis, alopecia, anemia, atrofia testicular, retardo en el crecimiento, anorexia, hiperpigmentación, hipogammaglobulinemia
Fe ^c	Anemia, eritropoyesis anormal, hipertrofia cardiaca, retardo en el crecimiento, respuesta inmune alterada

^a Tomado de la referencia (19)

^b Tomado de la referencia (38)

^c Tomado de la referencia (46)

3. OBJETIVOS

1. Generales

En ratas con SN agudo inducido con ANP:

1.1. Establecer si la pérdida urinaria de Cu, Zn y Fe, está asociada a la pérdida de sus proteínas transportadoras y si los cambios en las concentraciones de los minerales en plasma se relacionan con los cambios en las concentraciones de sus proteínas transportadoras.

1.2. Investigar si la pérdida urinaria de proteínas en ratas con síndrome nefrótico agudo experimental conduce a una deficiencia de Cu, Zn y Fe en los tejidos, y de ser así, establecer cuál(es) puede(n) ser su(s) posible(s) mecanismo(s) : (a) pérdidas urinarias, (b) pérdidas fecales, (c) disminución en el consumo de alimento, o una combinación de ellos, y si existen evidencias fisiológicas de esta deficiencia, tales como la anemia.

2. Específicos

2.1. Medir la excreción urinaria y fecal de Cu, Zn y Fe, la ingesta dietaria de estos minerales y la excreción urinaria de sus proteínas transportadoras ceruloplasmina, albúmina y transferrina, respectivamente, durante 10 días, posteriores a la inducción de SN en ratas.

2.2. Determinar si hay alteraciones en las concentraciones de (a) Cu, Zn y Fe en plasma, orina, heces, eritrocitos, pelo, músculo, riñón, hígado, corazón, pulmón, testículo, bazo, cerebro y fémur y de (b) ceruloplasmina, albúmina y transferrina en plasma y orina.

2.3. Estudiar la correlación entre (a) la excreción de proteínas totales y cada uno de estos minerales en la orina y (b) la excreción de Cu, Zn y Fe y de sus proteínas transportadoras ceruloplasmina, albúmina y transferrina, respectivamente.

2.4. Determinar si hay correlación entre la concentración circulante de estos minerales con la de sus proteínas transportadoras.

4. HIPÓTESIS

En ratas con síndrome nefrótico experimental agudo inducido con aminonucleósido de puromicina :

1. La proteinuria estará asociada a la pérdida urinaria de los elementos cobre, zinc y hierro.
2. La pérdida de los elementos cobre, zinc y hierro será consecuencia de la pérdida urinaria de sus proteínas transportadoras ceruloplasmina, albúmina y transferrina, las cuales disminuirán en el plasma.
3. La proteinuria conducirá a una deficiencia de cobre, zinc y hierro en diversos tejidos y a la aparición de algunos signos de esta deficiencia como la anemia.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

A. REACTIVOS

Los siguientes reactivos fueron comprados en *Sigma Chemical Co.*: aminonucleósido de puromicina (# cat. P-7130), reactivo de Folin-fenol y Ciocalteu (# cat. F-9252), albúmina sérica bovina fracción V (# cat. A-450), y 1,10-fenantrolina monohidratada (# cat P-9375).

El cloruro de sodio (# cat. 3624-01), el sulfato de cobre (# cat. 1843), el ácido tricloroacético (# cat 0414), ácido nítrico al 66.4% para lavado de material (# cat. 9601-05) se compraron en *J.T. Baker*.

En *Mallinckrodt* se compraron: el carbonato de sodio (# cat 7527) y el tartrato de sodio y potasio (# cat. 2367).

Las soluciones estándar de cobre de 1000 ppm \pm 1%, zinc de 1000 ppm \pm 1% y hierro de 1000 ppm 1 \pm % se compraron en *Fisher Chemical*.

El N,N-dimetil-1,4-fenilendiamina (# cat 21923-1) se compró en *Aldrich Chemical Company, Inc.*

El ácido nítrico de alta pureza al 69.5% (# cat. 84385) se compró en *Fluka Chemika-BioChemika*.

Todos los demás reactivos son grado R.A. y se adquirieron comercialmente.

En todo el estudio se usó agua destilada y desionizada (resistencia=18.2 Ω) obtenida de un equipo *Milli Q (Millipore)*.

B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 20 ratas macho Wistar de 240 a 250 g de peso corporal (aprox. 3 meses de edad) las cuales se dividieron en dos grupos: 10 ratas que sirvieron de control y 10 para la inducción del síndrome nefrótico (SN). El síndrome nefrótico se indujo por una sola inyección subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP) disuelto en solución salina fisiológica (15 mg / 100 g peso corporal). Las ratas control recibieron el mismo volumen de vehículo. El estudio se inició cuando se aplicó la inyección del ANP (día 0). Todas las ratas se pesaron y se colocaron en jaulas metabólicas para determinar el consumo de alimento y realizar la recolección de orina y heces de 24 h. Estas mismas determinaciones se realizaron diariamente hasta el día 10, día en el cual se llevó a cabo el sacrificio. Las ratas se anestesiaron con éter y posteriormente se obtuvo sangre por punción cardíaca usando heparina como anticoagulante. Se tomó pelo de la parte ventral del animal en una área aproximada de 4x12 cm. Posteriormente se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los siguientes tejidos: riñón, hígado, corazón, pulmón, testículos, bazo, cerebro, fémur y una porción de músculo que rodea a este hueso. Todas las muestras se mantuvieron a -80°C hasta la determinación correspondiente.

Todas las muestras en las que se determinaron minerales se recolectaron en material previamente purgado con ácido nítrico 6 N durante 24 h y enjuagado con agua desionizada para eliminar los elementos traza.

C. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

C.1. ORINA

Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 min., posteriormente se determinaron proteínas totales, concentración de Cu, Zn y Fe; ceruloplasmina, albúmina, transferrina y creatinina.

C.2. SANGRE

Se realizaron las determinaciones hematológicas en una muestra de sangre fresca. El resto de la sangre se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 min. para obtener plasma y eritrocitos. En el plasma se determinaron: proteínas totales, ceruloplasmina, albúmina, transferrina, colesterol, nitrógeno de urea, creatinina, Cu, Zn y Fe. A las muestras para la determinación de ceruloplasmina se les adicionó 50 μ l de ácido ϵ -amino caproico 2 M para evitar la acción de proteasas. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con NaCl al 0.9% para la determinación de minerales.

C.3. HECES

Estas muestras se llevaron a peso constante en una estufa a 100°C, posteriormente se homogeneizaron en un molino y se digirieron como se explicará más adelante, para eliminar la materia orgánica y determinar el contenido de minerales

C.4. TEJIDOS

Cada uno de los tejidos extraídos se lavó con NaCl al 0.9% para eliminar el exceso de sangre. Para realizar las determinaciones de minerales se llevaron a peso constante a 100°C y posteriormente se sometieron a digestión de materia orgánica.

C.5. PELO

El pelo se lavó con 150 ml de una solución no iónica de Tritón X-100 al 1%, se mantuvo en esta solución por 30 min. con agitación constante y posteriormente se enjuagó con un litro aproximadamente de agua desionizada, después se llevó a peso constante en una estufa a 100°C durante 24 h, y finalmente se realizó la digestión de la materia orgánica.

C.6. ALIMENTO

Para determinar el consumo de minerales se tomaron dos porciones de 0.5 g de alimento, cada vez que se cambió el saco del mismo durante el experimento. Estas porciones también se llevaron a peso constante y se homogeneizaron cada una de ellas para posteriormente eliminar la materia orgánica por digestión.

C.7. DIGESTIÓN

El primer paso para la determinación de los minerales en las muestras es el de digestión, la cual se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron en frascos de teflon de 50 ml, 0.5 gr. de muestra (tejidos, orina, suero, eritrocitos, heces y alimento) y se le agregaron 4 ml de ácido nítrico de alta pureza, 2 ml de peróxido de hidrógeno y la digestión se hizo en un horno de microondas (mod. mls 1200 mega de Milestone, Microwave, Laboratory Systems) con 6 frascos de teflon (capacidad del rotor, HPR 1000/6), con el siguiente programa:

SECUENCIA	1er PASO	2o PASO	3er PASO	4o PASO	5o PASO
Potencia	250 watts	0 watts	250 watts	400 watts	400 watts
Tiempo	1 min.	1 min.	8 min	5 min.	5 min.

Este programa es una modificación del original recomendado por el manual del equipo, ya que no se necesita tanto tiempo para llevar a cabo la digestión completa.

Posteriormente, el rotor se dejó enfriar por 30 minutos haciendo circular agua de la llave, cada uno de los frascos se ventiló abriéndolo lentamente con el maneral para liberar la presión. La solución resultante se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml en el caso de tejidos, eritrocitos, heces y alimento y de 10 ml para orina y suero y se aforó con agua desionizada. La solución resultante se guardó en frascos de polietileno.

D. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

D.1. MINERALES

La determinación de Cu, Zn y Fe en las soluciones obtenidas después de la digestión se hizo en un espectrofotómetro de emisión atómica acoplado inductivamente a plasma de tipo secuencial (ICP) por sus siglas en ingles (Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy) (Jobin-Yvon-24). El fundamento de esta técnica se basa en la capacidad de las especies químicas de absorber o emitir luz debido a los átomos presentes, la fuente de emisión del ICP es un plasma que es un sistema de ionización muy caliente de gas argón, que fluye a través de un tubo de cuarzo envuelto con un alambre de cobre, el cual, mediante energía, crea un campo magnético dentro del tubo. La ionización del gas comienza con una chispa en la parte de arriba del tubo de cuarzo, causando que el argón produzca iones y electrones que fluyen a través del tubo y junto con el campo magnético creado produce más ionización y el gas comienza a calentarse extremadamente (9000-10000 °K). Cuando el gas emerge del tubo se produce una nube de iones de argón.

Las muestras y estándares, en forma de solución, son introducidos dentro del flujo de argón por aspiración justo antes de la ionización inicial (Fig.2).

Figura 2. Esquema del funcionamiento del ICP

La fuente caliente del ICP produce eficientemente la atomización y la excitación de los átomos, por lo tanto, la emisión es mucho más intensa y las concentraciones más pequeñas de iones metálicos son detectados y medidos con precisión.

Las curvas patrón para determinar los minerales en las muestras fueron las siguientes:

	Zn (ppm)			Fe (ppm)			Cu (ppm)		
	0.1	0.5	5.0	0.1	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0
TEJIDOS	0.1	0.5	5.0	0.1	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0
ORINA Y PLASMA	0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	1.0
ERITROCITOS	0.05	0.5	5.0	0.1	0.5	30	0.05	0.5	1.0
ALIMENTO Y HECES	0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	1.0

D.2. PROTEÍNAS TOTALES

Para la determinación de las proteínas totales en suero y orina se empleó el método de Lowry y colaboradores (45), utilizando como patrón albúmina sérica de bovino (5 a 50 $\mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$) . El reactivo forma un complejo proteína-cobre en solución alcalina, y en una segunda fase el complejo se reduce a un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Fenol de Folin y Ciocalteu) para producir un color azul fácilmente detectable a 660 nm.

Soluciones empleadas:

Solución A: Carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio al 0.4%, tartrato de sodio y potasio al 0.02%.

Solución B: Sulfato de cobre al 0.5%

Solución C: 50 ml de sol. A más 1 ml de sol. B (se prepara al momento).

Solución D: Reactivo de Folin & Ciocalteu 1N.

Solución E: Solución patrón de albúmina sérica de bovino 50 mg/100 ml. la cual se usa para construir la curva patrón. En la figura 3 se encuentra la curva patrón de albúmina sérica bovina.

Las proteínas urinarias se precipitaron y lavaron con ácido tricloroacético al 10%. La determinación de proteínas se realizó después de resuspenderlas en hidróxido de sodio 0.6 N. En orina se hizo una dilución 1:300 para realizar la determinación; en el caso del suero se realizó después de una dilución 1:400 con agua destilada.

Procedimiento:

El volumen final de la muestra es de 0.2 ml. Se le añade 1 ml de la solución C, se deja reposar durante 10 minutos, después se añade 0.1 ml de la solución D y se agita inmediatamente en un vortex, se deja reposar por 30 minutos y se lee la D.O. a 660 nm contra el blanco y se expresan los resultados como mg/24 h en el caso de la orina y g/100 ml para el suero.

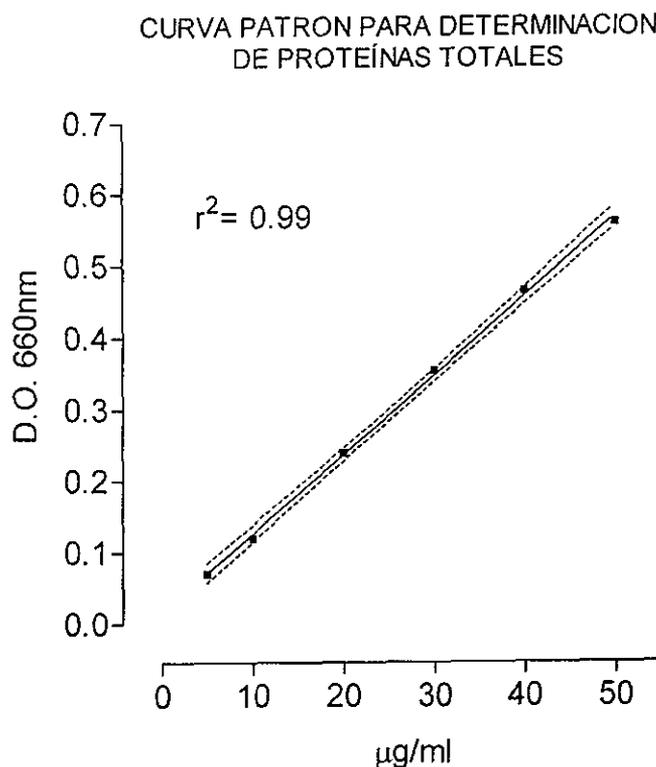


Figura 3. Curva patrón de albúmina para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry

D.3. CERULOPLASMINA

El método está basado en la capacidad de la ceruloplasmina de oxidar el sustrato N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DPD) convirtiéndolo en una base de Brandowski que es el último producto de la

oxidación y que presenta una coloración rosa fácilmente detectable en el espectrofotómetro a 550 nm (38,51)

El procesamiento es el siguiente : Se mezclaron 2 ml de amortiguador de acetatos 0.2 M a pH 5.5 que contiene 1,10 fenantrolina 1 mM con 1 ml de agua desionizada, 1 ml de plasma u orina diluidos 1:10 con NaCl 0.1 M y 1 ml de DPD 1.7 mM. La mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 15 min. La reacción se detuvo por la adición de 2 ml de azida de sodio 0.3 mM en NaCl al 10% frío. La determinación de ceruloplasmina en orina se realizó en muestras de orina dializadas previamente. El material que se utilizó para la determinación de ceruloplasmina se trató previamente con Extrán MA-03 (Merck) exento de fosfatos para eliminar el hierro presente, ya que es un factor que puede interferir en las determinaciones.

D.4. ALBÚMINA Y TRANSFERRINA

La determinación de albúmina y transferrina se realizó por inmunodifusión radial (52-53), usando el estuche comercial de ICN Biomedicals, Inc.. El principio de esta técnica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. La albúmina y la transferrina difundieron en forma pasiva en una fase estacionaria formando anillos de precipitación, el diámetro de estos anillos será proporcional a la concentración de albúmina y transferrina. El valor del diámetro obtenido de nuestras muestras se interpoló en una curva estándar; ésta se construyó con el diámetro al cuadrado de los estándares que en el caso de la albúmina es de 140 mg hasta 720 mg/dl y en el de transferrina es de 57 mg a 380 mg/dl. En la figura 4 se encuentran las curvas estándares de albúmina y transferrina. Se colocaron 5 µl de plasma u orina directos para medir transferrina ó diluido 1:10, 1:20 ó 1:40 para albúmina, las placas se incubaron a temperatura ambiente y en una cámara húmeda por 18 horas.

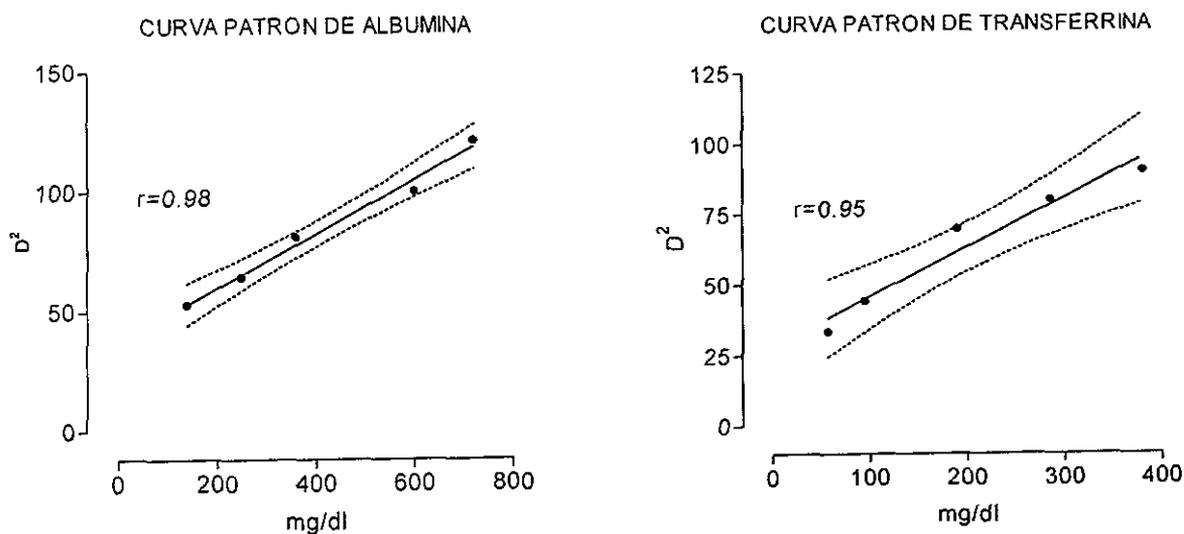


Figura 4. Curva patrón de albúmina y transferrina por el método de inmunodifusión radial

D.5. BIOMETRÍA HEMÁTICA

La biometría hemática se realizó en un equipo automatizado Coulter Counter modelo ZF (Coulter Electronics) en el cual mediante un manómetro de mercurio se hace fluir por un orificio de dimensiones fijas, un volumen constante de partículas suspendidas en un electrolito. Una corriente de flujo pasa entre el electrodo situado en el tubo que forma el orificio y otro fuera. Cada vez que una partícula pasa por el orificio, disminuye la conductividad del electrolito entre los dos electrodos, provocando un impulso cuya amplitud es proporcional al volumen de las partículas cuyo tamaño es superior al umbral, esto equivale a contar el número de partículas de tamaño umbral que pasan por el orificio.

Cada muestra se preparó con heparina como se mencionó anteriormente para evitar la coagulación, posteriormente se realizó una dilución de 1:500 para la lectura de leucocitos y 1:5000 para eritrocitos. Para las lecturas de leucocitos y hemoglobina se rompieron los eritrocitos con ZAP-OGLOBIN II y se leyeron los leucocitos en el Coulter Counter y la hemoglobina en un hemoglobinómetro a 545 nm.

D.6. RETICULOCITOS

Se determinó el porcentaje de reticulocitos en una laminilla de sangre teñida con azul de cresilo brillante, en un microscopio modelo Spencer, American Optical Corporation, con un objetivo de inmersión 100x, N.A. 1.25 donde se contaron 500 células (eritrocitos + reticulocitos) para obtener el porcentaje.

D.7. CREATININA

La creatinina, urea y el colesterol se midieron en un fotómetro 40/30 de Lakeside. La creatinina se midió por el método de picrato alcalino con el estuche comercial "Creatinina" Test-Combinación (Farmacéuticos Lakeside); se inyectaron 200 μ l de plasma u orina en la celda del fotómetro, la creatinina de la muestra reaccionó con el ácido pícrico en medio alcalino y produjo un complejo de color rojo (reacción de Jaffé). Se midió la velocidad del aumento de absorción debido a la formación del complejo alcalino de picrato de creatinina. La velocidad de formación del complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra; la lectura se realizó a 510 nm.

D.8. NITRÓGENO DE UREA

La urea se cuantificó con el estuche comercial "UREA" MPR 2 (Farmacéuticos Lakeside). Se basa en una reacción enzimática que mide el de cambio en la conductividad en la celda de reacción. Se inyectaron 200 μ l de la muestra con la ureasa en la celdilla de reacción. El resultado de la reacción es la conversión de la especie no iónica (urea) en una iónica (carbonato de amonio), la cual aumenta la conductividad de la solución. El electrodo del aparato mide el aumento en la conductividad de la celda de reacción. Esta velocidad es proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra, posteriormente se hizo el cálculo para obtener el nitrógeno de urea que fue el que se reportó.

D.9. COLESTEROL

La determinación del colesterol se realizó con el estuche comercial "Monotest" colesterol CHOD-PAP (Farmacéuticos Lakeside) que es una prueba enzimática colorimétrica. El método se basa en reacciones enzimáticas sobre los ésteres de colesterol y los productos de su hidrólisis para producir una quinonimina roja con absorbencia máxima a 505 nm. Se pusieron 200 µl de muestra en el autoanalizador.

E. CÁLCULOS

E.1. CONCENTRACIÓN DE MINERALES

Para determinar la concentración de minerales de las muestras se siguió la siguiente fórmula:

$$[\text{Mineral } \mu\text{g/g ó } \mu\text{g/ml}] = \frac{(\text{VALOR DE LA MUESTRA PPM}) (\text{VOLUMEN DE AFORACION})}{\text{g MUESTRA ó ml MUESTRA}}$$

Donde el valor de la muestra en ppm es el resultado de la interpolación de la curva patrón con la que se calibra en ICP.

E.2. CONCENTRACION DE CERULOPLASMINA

El contenido de ceruloplasmina en las muestras se calculó de la siguiente manera:

$$[\text{Ceruloplasmina mg/ml}] = \frac{(\text{ABSORBANCIA DE LA MUESTRA}) (\text{DILUCIÓN})}{6.3}$$

Donde 6.3 es el factor que convierte unidades de absorbencia-actividad en mg de ceruloplasmina ya que el valor reportado de 1 mg de ceruloplasmina = 63 unidades de actividad y 1 unidad de actividad = 0.1 unidades de absorbencia a 550 nm.

E.3. DEPURACION DE CREATININA, MINERALES Y PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Para calcular la depuración tanto de creatinina como de minerales y proteínas transportadoras se utilizó la siguiente fórmula general:

$$\text{Depuración (ml/min)} = \frac{\text{CONCENTRACIÓN EN ORINA (mg/ml)}}{\text{CONCENTRACIÓN EN SUERO}} \times \text{flujo urinario (ml/min)}$$

E.4. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE MINERALES Y PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Para calcular la excreción fraccional se utilizó la siguiente fórmula general:

$$\text{Excreción fraccional} = \frac{\text{DEPURACIÓN DEL MINERAL O PROTEÍNA TRANSPORTADORA}}{\text{DEPURACIÓN DE CREATININA}}$$

A partir de las determinaciones de proteínas totales y transportadoras y así como los minerales correspondientes se realizaron los siguientes cálculos:

E.5. COCIENTE MINERAL/PROTEÍNA TRANSPORTADORA

Cociente de 1. Cu/Cp, 2. Zn/albúmina y 3. Fe/transferrina.

E.6. CORRELACIÓN MINERAL VS PROTEÍNAS TOTALES Y MINERAL VS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Se realizaron las siguientes correlaciones: 1. Cu vs proteínas totales, 2. Zn vs proteínas totales, 3. Fe vs proteínas totales, 4. Cu vs Cp, 5. Zn vs albúmina y 6. Fe vs transferrina.

E.7. BALANCE DE MINERALES

El balance fue usado para evaluar el estatus de los minerales (54-59), y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Balance (\%)} = \frac{\text{CONSUMO DEL MINERAL} - (\text{MINERAL EN LAS HECES} + \text{MINERAL EN ORINA})}{\text{CONSUMO DEL MINERAL}} \times 100$$

F. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos se expresaron como media y desviación estándar y como coeficientes de correlación en su caso. Las comparaciones entre el grupo control y el experimental se realizaron por una prueba de t no pareada. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

6. RESULTADOS

La tabla 8 muestra los resultados de las determinaciones bioquímicas realizadas al final del periodo de estudio. Las ratas inyectadas con aminonucleósido de puromicina (15 mg/100 g) desarrollaron hipoproteinemia, hipercolesterolemia, proteinuria, aumento del volumen urinario, de la concentración de creatinina y nitrógeno de urea en suero y disminución de la depuración de creatinina. Los datos anteriores indican que las ratas desarrollaron síndrome nefrótico (SN).

Tabla 8. Datos bioquímicos al día del sacrificio

Determinación		Control	n	Nefróticas	n	Valor de p
Suero						
Proteínas totales	g/dl	7.10 ± 0.62	9	3.66 ± 0.80	10	< 0.001
Colesterol	mg/dl	80.53 ± 11.21	9	366.09 ± 82.76	8	< 0.001
Creatinina	mg/dl	0.57 ± 0.10	9	1.16 ± 0.53	7	< 0.05
Nitrógeno de urea	mg/dl	22.52 ± 4.48	9	51.37 ± 20.02	8	< 0.001
Orina						
Proteínas totales	mg/24 h	23.80 ± 5.70	9	906.60 ± 244.00	10	< 0.001
Volumen	ml/24 h	14.13 ± 1.5	10	30.50 ± 5.22	10	< 0.001
Depuración de creatinina	ml/min	1.37 ± 0.31	9	0.94 ± 0.544	6	< 0.001

El registro del peso corporal del grupo nefrótico y control se muestra en la figura 5. El peso corporal se mantuvo significativamente por debajo del grupo control a partir del día 2 hasta el final del estudio. El volumen urinario disminuyó los días 4 y 6 y aumentó significativamente los días 8 y 10 (fig. 6).

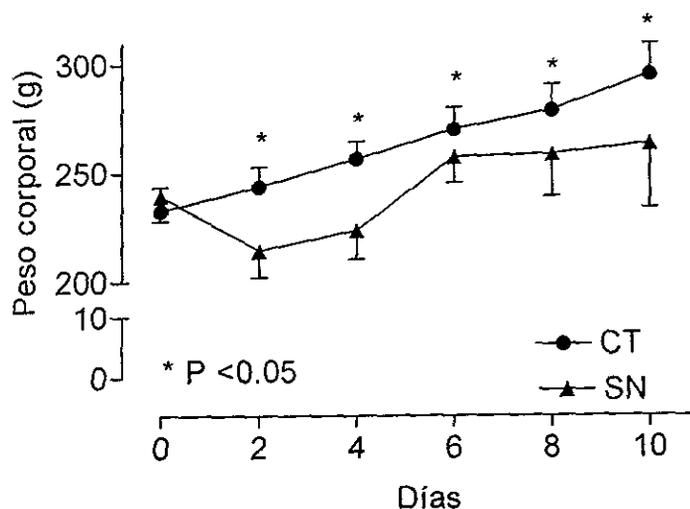


Figura 5. Peso corporal de ratas controles (CT) y nefróticas (SN)

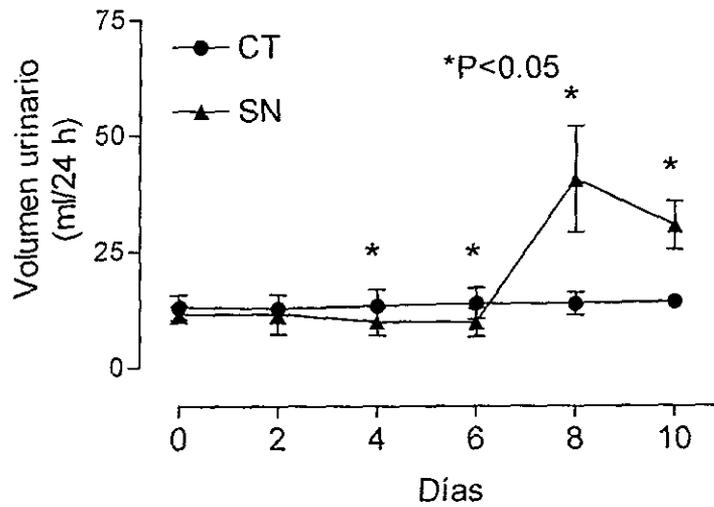


Figura 6. Volumen urinario de ratas controles (CT) y nefróticas (SN).

La proteinuria se hizo evidente 4 días después de la inyección de ANP, y alcanzó su valor máximo el día 8 (1017.50 ± 186.20 mg/24 h) (fig. 7). En las figs. 8-10 se aprecia el curso temporal de la excreción de Cu, Zn y Fe en las ratas con SN. La excreción de estos tres minerales aumentó claramente en los días 6-10. La excreción de Cu disminuyó ligeramente en los días 2 y 4 y la excreción de Fe aumentó ligeramente el día 4.

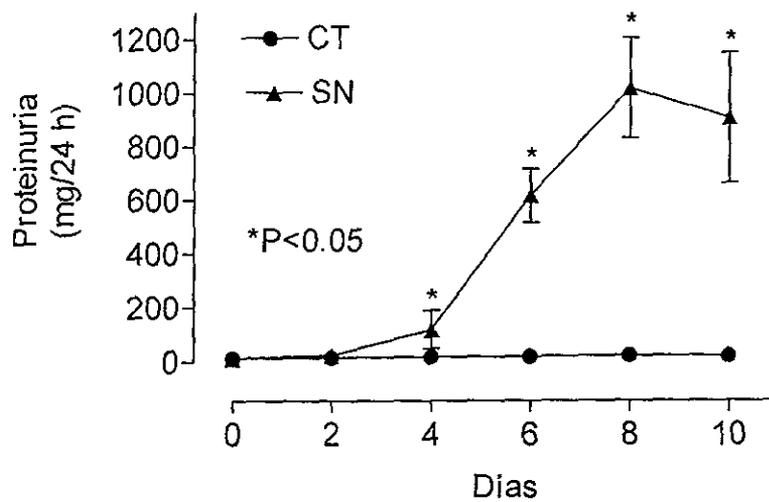


Figura 7. Proteínas urinarias de ratas controles (CT) y nefróticas (SN).

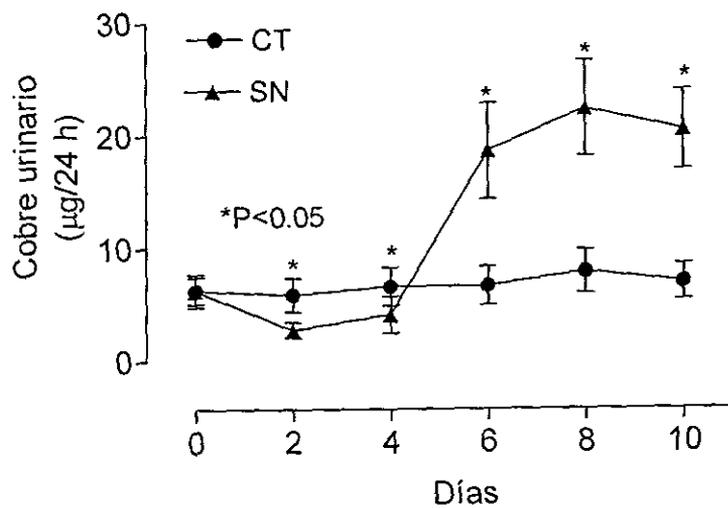


Figura 8. Excreción urinaria de Cu de ratas controles (CT) y nefróticas (SN).

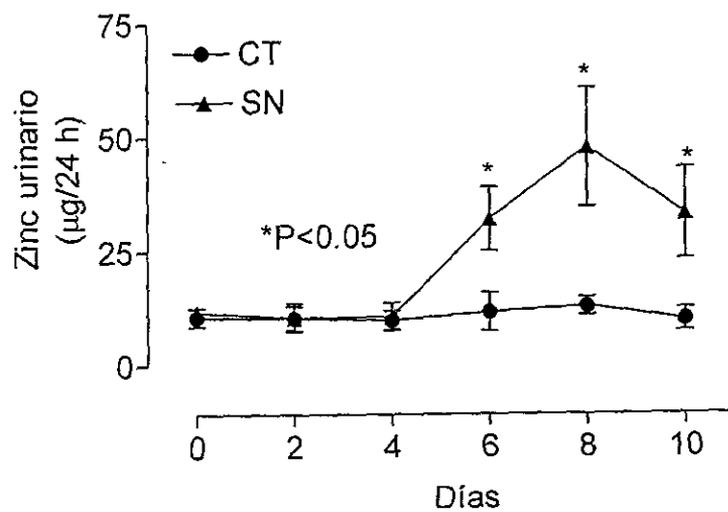


Figura 9. Excreción urinaria de Zn en ratas controles (CT) y nefróticas (SN).

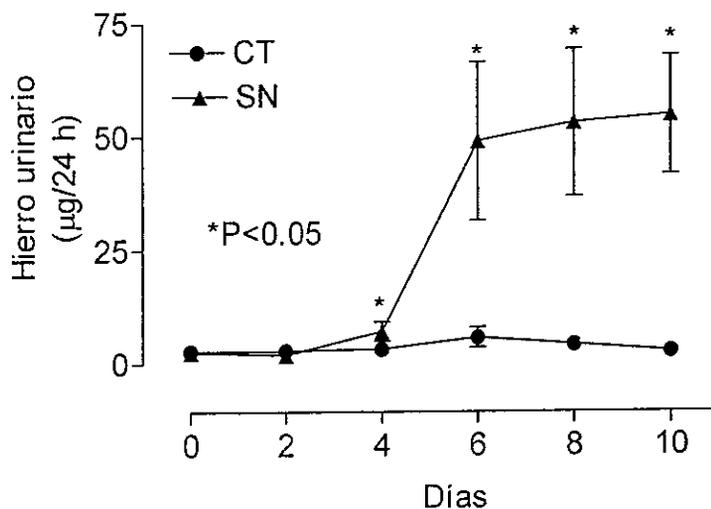


Figura 10. Excreción urinaria de Fe en ratas controles (CT) y nefróticas (SN).

La proteinuria (mg/24 h) presentó una correlación positiva con la excreción urinaria de Cu, Zn y Fe ($r^2=0.80$, $p<0.0001$); ($r^2=0.7665$, $p<0.0001$) y ($r^2=0.6425$, $p<0.0001$), respectivamente. Esto nos indica que, al aumentar la proteinuria, aumenta la excreción urinaria de minerales (fig. 11-13).

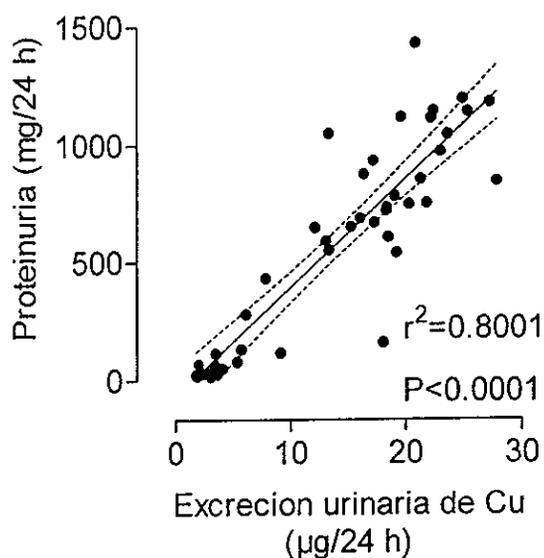


Figura 11. Correlación de la proteinuria y la excreción de Cu en ratas con SN.

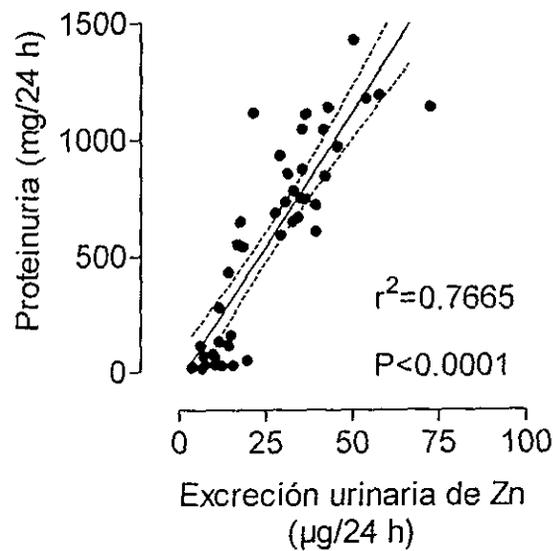


Figura 12. Correlación de la proteinuria y la excreción urinaria de Zn en ratas con SN.

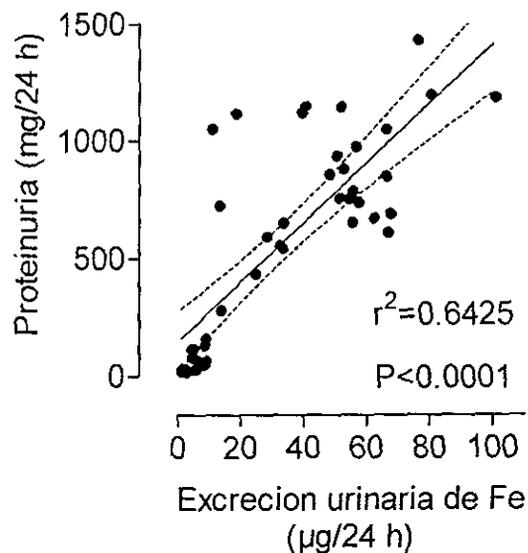


Figura 13. Correlación de la proteinuria y la excreción urinaria de Fe en ratas con SN.

La concentración sérica de Cu disminuyó aproximadamente 3 veces y la de Zn y Fe disminuyó aproximadamente 2 veces. La depuración y excreción fraccional de los tres minerales aumentó significativamente: 5 y 14 veces para Cu, 7 y 12 veces para Zn y 32 y 30 veces para Fe respectivamente en las ratas con SN (tabla 9).

Tabla 9. Concentración en suero y depuración y excreción fraccional de Cu, Zn y Fe.

	Control	n	Nefróticas	n	Valor de p
Cu					
Suero $\mu\text{g/dl}$	80.44 ± 18.72	10	29.33 ± 12.32	9	< 0.001
Depuración ml/min	0.0043 ± 0.0014	10	0.021 ± 0.008	9	< 0.001
Excreción fraccional	0.0034 ± 0.0013	9	0.048 ± 0.036	7	< 0.05
Zn					
Suero $\mu\text{g/dl}$	106.69 ± 24.73	10	48.95 ± 15.34	8	< 0.001
Depuración ml/min	0.0047 ± 0.0016	10	0.03 ± 0.0078	6	< 0.001
Excreción fraccional	0.0038 ± 0.0015	9	0.046 ± 0.033	5	< 0.05
Fe					
Suero $\mu\text{g/dl}$	340.35 ± 152.15	10	186.53 ± 40.14	5	< 0.05
Depuración ml/min	0.00057 ± 0.00027	8	0.0185 ± 0.007	6	< 0.001
Excreción fraccional	0.00049 ± 0.00025	8	0.015 ± 0.0036	5	< 0.05

En las figuras 14-16 se aprecia el curso temporal de la excreción urinaria de las proteínas transportadoras ceruloplasmina, albúmina y transferrina. Se puede apreciar que la excreción de albúmina y transferrina aumentó desde el día 4, sin embargo no se pudo hacer un análisis estadístico en virtud de que estas dos proteínas no se pudieron detectar en las muestras de ratas controles por el método de inmunodifusión radial. En cambio, la ceruloplasmina sí se pudo medir en las ratas controles y, por tanto, sí se pudo realizar el análisis estadístico. La excreción urinaria de esta proteína aumentó en los días 6-10, de 2 a 5 veces, alcanzando un pico de excreción el día 8 en las ratas con SN.

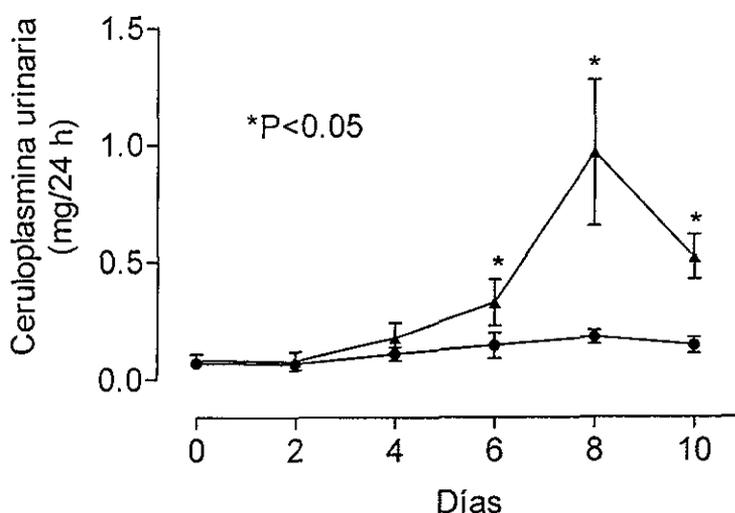


Figura 14. Excreción urinaria de ceruloplasmina en ratas controles (CT) y nefróticas (SN).

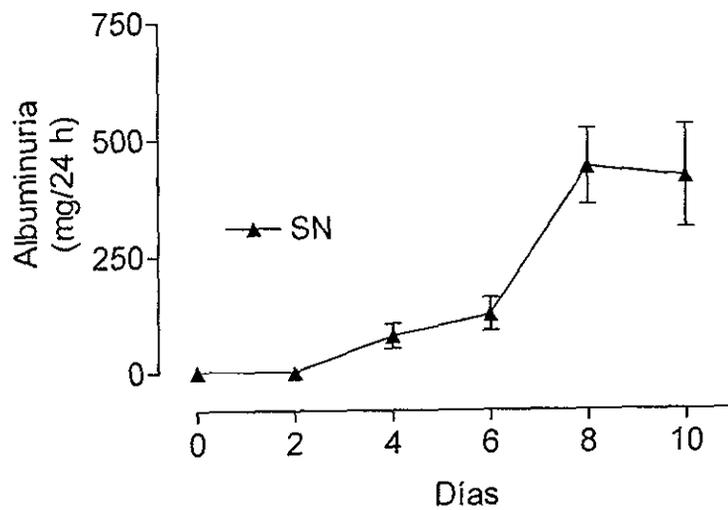


Figura 15. Excreción urinaria de albúmina en ratas nefróticas (SN), no fue detectable en ratas controles (CT).

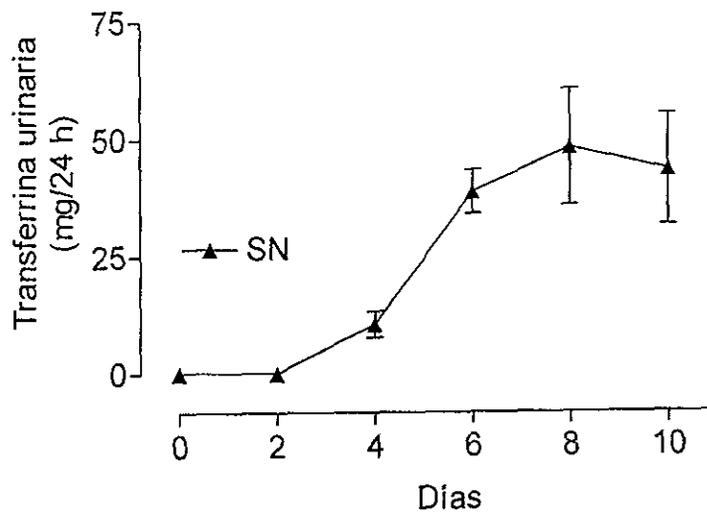


Figura 16. Excreción urinaria de transferrina en ratas nefróticas (SN), no fue detectables en ratas controles (CT).

En las figuras 17-19 se observa que hay una correlación positiva entre la excreción urinaria de las proteínas transportadoras y el mineral correspondiente (ceruloplasmina vs Cu; $r^2=0.54$, $p<0.0001$; albúmina vs Zn; $r^2=0.53$, $p<0.0001$; transferrina vs Fe; $r^2=0.5665$, $p<0.0001$). Esto nos indica que hay una relación directamente proporcional entre la excreción del mineral con su correspondiente proteína transportadora.

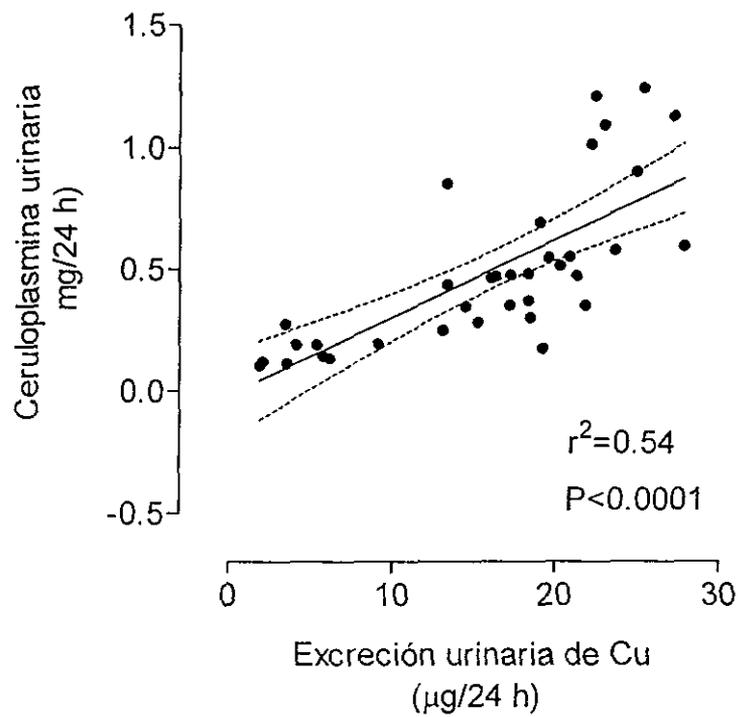


Figura 17. Correlación entre la excreción urinaria de ceruloplasmina y de Cu.

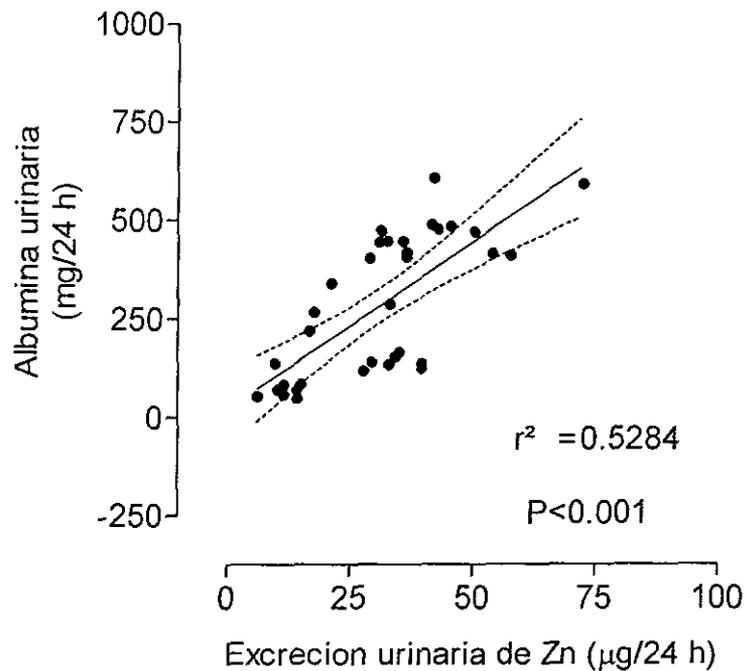


Figura 18. Correlación entre la excreción urinaria de albúmina y de Zn

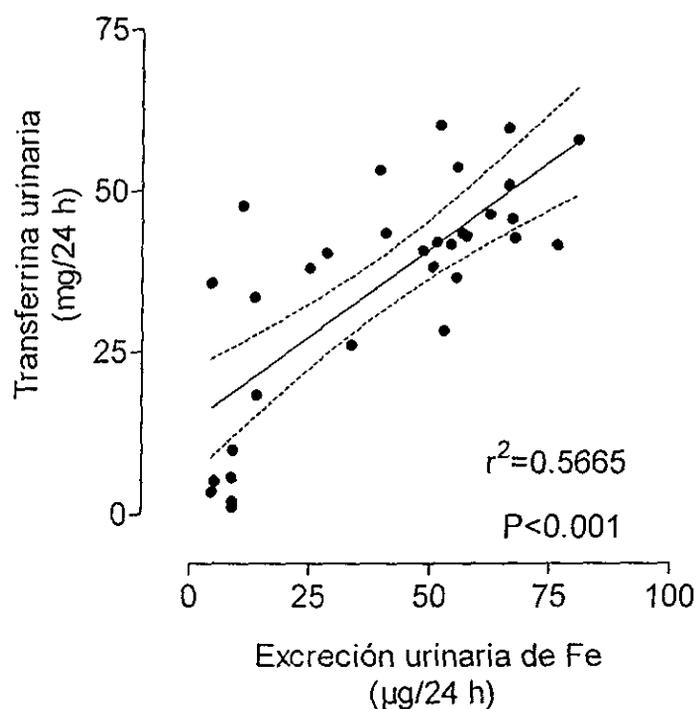


Figura 19. Correlación entre la excreción urinaria de transferrina y Fe.

En la tabla 10 se puede observar en suero una disminución de 2 veces para ceruloplasmina, y 9 veces para albúmina y transferrina y un aumento en la excreción de ceruloplasmina, albúmina y transferrina en orina de 3 veces. La depuración y excreción fraccional de ceruloplasmina aumentan significativamente 15 y 40 veces respectivamente en las ratas con SN. Sin embargo estas comparaciones no se pudieron realizar en albúmina y transferrina ya que no fue posible detectarlas en orina de ratas controles.

Tabla 10. Concentración en suero, excreción urinaria total, depuración y excreción fraccional de ceruloplasmina, albúmina y transferrina.

	Control	n	Nefróticas	n	Valor de p
Ceruloplasmina					
Suero, mg/dl	27.18 ± 4.39	10	11.36 ± 4.46	8	< 0.001
Orina, mg/24 h	0.142 ± 0.034	10	0.517 ± 0.095	10	< 0.05
Depuración	7.2x10 ⁻⁶ ± 2.48x10 ⁻⁶	10	1.08x10 ⁻⁴ ± 3.26x10 ⁻⁵	8	< 0.001
Excreción Fraccional	5.6x10 ⁻⁶ ± 2.1x10 ⁻⁶	10	0.00022 ± 0.00011	8	< 0.05
Albúmina					
Suero, g/dl	2.80 ± 0.755	9	0.317 ± 0.127	7	< 0.001
Orina, mg/24 h	ND		418.05 ± 110.73	10	
Depuración	ND		2.28x10 ⁻³ ± 4.88x10 ⁻⁴	7	
Excreción Fraccional	ND		0.004 ± 0.0022	7	
Transferrina					
Suero, g/dl	0.38 ± 0.069	9	0.044 ± 0.015	7	< 0.001
Orina, mg/24 h	ND		43.24 ± 11.87	10	
Depuración	ND		1.50x10 ⁻³ ± 8.76x10 ⁻⁴	7	
Excreción fraccional	ND		0.0027 ± 0.0015	7	

ND = No detectable por el método de inmunodifusión radial

En la tabla 11 se puede apreciar que el cociente Cu/Ceruloplasmina permaneció sin cambios en las ratas con SN, mientras que los cocientes en suero de Zn/Albúmina y Fe/Transferrina aumentan significativamente.

Tabla 11. Cocientes mineral/proteína transportador en suero del día 10

	Control	n	Nefróticas	n	Valor de p
Cu, µg/dl	80.44±18.72	10	29.33±12.32	9	< 0.001
Ceruloplasmina, mg/dl	27.18±4.39	10	11.36±4.46	9	< 0.001
Cu/Ceruloplasmina, µg/mg	2.98±0.54	10	2.99±1.11	9	NS
Zn, µg/dl	106.69±24.73	10	48.95±15.34	9	< 0.001
Albúmina, g/dl	2.80±0.75	10	0.317±0.127	9	< 0.001
Zn/Albúmina, µg/g	40.14±7.29	10	149±54	9	< 0.001
Fe, µg/dl	340.35±152.15	10	219.71±106.05	7	< 0.05
Transferrina, mg/dl	384.3±69	10	44.17±15.37	7	< 0.001
Fe/Transferrina, µg/mg	0.88±0.45	10	13.87±11.47	7	< 0.05

En las figuras 20-22 se muestran las correlaciones entre los minerales en suero y su proteínas transportadoras. Solo la correlación Albúmina vs Zn fue significativa ($r^2=0.5768$, $p<0.05$).

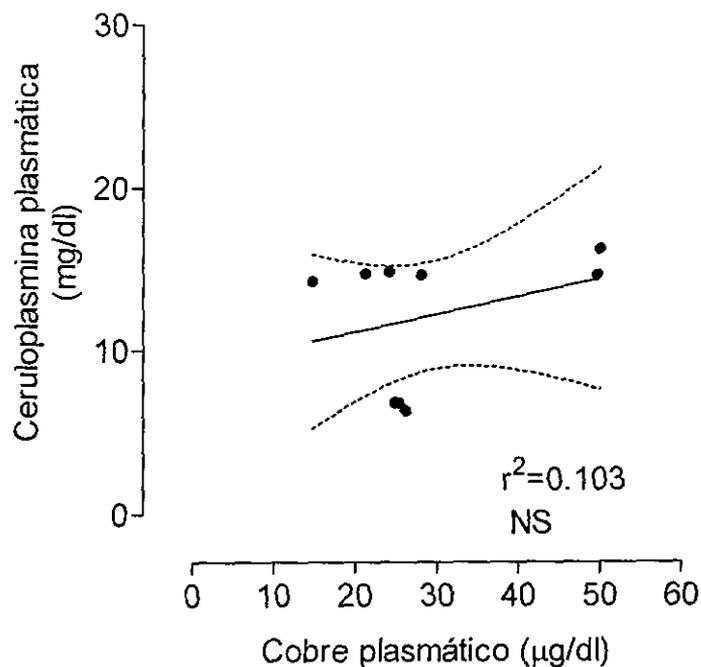


Figura 20. Correlación de la ceruloplasmina plasmática y el cobre plasmático.

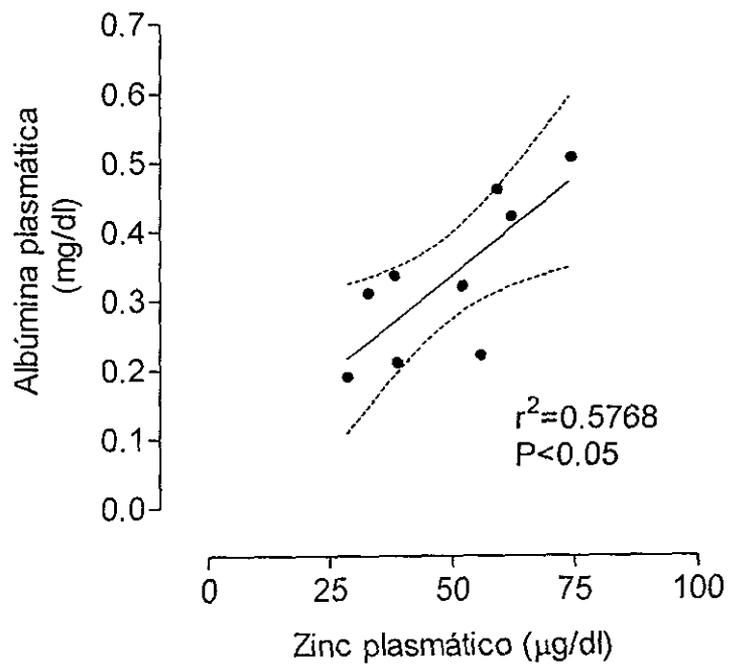


Figura 21. Correlación de la albúmina plasmática y el zinc plasmático.

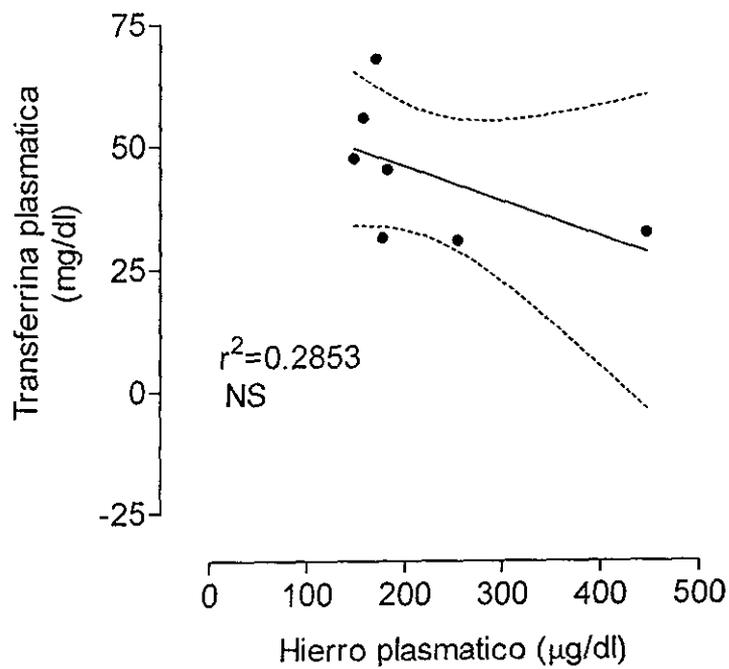


Figura 22. Correlación de la transferrina plasmática y el hierro plasmático.

En el análisis del contenido de Cu, Zn y Fe en eritrocitos de ratas controles y nefróticas no se apreciaron diferencias significativas en ninguno de los minerales analizados (tabla 12).

Tabla 12. Contenido de minerales en eritrocitos ($\mu\text{g/g Hb}$)

Mineral	Control	n	Nefróticas	n	Valor de p
Cobre	2.08 \pm 0.64	7	2.01 \pm 0.35	7	NS
Zinc	26.98 \pm 2.57	7	27.96 \pm 4.98	7	NS
Hierro	2891.86 \pm 372.2	7	3061.79 \pm 542.2	7	NS

En las tablas 13-15 se muestran los resultados del contenido de Cu, Zn y Fe en diferentes tejidos de las ratas controles y nefróticas. El contenido de Cu disminuyó más del 50% en riñón, 15% en fémur y 16 % en hígado, mientras que en pulmón aumentó un 17%. El Zn aumentó un 25% en riñón, 19% en testículo, 13% en fémur, 36% en hígado y 43% en músculo. El mayor aumento en el contenido de Fe se encontró en el hígado con un 49%, después le siguió el riñón con un 39%, pulmón con 31%, músculo con un 20% y, por último, el testículo con un 15%.

Tabla 13. Contenido de Cu en tejidos ($\mu\text{g/g}$ peso seco)

Tejido	Control	n	Nefróticos	n	valor de p
Corazón	26.05 \pm 0.69	10	26.63 \pm 0.92	10	NS
Riñón	29.55 \pm 5.57	10	13.02 \pm 0.57	10	< 0.001
Testículo	11.90 \pm 1.00	9	12.05 \pm 0.41	9	NS
Pulmón	10.70 \pm 1.30	8	12.54 \pm 1.71	9	< 0.05
Fémur	2.79 \pm 0.51	10	2.37 \pm 0.31	9	< 0.05
Cerebro	11.50 \pm 1.34	10	11.13 \pm 0.82	7	NS
Bazo	7.48 \pm 1.55	8	7.35 \pm 1.42	8	NS
Hígado	13.07 \pm 0.72	10	10.94 \pm 1.04	9	< 0.001
Pelo	15.42 \pm 2.82	9	16.23 \pm 1.37	9	NS
Músculo	4.27 \pm 0.57	8	4.05 \pm 0.53	10	NS

Tabla 14. Contenido de Zn en tejidos ($\mu\text{g/g}$ peso seco)

Tejido	Control	n	Nefróticos	n	valor de p
Corazón	84.31 \pm 2.83	10	85.11 \pm 3.37	8	NS
Riñón	92.95 \pm 5.27	10	116.43 \pm 7.92	10	< 0.001
Testículo	171.77 \pm 11.88	10	205.19 \pm 7.68	10	< 0.001
Pulmón	85.72 \pm 4.17	9	89.31 \pm 4.18	9	NS
Fémur	176.64 \pm 18.81	10	199.46 \pm 13.72	10	< 0.05
Cerebro	63.42 \pm 3.07	10	60.19 \pm 3.19	10	< 0.05
Bazo	93.97 \pm 10.46	8	102.31 \pm 14.79	9	NS
Hígado	95.94 \pm 5.54	10	130.63 \pm 26.54	9	< 0.001
Pelo	273.06 \pm 36.90	9	267.33 \pm 35.79	10	NS
Músculo	43.95 \pm 5.39	7	62.97 \pm 11.13	7	< 0.05

Tabla 15. Contenido de Fe en tejidos ($\mu\text{g/g}$ peso seco)

Tejido	Control	n	Nefróticos	n	valor de p
Corazón	316.33 \pm 29.35	10	326.59 \pm 30.59	10	NS
Riñón	267.31 \pm 42.66	10	372.14 \pm 35.28	9	< 0.001
Testículo	84.87 \pm 10.36	10	97.64 \pm 11.26	10	< 0.05
Pulmón	339.89 \pm 65.86	8	446.86 \pm 89.61	9	< 0.05
Fémur	71.25 \pm 8.59	9	76.51 \pm 14.31	9	NS
Cerebro	81.38 \pm 5.61	9	80.81 \pm 5.25	10	NS
Bazo	754.60 \pm 170.86	8	766.02 \pm 223.53	9	NS
Hígado	287.84 \pm 36.30	9	429.74 \pm 86.41	9	< 0.001
Pelo	18.14 \pm 4.34	7	16.85 \pm 4.84	7	NS
Músculo	42.00 \pm 5.04	7	50.47 \pm 2.92	9	< 0.001

En los resultados de la biometría hemática se observa que el hematocrito disminuyó significativamente, mientras que los leucocitos, el porcentaje de reticulocitos y la concentración media corpuscular de hemoglobina aumentaron significativamente en las ratas nefróticas (tabla 16).

Tabla 16. Biometria Hemática

		Control	n	Nefróticas	n	Valor de p
Eritrocitos	$10^6/\text{mm}^3$	6.87 \pm 0.50	9	6.42 \pm 0.62	9	NS
Hematocrito	%	43.98 \pm 2.75	9	39.43 \pm 3.11	9	< 0.05
VCM*	μ^3	64.55 \pm 4.07	9	61.89 \pm 2.50	9	NS
Leucocitos	$10^3/\text{mm}^3$	14.57 \pm 4.82	9	19.47 \pm 4.74	9	< 0.05
Hemoglobina	g/dl	15.24 \pm 0.69	9	14.79 \pm 0.69	9	NS
Reticulocitos	%	1.25 \pm 0.89	9	13.02 \pm 1.61	9	< 0.001
CMCH*	%	34.72 \pm 1.22	9	37.72 \pm 2.16	9	< 0.05
HCM*	μ^3	22.26 \pm 1.21	9	23.45 \pm 1.96	9	NS

*VCM= Volumen corpuscular medio, CMCH= Concentración media corpuscular de hemoglobina,

HCM= Hemoglobina corpuscular media

En las figuras 23-24 se observa una disminución significativa a partir del día 2 en el curso temporal del consumo de alimento y de excreción de heces en las ratas nefróticas.

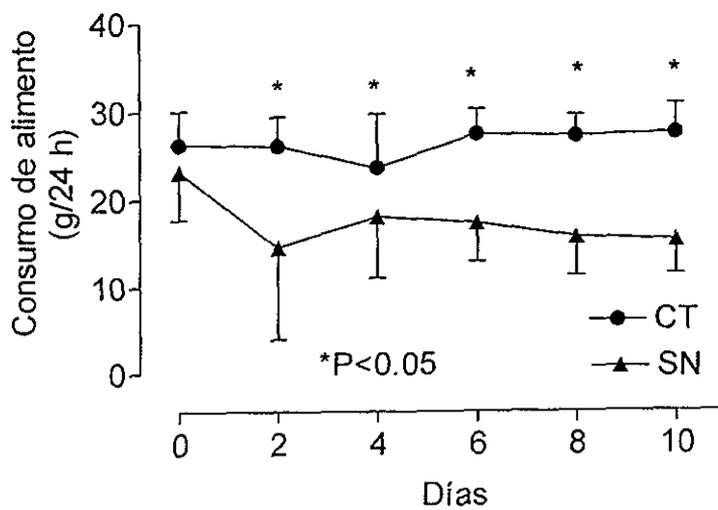


Figura 23. Consumo de alimento de ratas control (CT) y nefróticas (SN)

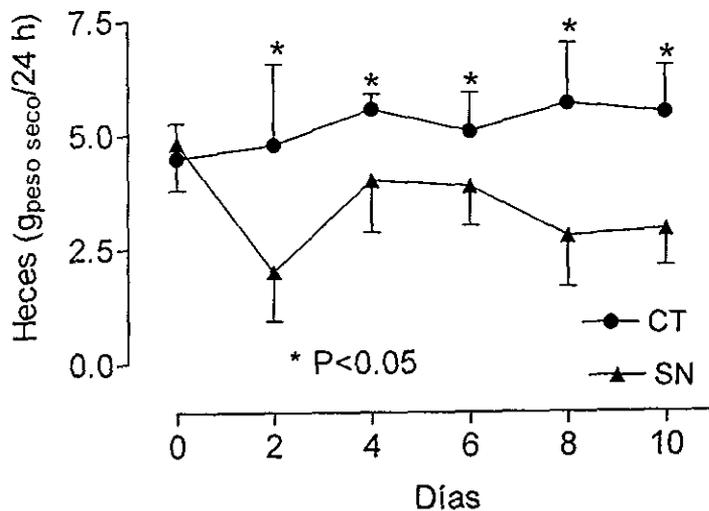


Figura 24. Excreción fecal en ratas control (CT) y nefróticas (SN)

En las figuras 25-27 se observa el curso temporal del consumo, excreción fecal y balance de Cu en las ratas controles y nefróticas. El consumo y la excreción fecal de Cu disminuyeron claramente a partir del día 2 en las ratas con SN, mientras que el balance de Cu aumentó en el día 4.

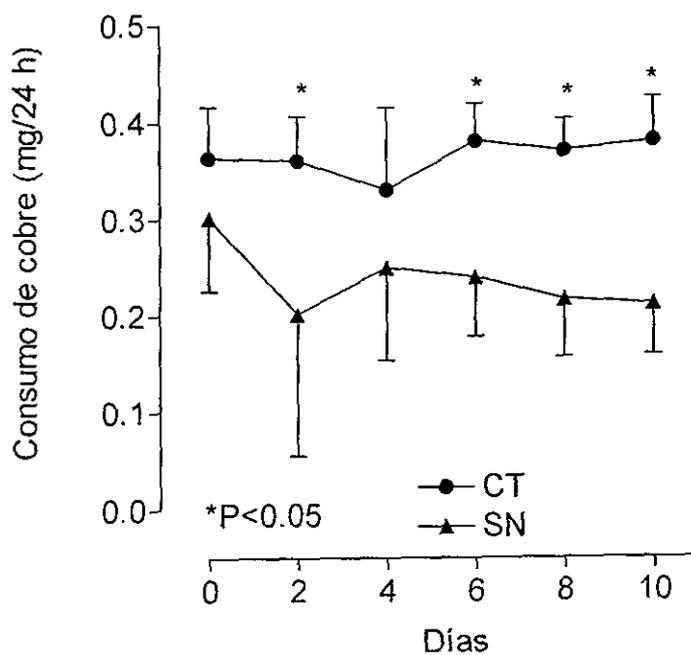


Figura 25. Consumo de Cu durante el experimento.

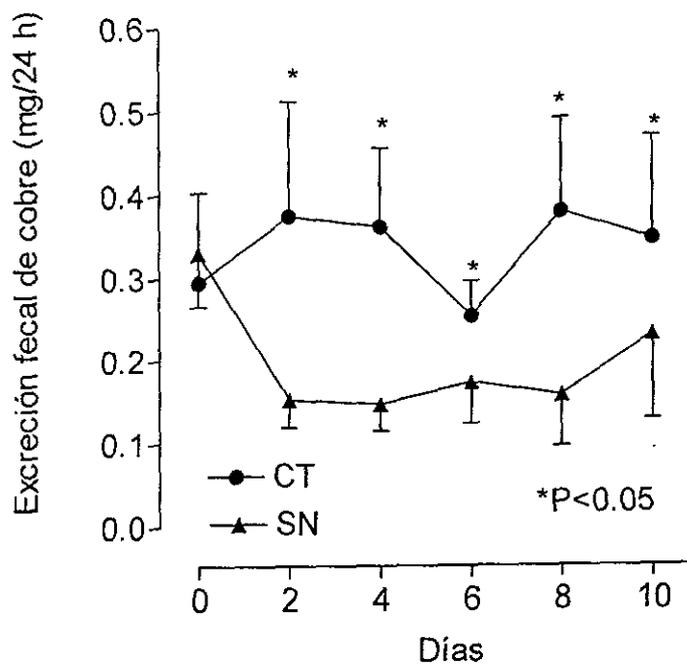


Figura 26. Excreción fecal de Cu durante el experimento.

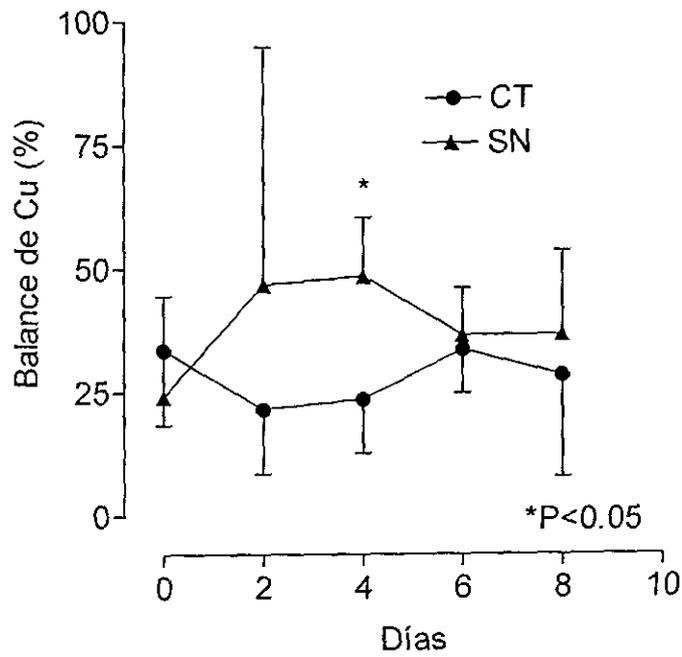


Figura 27. Balance de Cu durante el experimento.

En las figs. 28-30 se observa el curso temporal del consumo, excreción fecal y balance de Zn en las ratas controles y nefróticas. El consumo de Zn disminuyó significativamente a partir del día 6, mientras que la excreción disminuyó significativamente a partir del día 2. El balance de Zn no presentó diferencias significativas.

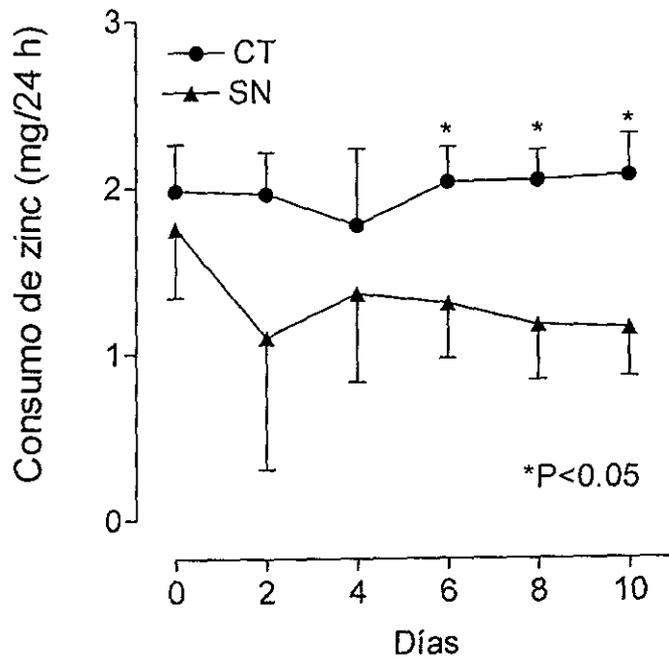


Figura 28. Consumo de Zn durante el experimento

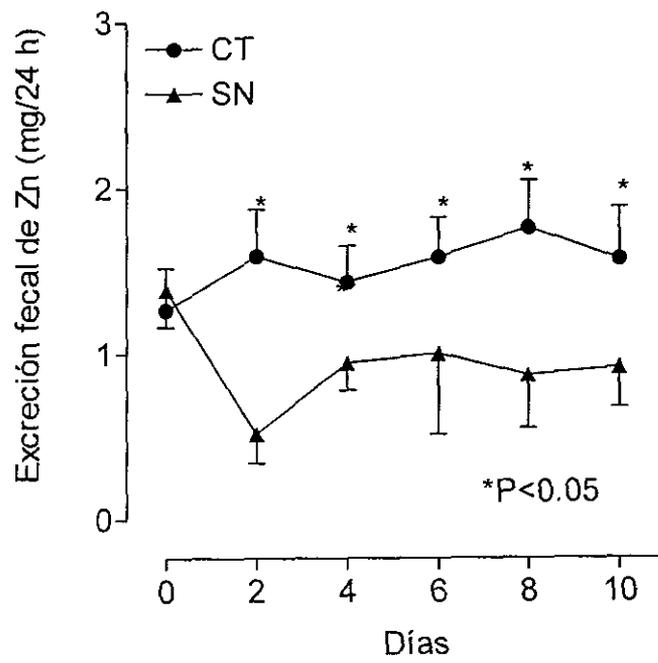


Figura 29. Excreción fecal de Zn durante el experimento.

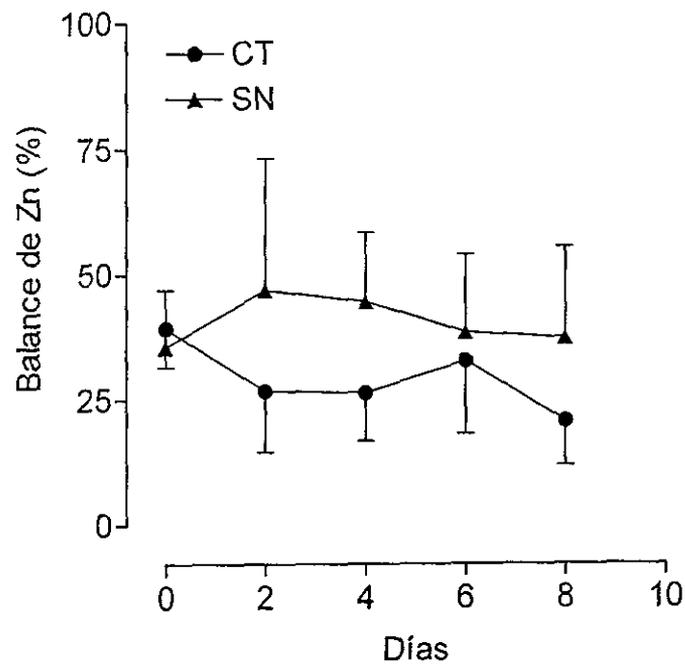


Figura 30. Balance de Zn durante el experimento.

En las figs. 31-33 se observa el curso temporal del consumo, excreción fecal y balance de Fe en las ratas controles y nefróticas. El consumo disminuyó claramente los días 2, 6-10 mientras que la excreción fecal disminuyó significativamente a partir del día 2. El balance de Fe aumentó significativamente el día 4.

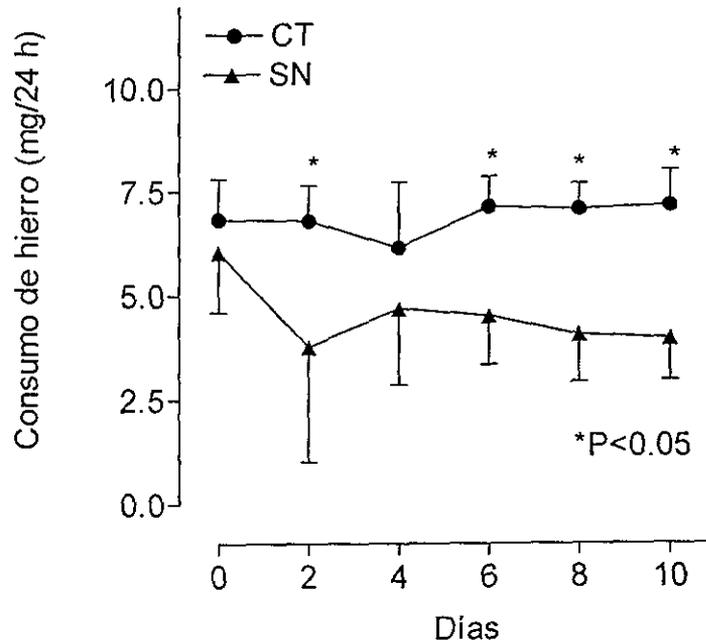


Figura 31. Consumo de Fe durante el experimento.

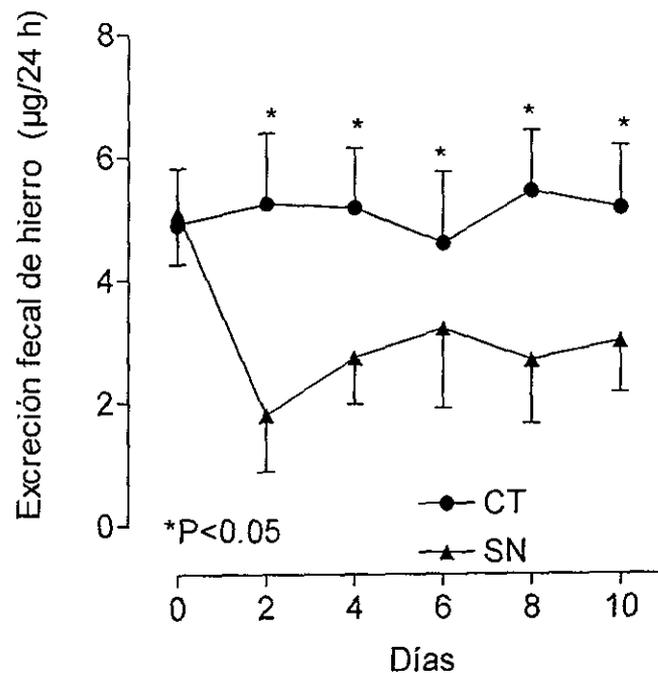


Figura 32. Excreción fecal de Fe durante el experimento.

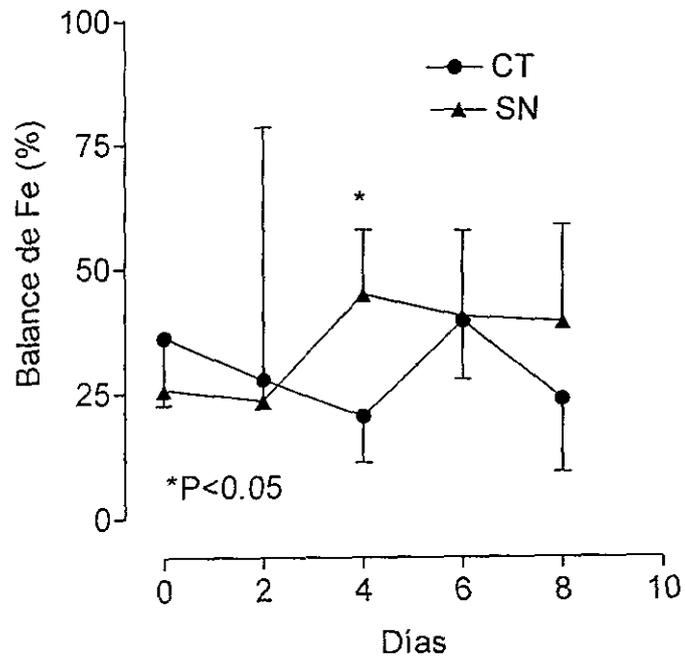


Figura 33. Balance de Fe durante el experimento.

7. DISCUSIÓN

Los datos presentados en este trabajo muestran que las ratas que se inyectaron con ANP desarrollaron síndrome nefrótico caracterizado por proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia. El SN experimental nos permite evaluar el impacto que tiene la alteración en la concentración de proteínas plasmáticas transportadoras de minerales (ceruloplasmina, albúmina y transferrina), y las consecuencias de la disminución de Cu, Zn y Fe en el organismo, ya que en estudios anteriores se había postulado que estos minerales salen unidos a su proteína transportadora durante la enfermedad (13,25,27,28). En un período de 10 días la excreción urinaria de estos minerales aumentó y sus niveles plasmáticos disminuyeron. También se observó una correlación significativa entre la proteinuria y la excreción urinaria de estos minerales y entre ceruloplasmina y Cu, albúmina y Zn y transferrina y Fe, lo cual sugiere que el mineral sale unido a su proteína transportadora (13,14,20,23,24). El aumento en la depuración y excreción fraccional de ambos indica que el aumento en la excreción es real e independiente de los cambios en la depuración de creatinina (17,18,24,26,61,62). Estas alteraciones encontradas en plasma y orina son importantes ya que en algunos humanos con esta enfermedad se han encontrado alteraciones típicas de la deficiencia de estos minerales.

Aun cuando los niveles plasmáticos de Cu, Zn y Fe se encuentran bajos, así como el de sus proteínas transportadoras, las correlaciones plasmáticas que se hicieron para las ratas nefróticas entre estos dos parámetros, no fueron muy contundentes ya que solo se encontró una significancia baja para la correlación entre el Zn y albúmina. Esto puede estar relacionado con el bajo número de determinaciones y/o con las alteraciones en los niveles plasmáticos de estas proteínas, tales como síntesis, degradación endógena y volumen plasmático (60).

El consumo y la excreción fecal de minerales disminuyeron en todos los casos como consecuencia de una disminución en el consumo de alimento. Sin embargo, lo anterior no nos indica si las ratas con SN presentaban cambios en el balance de estos minerales. Por lo tanto, se evaluó el balance de estos minerales en las ratas nefróticas, el cual resultó similar al de las ratas controles y muy parecido a los reportados en la literatura (54-59). A pesar de las alteraciones en el consumo de estos minerales, no se modificó su balance. Esto nos indica que los cambios metabólicos de Cu, Zn y Fe observados en nuestras ratas con SN no se deben a alteraciones en el balance de estos minerales.

Para tratar de establecer las consecuencias del aumento en la excreción urinaria y la disminución en plasma de Cu, Zn y Fe, se determinó el contenido de estos minerales en diversos órganos y tejidos.

Se ha informado que los humanos con SN, tienen bajos niveles de Zn en eritrocitos y en pelo (22,62), lo cual, junto con la disminución de Zn en suero, es un indicador de una deficiencia de Zn. Sin

embargo, en este trabajo se observó que no hubo cambios en ninguno de los tres minerales en eritrocitos y en pelo. Basados en estos parámetros, se puede decir que nuestras ratas no presentan deficiencia de Zn, aunque, por otro lado, en cerdos deficientes de Cu, los niveles de Cu no cambian en eritrocitos, aún cuando la deficiencia llegue a ser severa (13).

Se ha reportado que en ratas con deficiencia de Cu los niveles de este mineral disminuyeron claramente en riñón e hígado (63). En este experimento, las ratas nefróticas presentaron una disminución en el contenido de Cu en riñón, fémur e hígado de un 50, 15 y 16%, respectivamente, y un aumento del 17% en pulmón. En ambos trabajos el contenido de Cu en riñón e hígado fue muy similar: 12.78 ± 3.04 vs 13.02 ± 0.57 y 10.67 ± 1.45 vs 10.94 ± 1.04 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Por lo tanto, al menos estos dos órganos presentan alteraciones típicas de una deficiencia de Cu. Se ha informado de un aumento en el contenido de Cu en pulmón en ratas deficientes en Zn, pero con una magnitud diferente, ya que en este estudio el contenido fue mucho más bajo (63).

En nuestras ratas se encontró que el Zn aumentó en riñón un 25%, en testículo un 19%, en fémur un 13%, en hígado un 36% y en músculo un 43%. Estos hallazgos contrastan claramente con los obtenidos en animales con deficiencia de Zn, en los cuales se observa una disminución generalizada de este mineral en tejidos (64). Freeman *et. al.* (21) encontraron un aumento en el contenido de Zn en riñón y en músculo y una disminución de Zn en fémur de ratas con SN inducido con ANP. Ellos concluyeron que sus datos pueden deberse a una redistribución del mineral que sale del hueso para depositarse en riñón y músculo; sin embargo en nuestro caso no podemos explicarlo de esta manera, ya que los niveles de Zn en el fémur se incrementaron. Esto podría indicarnos que existen alteraciones más complejas involucradas en el balance de Zn en estas ratas, y que pudiera estar relacionado con la alteración de las proteínas transportadoras; las cuales no se encuentran alteradas en la deficiencia de Zn. A pesar de esto, no podemos descartar que en un periodo más largo de proteinuria encontremos una deficiencia de zinc, ya que en humanos con SN (20) se encontró que existían alteraciones exteriorizadas por impotencia y/o disminución de libido y/o esterilidad, las cuales están frecuentemente asociadas a la deficiencia de Zn. En otro estudio realizado en ratas con SN, se evaluaron las alteraciones sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y se encontró que existe un daño hipofisiario-gonadal, y sugieren que las alteraciones en la liberación de gonadotropinas hipofisarias, así como en la ruptura de la cadena lateral del colesterol o de la esteroidogénesis puede deberse a falta de cofactores para las enzimas tales como Zn, Fe y Cu, que se pierden en la fase aguda del SN (65).

El contenido de Fe aumentó en hígado un 49%, en riñón un 39%, en pulmón un 31%, en músculo un 20% y en testículo un 15%. Este efecto en el aumento del contenido de Fe en tejidos se ha correlacionado con la existencia de una hemocromatosis, cuyas manifestaciones más claras son la pigmentación de la piel, cirrosis, diabetes, y otras manifestaciones de toxicidad en tejidos causadas

por hierro (68); o en ausencia congénita de transferrina cuya manifestación más clara es el aumento de hierro en hígado, corazón y riñón, ya que el hierro es absorbido por el intestino y es acumulado en estos órganos y una pequeña cantidad es llevada hacia la médula ósea, produciéndose como resultado una anemia hipocrómica microcítica (67). También se ha reportado la acumulación de hierro hepático en pacientes con una deficiencia hereditaria de ceruloplasmina (70). En nuestro estudio, los niveles de transferrina en plasma disminuyeron, por lo que podemos sugerir que el hierro se acumula en los tejidos como consecuencia de esta disminución. Tomando en cuenta estos datos, nuestros animales no presentan una deficiencia típica de hierro. Sin embargo, en pacientes con SN se ha informado la presencia de anemia (26,27,60,67); La evidencia más común de la deficiencia de hierro en humanos es una disminución en el número de glóbulos rojos, en la concentración de hemoglobina y en el hematocrito, así como una disminución en el contenido de hierro en hígado y bazo (66). Los parámetros hematológicos encontrados en las ratas nefróticas de nuestro experimento, mostraron una disminución significativa del hematocrito y un aumento en la concentración media corpuscular de hemoglobina y el porcentaje de reticulocitos. Estos datos nos indican que existen ya alteraciones en los glóbulos rojos como son el tamaño (se hacen más pequeños), lo que se refleja en una disminución del volumen del paquete celular, al igual que el volumen corpuscular medio, aun cuando este último parámetro no es significativo; y que estas células, por lo tanto, tienen hemoglobina más concentrada en un volumen más pequeño (CMCH) y porque además existe un aumento en el porcentaje de reticulocitos y esto refleja un aumento en la proliferación de células rojas. En un estudio donde se compararon ratas con SN contra un grupo al cual se le producía anemia moderada por flebotomía, se encontró, para los dos casos, que existía una disminución en el hematocrito, en la hemoglobina y los glóbulos rojos, así como también un aumento en el porcentaje de reticulocitos, y una disminución de eritropoyetina (glicoproteína hormonal que estimula la replicación y diferenciación de células eritroides a reticulocitos maduros), y que esto da como resultado una inducción a cierto grado de anemia e hipoxia, sin embargo este estudio se realizó en un período de 28 días (69). Aun cuando nuestros datos no son contundentes para poder establecer una anemia como tal, si reflejan ya una alteración que está relacionada no solo con la pérdida urinaria de Fe sino también con la de Cu.

Finalmente podemos decir que todas las alteraciones que se encontraron en este estudio se deben a la pérdida urinaria de las proteínas transportadoras, y que aún cuando no se encuentra modificado el balance de Cu, Zn y Fe, podría estar jugando un papel importante dentro del SN si se midiera la absorción como tal. A pesar de que no podemos hablar en este estudio de la deficiencia real de alguno de estos minerales, los datos experimentales y bibliográficos nos indican que en tiempos más largos estas podrían establecerse.

8. CONCLUSIONES

1. La pérdida urinaria de las proteínas transportadoras ceruloplasmina, albúmina y transferrina en el SN, correlaciona con la pérdida de Cu, Zn y Fe durante la proteinuria.
2. La disminución de Cu, Zn y Fe en el plasma de ratas con SN es consecuencia de la disminución en la concentración de sus proteínas transportadoras y no una disminución en el balance.
3. El balance global de estos minerales no está alterado significativamente.
4. Se presentaron alteraciones en el contenido de Cu, Zn y Fe en los tejidos y órganos de ratas con SN, sin embargo, estas alteraciones no son típicas de una deficiencia de cada uno de estos minerales. Las alteraciones de estos minerales en el estado nefrótico son mucho más complejas que las debidas a una deficiencia simple.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Glassock RJ. The nephrotic syndrome. *Hosp Pract* 1979;14:105-129.
2. Hoyer JR. Idiopathic nephrotic syndrome with minimal glomerular changes. En: Brenner BM, Stein JH, eds. *The Nephrotic Syndrome*. cap 6, New York:Churchill Livingstone, 1982:145-143.
3. Schnaper HW, Robson AM. Nephrotic syndrome: minimal changes disease, focal glomerulosclerosis, and related disorders. En: Schrier RW, Gottschalk CW, eds. *Diseases of the Kidney, The Nephrotic Syndrome*. Vol II, Boston/Toronto: Little Brown, 1988:1949-2004.
4. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988;33:1184-1202.
5. Hoedemaeker J. Experimental glomerulonephritis. En: Davidson Am eds. *Nephrology*. Vol I. Xth Int Congress of Nephrology. Cambridge: University Press, 1988:409-440.
6. Whiteside C, Prutis R, Cameron R, Thompson J. Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis. *Lab Invest* 1989;61:650-660.
7. Grond J, Weening JJ, Elema JD. Glomerular sclerosis in nephrotic rats: comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest* 1984;51:277-285.
8. Diamond JR, Bonventre JB, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986;29:478-483.
9. Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1976;34:43-59.
10. Vernier RL, Papermaster BW, Good RA. Aminonucleoside nephrosis. I. Electron microscopic study of the renal lesion in rats. *J Exp Med* 1959;109:115-126.
11. Gwinner W, Landmesser U, Brandes RP, Kubat B, Plasger J, Eberhard O, Koch KM, Olbricht CJ. Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1722-1731.
12. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications, en: Brenner BM, Stein JA, eds. *Controversies in Nephrology, The nephrotic syndrome*. Vol 9, New York: Churchill Livingstone, 1989, pp 85-120.
13. Cartwright CE, Gubler CJ, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XI. Copper and iron metabolism in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1954;33:685-698.
14. Jensen H. Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 1967;182:465-473.
15. Markowitz H, Gubler CJ, Mahoney JP, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XIV. Copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1955;34:1498-1508.
16. Stec J, Podracka, Pavkoveckova O, Kollar J. Zinc and copper metabolism in nephrotic syndrome. *Nephron* 1990;56:186-187.
17. Brown EA, Muller BR, Sampson B, Curtis JR. Urinary iron loss in the nephrotic syndrome-an unusual cause of iron deficiency with a note on urinary copper losses. *Postgraduate Med J* 1984;60:125-128.

18. Pedraza-Chaverri J, Torres-Rodríguez GA, Cruz C, Mainero A, Tapia E, Ibarra-Rubio ME, Silencio JM. Copper and zinc metabolism in aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Nephron* 1994;66:87-92.
19. Mainero A, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Serum and urinary ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome. *Clin Invest Med* 1992;15:295-300.
20. Temes-Montes XL, Picaporte MA, Herrero E, Selgas R, Beberide JM, Martinez-Ara J, Sanchez-Sicilia L. Valores séricos y urinarios de cinc en nefropatías exteriorizadas por síndrome nefrótico o como proteinuria en rango nefrótico. *Rev Clin Esp* 1980;159:159-161.
21. Freeman RM, Richards CJ, Rames LK. Zinc metabolism in aminonucleoside induced nephrosis. *Am J Clin Nutr* 1975;28:699-703.
22. Perrone L, Gialanella G, Giordano V, La Manna A, Moro R, Di toro R. Impaired zinc metabolic status in children affected by idiopathic nephrotic syndrome. *Eur Pediatr* 1990;149:430-440.
23. Lindeman RD, Baxter DJ, Yunice AA, Kraikitpanitch S. Serum concentration and urinary excretions of zinc in cirrhosis, nephrotic syndrome and renal insufficiency. *Am J Med Sci* 1978; 275:17-31.
24. Reimold EW. Changes in zinc metabolism during the course of the nephrotic syndrome *Am J Dis Child* 1980;134:46-50.
25. Rifkind D, Kravetz HM, Knight V, Schade AL. Urinary excretion of iron-binding protein in the nephrotic syndrome *New Engl J Med* 1961;265:115-118.
26. Wiltink WF, Van Eijk HG, Bobeck-Rutsaert MM, Gerbrandy J, Leijnse B. Urinary iron excretion in nephrotic syndrome. *Acta Haemat* 1972;47:269-275.
27. Ellis D. Anemia in the course of the nephrotic syndrome secondary to transferrin depletion *J Pediatr* 1977;90:953-962.
28. Alfrey AC, Hammond WS. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1990; 37:1409-1413.
29. Warsham BL, Check IJ, Hymes LC, DiRusso SC. Decreased serum transferrin concentration in children with nephrotic syndrome: Effect on lymphocyte proliferation and correlation with serum immunoglobulin levels. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;33:210-219.
30. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Scachter D, Shafritz DA. 1988. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, Ltd, New York pp 525-550.
31. Österberg R. Physiology and pharmacology of copper . *Pharmac Ther* 1980;9:121-146.
32. Danks DM. Copper deficiency in human. *Ann Rev Nutr* 1988;8:235-257.
33. Goode CA, Dinh CT, and Linder MC. Mechanism of copper transport and delivery in mammals: review and recent findings. *Clin Nutrition* 1991;9:131-144.
34. Harris DE . Copper transport: An overview. *Exp Bio Med* 1991;130-140.
35. Millis CF. Trace element metabolism in animals. Livingstone, Edinburgh 1970 pp 451.
36. Prasad A S 1978. *Trace Elements in human metabolism*. Plenum Medical Book Company, New York. Cap 2 pp 17-54.
37. Feldman EB. *Principios de nutrición clínica*. Manual Moderno 1990 pp 55-60
38. Curzon G, O'Reilly SA. A coupled iron-caeruloplasmin oxidation system. *Biochem Biophys Res Commun* 1960;2:284.
39. Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity in normal human serum. *J Biol Chem* 1966;62, 241:2746

40. Prasad A S 1978. Trace elements in human metabolism. Plenum Medical Book Company, New York. Cap 10, pp 251-345.
41. Aggett PJ. Aspects of neonatal metabolism of trace. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 402:75-82.
42. Halsted JA, Smith JC, Irwin MI. A conspectus of research on zinc requirements of man. *J Nutr* 1974; 104, 3:345-378.
43. Cousins RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 1985;65:238-309.
44. Crichton RR, Ward RJ. Iron species in iron homeostasis and toxicity. *Analyst* 1995;120:693-697.
45. Lowry OA, Rosenbrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-267.
46. Chester A, A. Studies of hepatic synthesis *in vivo* of plasma proteins including orosomucoid, transferrin, antitripsin, C8, and Factor B. *Clin Immunol immunopathol* 1980;16:84-89.
47. Worwood W. The clinical biochemistry of iron. *Seminars hematology* 1977;14:3-30.
48. Aisen P. Iron Transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem* 1980;49:357-393.
49. Crichton R R, Charlotheaux-Wauters. Review: Iron transport and storage. *EurJ Biochem* 1987; 164:485-506.
50. Morgan EH. Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance. *Mol Aspects Med* 1981;4:3-123.
51. Curzon G. Some properties of coupled iron-ceruloplasmin oxidation systems. *Biochem J* 1961; 79:656.
52. Mancini G, Vaerman JP, Carbonara AO, Heremans JF. XI Colloquium on Protides of the Biological Fluids. Editado por H Peeters, pp 370, Elsevier Publishing Co, Amsterdam, 1964.
53. Fahey LJ, Mckelvey ME. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J Immunol* 1965;94:84-90.
54. Jiang KS. Effects of dietary cellulose and xylan on absorption and tissue contents of zinc and copper in rats. *J Nutr* 1986;116:999-1006.
55. Delzenne N, Aertssens J, Verplaetse H, Roccaro M and Roberfroid M. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Nutr Res* 1995;57:1579-1587.
56. Rukcman SK, Sherman RA. Effects of exercise on iron and copper metabolism in rats. *J Nutr* 1981;111:1593-1601.
57. Johnson TW, Canfield KW. Intestinal absorption and excretion of zinc in streptozocin-diabetic rats as affected by dietary zinc and protein. *J Nutr* 1985;115:1217-1227.
58. House AW, Welch MR, Van Canpen RD. Effect of phytic acid on the absorption, distribution, and endogenous excretion of zinc in rats. *J Nutr* 1982;112:941-953.
59. Stuart AM, Johnson EP. Copper absorption and copper balance during consecutive periods for rats fed varying levels of dietary copper. *J Nutr* 1986;116:1028-1036.
60. Jensen H, Bro-Jørgensen K, Jarnum S, Olensen H, Yssing M. Transferrin metabolism in the nephrotic syndrome and in protein-losing gastroenteropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:293.
61. Dagg HJ, Smith AJ, Goldberg A. Urinary excretion of iron. *Clin Sci* 1966;30:495-503.

- Mahajan S, Speck J, Varghese G, Abu-Hamdan D, Migdal S, Briggs W, Prasad A, McDonald F. Zinc metabolism in nephrotic syndrome. *Nutr Res* 1985;1 (suppl):360-362.
63. Brown JCW, Strain JJ. Effect of dietary homocysteine on copper status in rats. *J Nutr* 1990;120:9,1068-1074.
64. Prasad AS, Oberleas D, Wolf P, Horwitz JP. Studies on zinc deficiency. Changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. *J Clin Invest* 1967;46:549-557.
65. Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J. Transient alteration of the reproductive function in nephrotic rats. *Life Sciences* 1997;61:12, 1159-1167.
66. Finch C. Regulators of iron balance in human. *Blood* 1994;84:6,1697-1702.
67. Hancock DE, Onstad JW, Wolf PL. Transferrin loss into the urine with hypochromic, microcytic anemia. *Am J Clin Pathol* 1976;65:73-78.
68. William JW, Beutler E, Erslev JA, Rudles WR. Hematology. McGraw-Hill Book Company, New York 1972 Cap 32 pp 349-357.
69. Zhou XJ, Vaziri ND. Erythropoietin metabolism and pharmacokinetics in experimental nephrosis. *Am J Physiol* 1992;263:F812-F815.