



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

CUANTIFICACION DE α -TOCOFEROL EN RATAS
CON SINDROME NEFROTICO POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

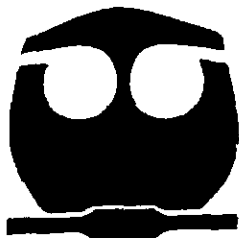
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

J U A N A M A N C E R A D I A Z



MEXICO, D. F.

1999

276055

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE :	PROF. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
VOCAL :	PROF. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
SECRETARIO :	PROF. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ
1 ER. SUPLENTE	PROF. ADRIANA CAMACHO VILLANUEVA
2 DO. SUPLENTE	PROF. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ GÓMEZ

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 209 DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ Y FUE APOYADO POR UN DONATIVO DE CONACYT (1003 PM).

TUTOR :


DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

SUSTENTANTE :


JUANA MANCERA DÍAZ

Con amor y gratitud a las personas que me han ayudado para culminar este proyecto principalmente a Dios y a mis padres:
Enedina Díaz Torres y Nicolás Mancera González por los consejos y el apoyo que me han brindado.

A mis hermanos: Felipe de J.
María del Carmen C.
María Teresa
Saúl

A mi sobrina Claudia M.M.

**Agradezco al Dr. José Pedraza Chaverri por sus sabios
consejos e incansable ayuda y paciencia para la
culminación de este estudio.**

**A la Dra. Irma Ofelia Bernal Iugo y
a la maestra Sobeida Sánchez Nieto
por sus revisiones y sugerencias para esta tesis.**

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología de la Facultad de Química por toda su ayuda: Tino, Omar, Angeles, Yadira, Sonia, Aurelio, Dra. Marielena Dra. Martha, Margarita, Maricela, Leti y Lupita.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	
1. Características del síndrome nefrótico	1
2. Radicales libres	2
3. Mecanismos de defensa contra los radicales libres	3
4. Vitamina E y lipoperoxidación	4
5. Absorción y transporte de la vitamina E	7
6. Distribución de la vitamina E	10
7. Síndrome nefrótico y α -tocoferol	11
OBJETIVO	13
HIPÓTESIS	14
IV MATERIAL Y MÉTODOS	15
V. RESULTADOS	27
VI DISCUSIÓN	33
VII CONCLUSIONES	36
VIII REFERENCIAS	37

ABREVIATURAS

ERO	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
SN	SÍNDROME NEFRÓTICO
ANP	AMINONUCLEÓSIDO DE PUROMICINA
Q	QUILOMICRÓN
RQ	REMANENTE DE QUILOMICRÓN
VLDL	LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD
LDL	LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD
HDL	LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD
Lip	LIPOPROTEÍNA LIPASA
CP	CÉLULAS PARENQUIMALES
CNP	CÉLULAS NO PARENQUIMALES
MDA	MALONDIALDEHÍDO
$O_2^- \cdot$	RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO
H_2O_2	PERÓXIDO DE HIDRÓGENO
$\cdot OH$	RADICAL HIDROXILO
SOD	SUPERÓXIDO DISMUTASA
CAT	CATALASA
GPX	GLUTATIÓN PEROXIDASA
HPLC	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (SIGLAS EN INGLÉS).

RESUMEN

La vitamina E es el término genérico que se utiliza para denominar a los tocoferoles que contienen una cadena de fitol saturada y a los tocotrienoles que poseen una cadena de fitol insaturada. Existen cuatro isoformas en la naturaleza, las cuales difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo de cromanol así como en el grado de actividad biológica y antioxidante. El α -tocoferol es el componente predominante en la sangre y tejidos de humanos y animales y el que posee la actividad biológica más alta. Es un antioxidante liposoluble que protege de la oxidación por radicales libres a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas. El grupo 6-hidroxiilo del α -tocoferol está involucrado en la terminación de la lipoperoxidación y el carbono 2 de la cadena de fitol facilita la incorporación y retención de esta vitamina en las biomembranas.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) están involucradas en el síndrome nefrótico (SN) inducido por aminonucleósido de puomicina (ANP). Este modelo es importante porque se asemeja a la enfermedad de cambios mínimos del humano. Se caracteriza por el aumento en la excreción de proteínas en la orina (proteinuria) lo que ocasiona otras anomalías como disminución de albúmina en plasma, aumento de colesterol, lípidos y lipoproteínas así como anomalías en la coagulación y alteraciones inmunológicas de tipo humoral.

Se ha demostrado que una dieta alta en vitamina E disminuye el daño renal causado por ANP, por lo que es probable que estos animales presenten una deficiencia de esta vitamina. Además, es posible que el estrés oxidativo cause una redistribución de α -tocoferol en los tejidos de estas ratas, como se ha demostrado con otros agentes que inducen daño oxidativo. Para estudiar lo anterior se cuantificó la distribución del α -tocoferol en plasma y tejidos de animales controles y con SN, inducido por una inyección única de ANP (75 mg/Kg de peso), y alimentados con una dieta normal en vitamina E.

Para corroborar que las ratas tenían SN se determinó la concentración de proteínas totales, albúmina, colesterol, nitrógeno de urea y creatinina en plasma y proteínas totales y creatinina en orina. Por otro lado se midió la concentración de α -tocoferol en plasma, riñón, glándula adrenal, bazo, hígado, corazón, pulmón, testículo, músculo y cerebro para ver si había una redistribución del α -tocoferol en las ratas con SN.

Las ratas con SN desarrollaron proteinuria los días 4-10; y el pico máximo se alcanzó a los 8 días. En las ratas con SN disminuyeron las proteínas totales y la albúmina, el colesterol y el nitrógeno de urea aumentaron, mientras que la creatinina plasmática no cambió. El contenido de α -tocoferol de las ratas con SN experimental aumentó 3 veces en el plasma, 1.5 veces en la glándula adrenal y 1.1 veces en el testículo y disminuyó 20% en bazo.

Las ratas con SN no presentaron una deficiencia generalizada de α -tocoferol sino que por el contrario se caracterizaron por una alteración en su distribución como se hizo evidente por el aumento de esta vitamina en plasma, glándula adrenal y testículo y por una disminución en bazo.

Las ratas con SN no mostraron una deficiencia de vitamina E en riñón. Sin embargo esta redistribución es consecuencia, probablemente, de las alteraciones en el transporte de esta vitamina, como consecuencia de la hiperlipoproteinemia lo que conduce a un aumento en los niveles circulantes de α -tocoferol.

Debido a lo anterior la captación de α -tocoferol por algunos órganos pudiera alterarse lo que merecería estudios adicionales.

I. INTRODUCCIÓN

1. Características del síndrome nefrótico.

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad que se caracteriza principalmente por proteinuria (pérdida masiva de proteínas por la orina), lo que ocasiona otras anomalías como hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia, hiperlipidemia, anomalías en la coagulación, alteraciones inmunológicas de tipo humoral y celular, aumento en la susceptibilidad de infecciones, edema, retención de sodio y alteraciones en la concentración de casi todas las proteínas plasmáticas (1-6).

El aumento en la filtración de proteínas plasmáticas es consecuencia de la alteración de la barrera de filtración glomerular, la cual está compuesta por células endoteliales, membrana basal glomerular y células epiteliales, que en conjunto forman una barrera de carga eléctrica y de tamaño. La barrera de carga está constituida por sialoproteínas y heparán sulfato proteoglicanos (HSPG), que le confieren una carga neta negativa. El sitio preciso de la barrera de tamaño no se conoce pero es probable que sea la membrana basal glomerular. Las moléculas de un tamaño molecular menor a 6 nm pasan libremente (1,2).

Hiperlipidemia

La disminución del contenido de proteínas en la circulación, principalmente albúmina causa una disminución en la presión oncótica, lo que estimula la producción de lipoproteínas en el hígado. Este aumento, junto con la disminución en el catabolismo de las lipoproteínas produce hiperlipoproteinemia.

Alteraciones en el metabolismo de los lípidos.

En el SN están elevadas prácticamente todas las fracciones de lípidos y lipoproteínas séricas, incluyendo el colesterol y todas sus fracciones (total, libre y esterificado), así como los fosfolípidos, en tanto que los triglicéridos no siempre se elevan. Los ácidos grasos libres no cambian, aunque la fracción unida a albúmina está reducida. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y las de baja densidad (LDL) aumentan, mientras que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) no siempre aumentan e incluso pueden disminuir. 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 (7). Estos trastornos se normalizan con rapidez cuando remite el SN.

Edema

La disminución en la presión oncótica favorece el movimiento de fluidos del compartimento vascular al intersticial causando edema y ascitis.

SN experimental

Debido a que el SN inducido en ratas con ANP (aminonucleósido de puromicina) se parece mucho a la enfermedad de cambios mínimos en el humano, se ha utilizado como un modelo para estudiarlo (2-6,8,9). Aunque también el SN puede ser inducido por adriamicina (10).

- El SN agudo se presenta al inyectar una sola dosis de ANP, que puede ir desde 50 hasta 150 mg/Kg de peso corporal. La administración de ANP presenta un período latente que va de 5 a 21 días dependiendo de la dosis y vía de administración. En este modelo, las características del SN remiten después de un período de tiempo que depende de la dosis administrada.
- El SN crónico es un modelo que puede producirse con inyecciones repetidas de ANP a menores dosis, las cuales mantienen el estado crónico de la proteinuria. El modelo de nefrosis crónica por ANP presenta lesiones glomerulares parecidas a la glomeruloesclerosis focal y segmentaria del humano (11,12).

2. Radicales libres.

Un radical libre es cualquier especie atómica o molécula que tenga uno o más electrones desapareados. Los radicales libres son muy reactivos y buscan con avidez completar su par electrónico, y esto se logra:

- a.- Mediante una reacción entre dos radicales.
- b.- Sustrayendo un electrón de otra molécula la cual se convierte entonces en un radical (reacciones en cadena).

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua, hay una pequeña proporción de electrones, que escapa a la cadena respiratoria y reducen parcialmente al oxígeno. Induciendo la formación del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), dando origen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$). estos metabolitos intermediarios del oxígeno se conocen como especies reactivas del oxígeno (ERO).

Existen evidencias que sugieren, que el desbalance entre la producción de ERO y los mecanismos de defensa antioxidante juegan un papel importante en la patología de ciertas enfermedades glomerulares,

entre las que se encuentra el SN de cambios mínimos (SNCM). También están relacionados con otras enfermedades tales como enfisema pulmonar, ataques cardíacos, apoplejías, en la iniciación y promoción del cáncer, y aterosclerosis (13,14).

La membrana celular es un blanco de los radicales, principalmente porque los fosfolípidos de las membranas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que son vulnerables a la oxidación. Los resultados de la peroxidación lipídica producen alteraciones en algunas de las propiedades de la membrana, tales como la fluidez, el transporte iónico y algunas actividades enzimáticas (15).

Se tiene evidencia de la presencia de las ERO en el SN inducido por ANP, por la medición directa o indirecta de estas especies en este modelo experimental (16,17). Kawaguchi *et al.* (18), encontraron en cultivos de células glomerulares tratadas con ANP un incremento de H_2O_2 , en comparación con las células no tratadas. Ricardo *et al.* (19) encontraron un aumento en la producción de $\cdot OH$ y $O_2^{\cdot -}$ en glomerulos en cultivo tratados con ANP. Gwinner *et al.* (20) también encontraron evidencias de estrés oxidativo renal después de la inyección del ANP.

La cuantificación de los productos de lipoperoxidación como el malondialdehído, es otra forma directa de evaluar la participación de las ERO en este modelo. Se ha encontrado que una sola inyección de ANP produce lipoperoxidación renal en los primeros 10 días. El pico máximo de lipoperoxidación se presenta el día 2, y en el día 11 regresa a valores normales, aún cuando todavía existe proteinuria (21). La lipoperoxidación renal también aumenta en el modelo crónico producido por múltiples inyecciones de ANP (22).

3. Mecanismos de defensa contra los radicales libres.

Hay diversos mecanismos que protegen a la célula de los radicales libres, estos mecanismos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Los mecanismos enzimáticos principales son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (23) (Fig. 1).

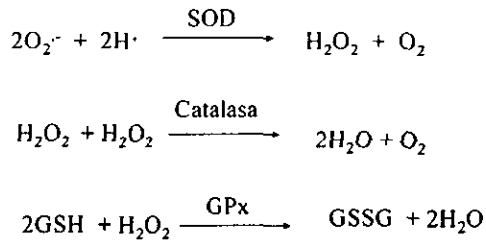


Fig.1. Enzimas antioxidantes y su acción contra los radicales libres.

La glutatión reductasa es otra enzima importante ya que convierte al glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH), impidiendo así que se agoten las reservas de GSH.

Son numerosas las sustancias antioxidantes conocidas, muchas de ellas ampliamente utilizadas como conservantes en la industria alimentaria y otras frecuentemente manejadas en medicina. Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son ácido ascórbico, carotenoides, selenio, y vitamina E (24-27).

4. Vitamina E y lipoperoxidación

La vitamina E es el término genérico que se utiliza para denominar a los tocoferoles que contienen una cadena de fitol saturada y a los tocotrienoles que poseen una cadena de fitol insaturada. En la naturaleza las isoformas de tocoferoles y de tocotrienoles que existen son α, β, γ y δ . Estas formas difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo de cromanol así como en el grado de actividad biológica y antioxidante.

El α -tocoferol es el componente predominante en la sangre y tejidos de humanos y animales, y es el que posee la actividad antioxidante más alta, seguido por el γ -tocoferol (14,28-31).

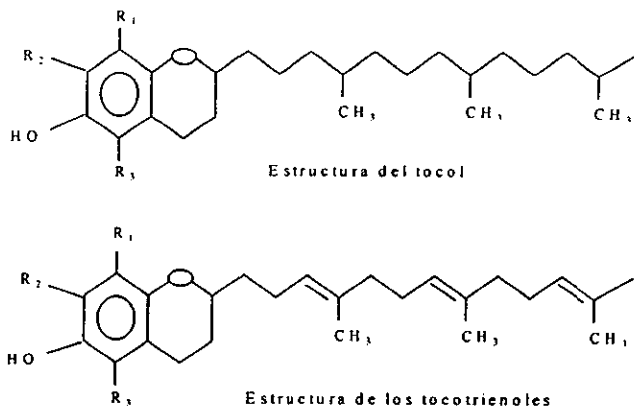


Fig. 2. Estructura del tocol y los tocotrienoles.

La R representa el grupo funcional para las diferentes isoformas. Para α -tocoferol; R_1 , R_2 , R_3 son grupos metilos (CH_3). β -tocoferol; $R_1=CH_3$, $R_2=H$ (Hidrógeno), $R_3=CH_3$. δ -tocoferol; $R_1=CH_3$, R_2 y $R_3=H$. γ -tocoferol; R_1 y $R_2=CH_3$ y $R_3=H$. La correspondiente nomenclatura es utilizada para los tocotrienoles, cuando tres dobles ligaduras están localizadas en la cadena lateral.

El sitio activo es el grupo 6-hidroxilo del α -tocoferol, está involucrado en la terminación de la lipoperoxidación. En cuanto a la cadena fitol en el carbono 2 facilita la incorporación y retención del α -tocoferol en las biomembranas (28,32).

El α -tocoferol es un antioxidante liposoluble que protege a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas de la oxidación por radicales libres y la terminación de la lipoperoxidación (13,33). Los fosfolípidos de las membranas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, que son vulnerables a la peroxidación, ya que los dobles enlaces carbono-carbono debilitan la unión carbono-hidrógeno del átomo de carbono vecino. La lipoperoxidación se lleva a cabo de la siguiente manera (Fig. 3):

4.1. -Comienza por la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado, dejando al átomo de carbono un electrón no apareado. La sustracción del hidrógeno se lleva a cabo por un metal (Fe^{2+} , Cu^{+}).

4.2. -Este radical lipídico puede reaccionar con oxígeno (O_2) o moléculas del radical hidroxilo ($\cdot OH$) para formar un radical hidroperóxido lipídico.

4.3.-Este radical puede sustraer otros átomos de hidrógeno de otras moléculas de lípidos y continuar esta reacción en cadena, lo cual produce una variedad de productos.

4.4.- El α -tocoferol inhibe la fase de propagación la cual genera un hidroperóxido el cual se va a degradar a etano, pentano y malondialdehído. El malondialdehído es el único compuesto formado con tres o más dobles ligaduras y se emplea como una medida de la peroxidación de los lípidos junto con el etano del carbono 2 terminal de los ácidos grasos $\omega 3$ y el pentano del carbono 5 terminal de los $\omega 6$ (28,33).

Al inhibir la acción de los radicales libres se forma un radical de α -tocoferol el cual es medianamente estable, ya que el electrón no apareado del átomo de oxígeno en el carbono seis, puede alterar la estructura del anillo aromático y de ese modo aumentar la estabilidad.

Este radical de α -tocoferol puede ser reducido posteriormente por ascorbato y glutatión (25). Otro posible destino del radical de α -tocoferol es la formación de α -tocoferil quinona y la reacción con otro radical de α -tocoferol para la formación de un dímero.

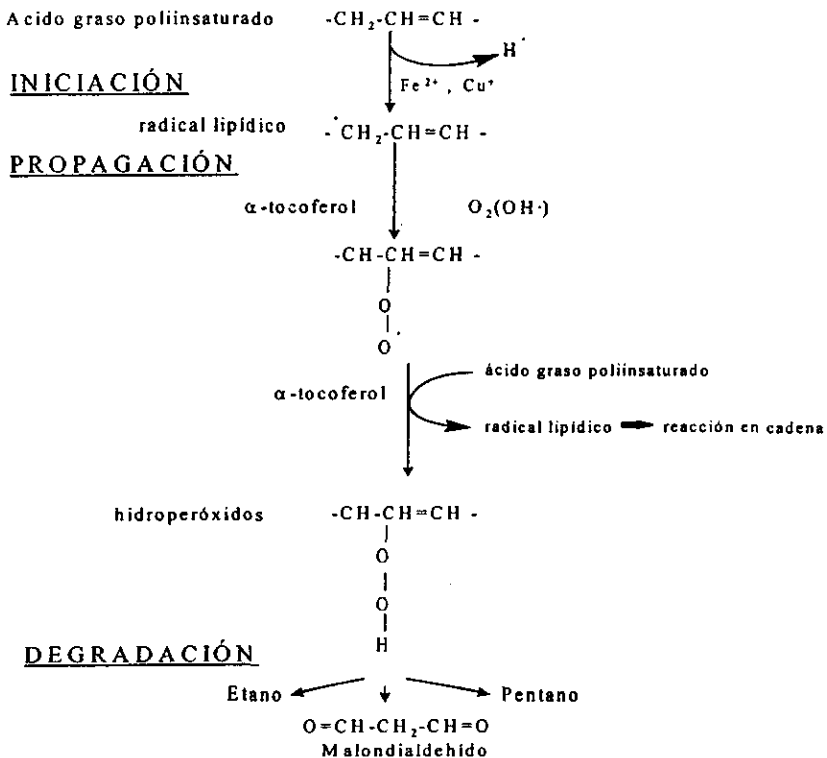


Fig. 3. La lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y el sitio de acción antioxidante del α -tocoferol.

La vitamina E tiene un papel importante en procesos biológicos como: estimulación de la respuesta inmune (14), en la prevención del desarrollo de la aterosclerosis (34,35), enfermedades coronarias (36) y carcinogénesis (34,37) y en la reducción de la glomeruloesclerosis (24).

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de vitamina E varían considerablemente entre las especies. En general, sin embargo, los tejidos blanco son los sistema neuromuscular, vascular y reproductivo (28,31).

5. Absorción y transporte de la vitamina E.

La grasas absorbidas a partir de la alimentación, así como la vitamina E requieren de un transporte especial en el plasma sanguíneo, para lo cual se requiere una lipoproteína que es una estructura dinámica que asocia un núcleo formado por triacilgliceroles y ésteres de colesterol con una cubierta anfipática (fosfolípidos, colesterol) y proteínas (apoproteínas). Estas lipoproteínas plasmáticas transportan lípidos y vitamina E a varios tejidos donde unas enzimas específicas y unos receptores de membranas van a actuar sobre ellas. Se clasifican en función a su densidad en orden creciente: Q (quilomicrones) VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y HDL (lipoproteínas de alta densidad) (Fig.4).

La absorción intestinal de lípidos y vitaminas oleosolubles dependen de la función pancreática, secreción biliar y la formación de micelas así como también de la penetración de estas a través de la membrana intestinal. Datos adicionales sugieren que un medio con triglicéridos estimula el proceso de absorción. Mientras que el ácido retinoico y las cadenas largas de ácidos grasos poliinsaturados reducen la absorción de la vitamina E. Esta absorción ocurre principalmente en la parte alta y media del intestino delgado de animales. Las micelas conteniendo vitamina E, pueden difundir pasivamente a través de la orilla cepillosa del intestino, pero los mecanismos por los cuales la vitamina E y algunas de sus isoformas son transportadas a través de las células epiteliales intestinales se entiende aun muy poco (28)

El α -tocoferol es liberado del enterocito (célula intestinal) hacia la linfa y es incorporado dentro de los quilomicrones (Q). Éstos son catabolizados por la acción de la lipoproteína lipasa (LpI), la cual está ligada a la superficie del endotelio en el revestimiento de las paredes capilares del intestino formando los remanentes de quilomicrón (RQ), los cuales son tomados por el hígado, específicamente por el

receptor de la apolipoproteína E, localizado en las células parenquimales (CP), se ha encontrado cerca del 75% del α -tocoferol en estas células y un 25% en las células no parenquimales (CNP) del hígado. El α -tocoferol es secretado de las células parenquimales del hígado en asociación con las LDL, estas partículas son metabolizadas por la lipoproteína lipasa. Probablemente parte del α -tocoferol, en asociación con los quilomicrones y VLDL, es transferido a las células periféricas y a las HDL durante la lipólisis. Las LDL que se forma durante el metabolismo de las VLDL son tomadas por fagocitosis, mediada por un receptor, y durante este proceso se libera α -tocoferol.

Una cantidad importante de vitamina E se secreta sin cambios a la bilis y otra no se absorbe en el intestino y se desecha por las heces.

A diferencia de otras vitaminas oleosolubles, ésta no tiene una proteína acarreadora específica en la sangre, se sabe que en humanos y ratas es transportada por las lipoproteínas. El α -tocoferol en las ratas se encuentra en mayor cantidad en las HDL y las VLDL (30,31), sin embargo en los humanos la mayor cantidad de α -tocoferol se encuentra en las LDL (14,29,38,39).

Poco se sabe sobre el transporte intracelular del α -tocoferol. Se ha identificado una proteína acarreadora de α -tocoferol de 30 KDa en el citoplasma hepático y se cree que podría regular las concentraciones de α -tocoferol en el plasma, ya que se ha localizado solo en el hepatocito incorporando preferentemente α -tocoferol dentro de las VLDL nacies. Se ha identificado otra proteína que se une a α -tocoferol en el citosol del corazón e hígado con una masa molecular de 14.2 KDa. Esta proteína que une preferencialmente α -tocoferol, con respecto a δ y γ tocoferol, estimula de 8 a 10 veces la transferencia de α -tocoferol de los liposomas a la mitocondria *in vitro*. Se ha sugerido que esta proteína de bajo peso molecular puede ser la responsable del transporte intracelular y distribución del α -tocoferol en tejidos (31).

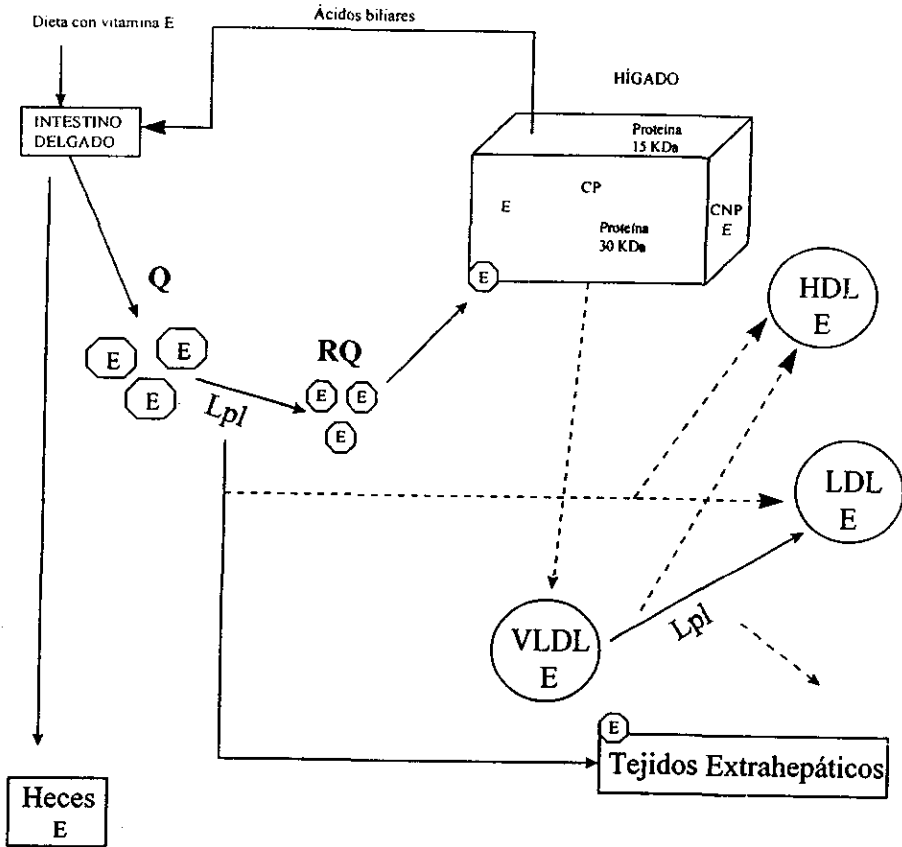


Fig. 4 Transporte de la vitamina E

La vitamina E se absorbe durante la digestión de los lípidos y es transportada en la sangre por las lipoproteínas, primero por incorporación a los quilomicrones (Q), que distribuyen la vitamina a tejidos que contienen lipoproteína lipasa (Lpl) y al hígado como remanente de quilomicrón (RQ) y segundo, para secreción desde el hígado en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) las cuales por acción de la Lpl dan origen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que transportan al colesterol y vitamina E a los tejidos periféricos. Las HDL transportan colesterol y vitamina E desde los tejidos periféricos al hígado.

La concentración de vitamina E en el plasma no depende exclusivamente de la ingesta en la dieta, pudiendo variar este contenido cuando cambia la concentración de las lipoproteínas circulantes manifestándose por una correlación alta entre la concentración de vitamina E en plasma y la de lípidos totales o colesterol (31,40,41). Así, cuando la concentración de lipoproteínas tiende a elevarse, como en el caso de pacientes con hipercolesterolemia, las concentraciones de vitamina E, también se elevan (42).

Gotoh *et al.* (43) estudiaron la inhibición de la oxidación de las LDL por la vitamina E y por compuestos relacionados en humanos sanos y encontraron que la vitamina E actúa como un antioxidante sinérgicamente con otros antioxidantes, esto concuerda con un estudio *in vitro* en donde aumenta la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas cuando se da una suplementación con vitamina C y la vitamina E (27).

La vitamina E se localiza predominantemente en la capa exterior, con su grupo fenólico cerca de la superficie de las partículas de LDL y su eficacia como atrapador de radicales libres disminuye cuando este radical se encuentra en el interior de las LDL.

La prevención de la oxidación de las lipoproteínas es importante ya que reduce la aterogénesis, es decir, la formación de una lesión aterosclerótica (41).

6. Distribución de la vitamina E

Hay evidencias de que la distribución de vitamina E se encuentra alterada cuando se induce estrés oxidativo, lo cual se ilustra con los siguientes ejemplos:

1. - La ingesta crónica de etanol altera la distribución de α y γ tocoferol en el tejido hepático y extrahepático de las ratas (44). Estas ratas presentan un aumento en el peso del hígado, por la acumulación de grasa, sin cambios en el peso total del cuerpo. El consumo de etanol no afecta la concentración de α -tocoferol en plasma, pero aumenta al doble la de γ -tocoferol con respecto a los controles. Cuando la concentración de α y γ -tocoferol se expresa en ng/mg de tejido, la de α -tocoferol no varía pero la de γ -tocoferol aumenta en hígado y pulmón. Por otro, lado si la concentración se expresa en μ g/mg de lípidos, la de α -tocoferol disminuye en hígado y la de α y γ -tocoferol aumentan en testículo.
2. - La administración de metil-etil cetona peróxido (MEKP) induce la lipoperoxidación *in vivo* después de 1-4 horas de tratamiento, produciendo una caída en el contenido de vitamina E plasmática y en el contenido de glutatión en el hígado. Mientras que después de 12 a 24 horas del tratamiento, el

contenido de vitamina E hepática se reduce un 20-25%, para posteriormente regresar a valores normales (45).

3. - La exposición de ratas al ozono aumenta el contenido y la captación de vitamina E en el pulmón (46).

Otros factores que inducen alteraciones en la distribución de la vitamina E son:

Sexo: El contenido de α -tocoferol en hígado y glándula adrenal de ratas hembra es el doble que el de los correspondientes órganos en las ratas macho (47).

Dieta baja en proteínas: El contenido de α -tocoferol en la mayoría de los tejidos de ratas macho en crecimiento disminuye con una dieta baja en proteínas, sin importar si ingieren una dieta normal o alta de vitamina E (48).

Colesterol: Al suplementar la dieta con vitamina E concomitantemente con colesterol, aumenta el contenido de α -tocoferol en el tejido vascular. Cuando se examinó el contenido de α -tocoferol en suero, se encontró 14% más alto en las ratas que recibieron colesterol y vitamina E que en las que recibieron solo vitamina E.

De los tejidos estudiados (riñón, músculo esquelético, hígado y arteria aorta) el mayor contenido de α -tocoferol se encontró en hígado independientemente de la presencia o ausencia de colesterol en la dieta con vitamina E (41).

Aceite oxidado: La retención de la vitamina E en los tejidos de las ratas disminuye por una dieta de aceite frito oxidado (AFO) (40). Hay una reducción significativa de las concentraciones de α -tocoferol en plasma, y por consiguiente una reducción en la mayoría de los tejidos de las ratas. Disminuye el contenido de α -tocoferol en la glándula adrenal, hígado y bazo, tejidos que contienen el nivel más alto del antioxidante en las ratas suplementadas. Una dieta con AFO disminuye el contenido de α -tocoferol y aumenta las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, esto puede mejorarse por una suplementación con vitamina E.

7. Síndrome nefrótico y α -tocoferol

Hay evidencia de que los radicales libres de oxígeno se encuentran involucrados en la patogénesis del SN experimental inducido por ANP. La lipoperoxidación renal aumenta en ratas con SN inducido por

ANP desde el primer día, indicando que el ANP tiene un efecto inmediato sobre el riñón. Además de aumentar la lipoperoxidación en hígado, corazón, pulmón, cerebro y testículo (21). En este síndrome la presentación de la lipoperoxidación ocurre antes de la proteinuria.

En el síndrome nefrótico agudo inducido por ANP se ha encontrado que la suplementación con vitamina E y Se disminuye las alteraciones de la ultraestructura renal y la proteinuria, en tanto que la lipoperoxidación renal permanece sin cambios. Por el contrario en ratas alimentadas con una dieta deficiente en estos antioxidantes las alteraciones son más severas y la lipoperoxidación renal aumenta (15).

Una dieta suplementada con los antioxidantes vitamina E o probucol no atenúa la inflamación intersticial o fibrosis en el SN agudo (49). Esto puede deberse, probablemente, a que como consecuencia de la proteinuria existe otros factores que son mediadores predominantes del daño al túbulo intersticial en humanos y en modelos experimentales de enfermedades renales.

En el síndrome nefrótico crónico inducido por ANP una suplementación con vitamina E disminuye las alteraciones en la estructura y función renal y reduce el contenido de malondialdehído en riñón e hígado (22). Esto concuerda con los hallazgos de Lee *et al.* (50), quienes lograron disminuir el grado de glomerulosclerosis focal y segmentaria inducida por múltiples inyecciones de ANP con una dieta rica en vitamina E y probucol.

En niños con SN los niveles de vitamina E disminuyen un 23% y los niveles de malondialdehído aumentan en suero (51), esto contrasta con lo encontrado en pacientes adultos con glomerulonefritis crónica y SN ya que en suero aumenta el contenido de vitamina E, vitamina A y ésteres de retinol en suero (52).

II. OBJETIVO

Investigar si existen alteraciones en la concentración plasmática y en la distribución tisular de α -tocoferol en ratas con síndrome nefrótico experimental inducido por aminonucleósido de puromicina.

III. HIPÓTESIS

En ratas con SN se espera que aumente la concentración de α -tocoferol en plasma debido a la alta concentración de lipoproteínas circulantes, y como consecuencia del estrés oxidativo, una deficiencia de esta vitamina en el riñón que es el blanco principal del ANP.

IV. MATERIAL Y METODOS

1) Reactivos:

El aminonucleósido de puromicina (ANP) y el pirogalol se adquirieron de Sigma Chemical Co. El estándar de α -tocoferol (250 mg) fue adquirido de USPC, Inc con número de catálogo 66760. El metanol y etanol grado HPLC se obtuvieron de Mallinckrodt Baker, Inc. Las otras sustancias fueron grado reactivo y se obtuvieron comercialmente.

2) Diseño experimental:

Animales: Se usaron 24 ratas macho Wistar de aproximadamente 200 g de peso. Estos animales se dividieron en 2 grupos, a uno de los cuales se le indujo el SN mediante una sola inyección subcutánea de ANP al 2% en solución salina isotónica (SSI) con una dosis de 75 mg/Kg de peso. Todos los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas para la determinación de peso corporal y consumo de alimento, así como para la recolección de orina con un ciclo de 12 h luz 12 h oscuridad teniendo libre acceso al agua y al alimento.

Perfusión *in vivo*: 10 días después de la administración del ANP, las ratas se anestesiaron y se colocaron en una mesa con temperatura controlada. Se introdujo un tubo de polipropileno P-50 en la arteria femoral, se tomaron muestras de sangre en tubos conteniendo EDTA, mediante punción cardíaca y se perfundió con solución salina al 0.9% con un flujo de 20 ml/min con el fin de eliminar la sangre de todos los tejidos de interés.

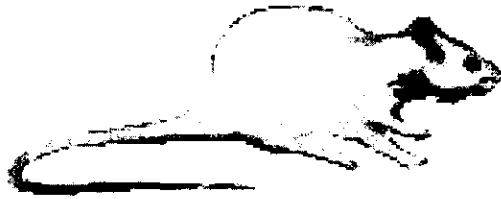
Después de la perfusión se tomaron muestras de los siguientes tejidos: riñón, glándula adrenal, bazo, hígado, corazón, pulmón, testículo, músculo y cerebro, se protegieron de la luz y se almacenaron a -70°C para su análisis posterior.

Para la obtención de plasma, se tomaron alícuotas de sangre y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos y el plasma se separó en tubos eppendorf.

Se realizaron las siguientes determinaciones:

En plasma: proteínas totales, α -tocoferol, albúmina, colesterol, creatinina y nitrógeno de urea en el día 10.

En orina: proteínas totales durante todos los días del estudio (1-10) y creatinina en el día 10.



24 ratas

Inyección subcutánea de SSI
12 ratas CT

Inyección subcutánea de ANP
12 ratas SN

Determinaciones durante el estudio
(0-10 días): peso corporal
consumo de alimento
orina: volumen urinario
proteínas urinarias
creatinina (día 10)

En el día 10 se sacrificaron las ratas y se
realizaron las siguientes determinaciones:

Sangre

↓
Plasma: proteínas totales
albúmina
colesterol
creatinina
nitrógeno de urea
 α -tocoferol

Después de la perfusión se tomaron
muestras de los siguientes órganos:
riñón, glándula adrenal, bazo,
hígado, corazón, pulmón, testículo,
músculo y cerebro.

↓
Cuantificación de α -tocoferol

Fig. 5. Diseño experimental

Determinaciones bioquímicas

3.1 Determinación de proteínas

Se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (53) para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

1. - Tricloroacético (TCA) al 10%.

2. - Solución A

Carbonato de sodio 2.0%

Hidróxido de sodio 0.4%

Tartrato de sodio y potasio 0.02%

3. - Solución B

Sulfato de cobre 0.5%

4. - Solución C

Se prepara al momento de usarse con 50 ml de la solución A + 1.0 ml de la solución B.

5. - Solución D

Reactivo de Folin & Ciocalteu' 1N. Se preparó al momento de usarse a partir de una solución concentrada 2N.

6. - Albúmina sérica bovina (ASB) a una concentración de 0.5 mg/ml, con esta solución se prepara una curva patrón de 5 hasta 50 μg / 0.2 ml (Fig. 6).

Antes de cuantificar las proteínas en orina, se tomaron 100 μl de orina y se agregó 1 ml de TCA, se agitó y centrifugó 15 minutos a 2500 rpm, el sobrenadante se tiró por decantación. Esto se realizó 2 ó 3 veces en total, hasta que el precipitado quedara blanco, este se resuspendió en 600 μl de NaOH 0.1 M y se agitó, posteriormente se hicieron diluciones pertinentes para obtener resultados dentro de la curva patrón.

La solución de albúmina o la muestra se colocan en un volumen final de 0.2 ml.

A todos los tubos (estándar, plasma y orina) se les agregó 1 ml de la solución C se mezcló y puso a reposar por 10 minutos, posteriormente se añadió 0.1 ml de la solución D, se agitó vigorosamente y después de 30 minutos se determinó la absorbencia a una longitud de onda de 660 nm.

El cálculo de la concentración de las muestras se hizo a partir de la curva estándar.

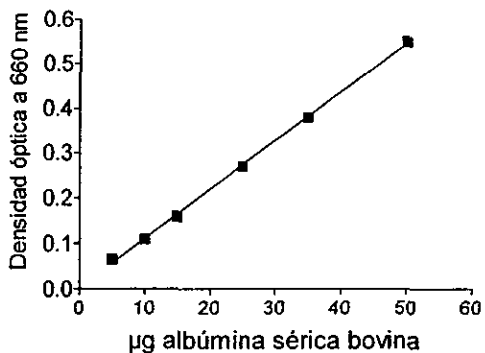
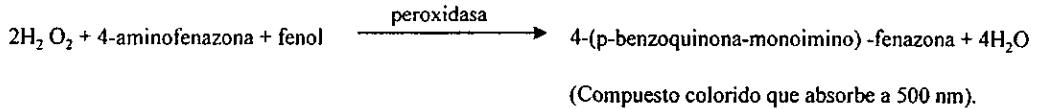
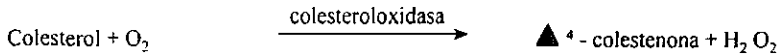
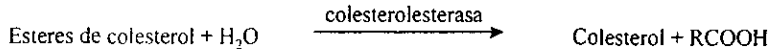


Fig. 6. Curva patrón para proteínas urinarias y plasmáticas.

3.2 Determinación de colesterol (54).

Se realizó utilizando el estuche comercial Monotest CHOD-PAD que es una prueba enzimática colorimétrica. Contiene un frasco con solución reactiva (SR) la cual se disuelve aproximadamente en 32 ml de agua destilada. En tubos de ensayo se agregan 10 µl de plasma mas 1 ml de la SR, se mezcla y se deja incubar a 20-25°C durante 10 minutos la SR se toma como blanco se lee a una $\lambda=500$ nm. La absorbencia se multiplica por 575 y la concentración de colesterol se expresa en mg/dl.

Reacciones del ensayo:



3.3 Determinación de albúmina (55-57).

Se utilizó un estuche de Sigma Diagnostics. Contiene un frasco con solución reactiva de verde de bromocresol el cual forma un complejo colorido con la albúmina. Para determinar la concentración de albúmina se colocó 1 ml de la solución reactiva de verde de bromocresol, se adicionaron 10 µl de agua desionizada (como blanco), de estándar de albúmina (5 g/dl) y de plasma en cada tubo, respectivamente. Se agitó y se leyó a 628 nm. El rango de linealidad del método es hasta 8 g/dl de la albúmina.

Para la determinación de albúmina en plasma se hizo lo siguiente:

$$\left[\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{estándar}} - A_{\text{blanco}}} \right] \times \text{concentración del estándar}$$



3.4 Determinación de creatinina (58,59).

La creatinina se midió en un sistema autoanalizador 4030 de Boehringer Mannheim utilizando un estuche de Lakeside que contiene un estándar de creatinina con una concentración de 2 mg/dl, ácido pícrico e hidróxido de sodio.

1.- Solución A

Hidróxido de sodio (0.32 M) se diluye con agua bidestilada (dilución 1:5).

2.- Solución B

Se preparó una mezcla 1:1 con el ácido pícrico y la solución A 30 minutos antes de su uso.

Para las determinaciones se colocaron 400 µl de plasma u orina (diluida 1:49) en las celdillas, también se coloca el estándar y el blanco.

Se adicionaron 500 µl de la solución B, después de 30 segundos se leyó la absorbencia del estándar y de la muestra a 490 nm. El límite de linealidad es hasta 10 y 500 mg/dl para plasma y orina, respectivamente.

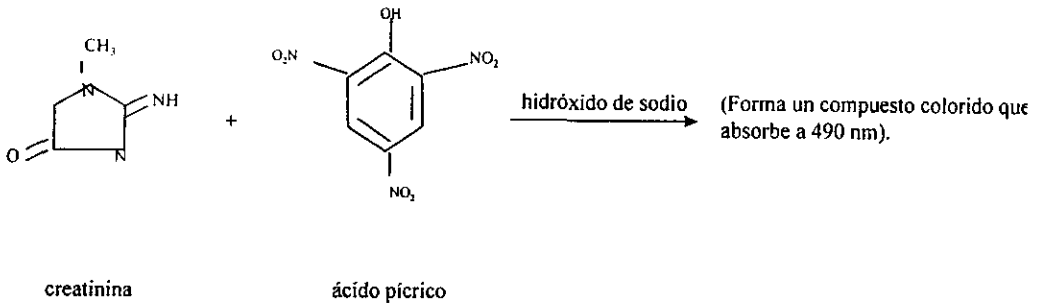
La creatinina en mg/dl se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Plasma} = 2 \times \left[\frac{\text{Absorbencia de la muestra}}{\text{Absorbencia del estándar}} \right]$$

$$\text{Orina} = 100 \times \left[\frac{\text{Absorbencia de la muestra}}{\text{Absorbencia del estándar}} \right]$$

$$\text{Depuración de creatinina (ml/min)} = \left[\frac{\text{mg de creatinina/dl de orina} \times \text{ml de orina/24 h}}{\text{mg de creatinina/dl de plasma}} \right] \times \left[\frac{1 \text{ h}}{1440 \text{ minutos}} \right]$$

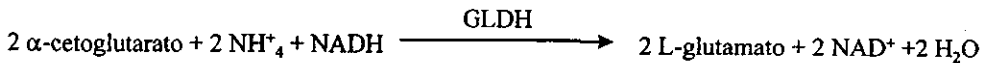
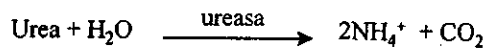
La prueba consiste en la formación de un complejo colorido en medio alcalino, la velocidad de formación del complejo es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.



3.5 Determinación de nitrógeno de urea (60).

El nitrógeno de urea se cuantificó en un sistema autoanalizador 4030 de Boehringer Mannheim. Se utilizó un estuche de Urea Test UV cinético que es un método enzimático que mide la velocidad de cambio de la conductividad en la reacción, el aumento de conductividad en la reacción es proporcional a la cantidad de nitrógeno ureico presente en la muestra. El analizador procesa esta señal y presenta el valor de la concentración de nitrógeno ureico en mg/dl. Se inyectan 10 μl de la muestra con la solución reactiva (ureasa) en la celdilla de reacción. El límite de detección para plasma es de 250 mg/dl.

Reacciones del ensayo:



GLDH= Glutamato deshidrogenasa

4) Cuantificación de α -tocoferol

Las condiciones para trabajar el cromatógrafo de líquidos de alta resolución fueron las siguientes:

Se utilizó un equipo Millipore con las siguientes características:

Bomba: Con cambios de flujo manual modelo 510.

Detector: De longitud variable UV/VIS modelo 486.

Integrador: Modelo 746.

Columna: Nova-pak C18 4 μm de 3.9 X 150 mm de Waters.

Fase móvil: Metanol al 100% grado HPLC.

Flujo: 1.0 ml/min.

Longitud de onda: 292 nm.

Volumen de inyección: 20 μl

Se utilizaron filtros de nylon de 4 mm de 0.2 μm .

Se utilizaron las siguientes soluciones para la cuantificación de α -tocoferol en plasma y tejidos:

- 1.- Pirogalol al 1% en etanol absoluto
- 2.- Ácido clorhídrico concentrado
- 3.- n-Hexano grado reactivo
- 4.- Metanol grado HPLC
- 5.- Potasa etanólica 2.5 M
- 6.- Nitrógeno (gas)
- 7.- Amortiguador de fosfatos 0.01 M (pH=7.4)

En la fig. 7 se observa una curva estándar para la determinación de α -tocoferol por HPLC.

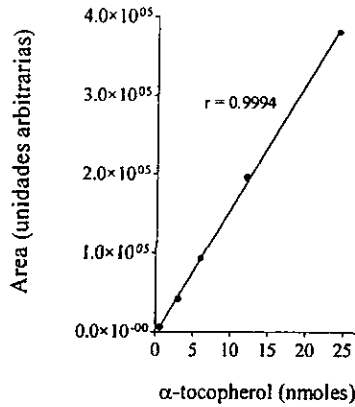


Figura 7. Curva patrón para la determinación de α -tocoferol por HPLC.

Para la construcción de la curva lineal, se hizo una solución patrón de α -tocoferol a partir de esta se hicieron diluciones para tener las siguientes concentraciones: 0.6023, 3.0115, 6.023, 12.046 y 24.092 nmoles.

Los cálculos para la concentración de α -tocoferol en plasma y órganos se realizaron a partir de la curva.

En la tabla 1 se muestran los datos de 28 curvas de referencia de α -tocoferol con su CV.

Tabla. 1. Curvas de referencias

Estándar de α -tocoferol (nmoles)	n	Promedio (Área)	Desviación estándar	CV
0.6023	28	7510	882.8	12
3.0115	28	38710	1904.0	4.9
6.023	28	85390	3228.0	3.8
12.046	28	178100	6022.0	3.4
24.092	28	355100	9526.0	2.7

El contenido de α -tocoferol de los tejidos cayeron en la parte media de la curva.

Para poder cuantificar el α -tocoferol en las muestras se hicieron las siguientes pruebas:

- Se probaron diferentes fases móviles para ver cual era la más adecuada para separar el α -tocoferol tomando en cuenta que tuviera un tiempo de retención razonable.
- El tiempo de corrida óptimo para cada tejido.
- Acerca del contenido de α -tocoferol en cada tejido para poder establecer el intervalo de la curva patrón.
- Diferentes concentraciones de KOH para saponificar y escoger aquella que no afectara la estabilidad del α -tocoferol en los diferentes tejidos.

Cuantificación de α -tocoferol en plasma (48,61,62).

Se tomaron alícuotas de 0.5 ml para las ratas control y de 0.3 ml para las ratas nefróticas. El análisis se realizó por duplicado y en un tercer tubo, se agregó una cantidad conocida de α -tocoferol para ver la recuperación obtenida. A las muestras de plasma se les adicionaron 2 ml de etanol absoluto (conteniendo pirogalol al 1%), 0.1 ml de HCl concentrado y 6 ml de n-hexano. Después, los tubos se agitaron durante 2 minutos se separó la capa de n-hexano y se evaporó con una corriente de nitrógeno, el residuo se reconstituyó con 0.6 ml de metanol grado HPLC y se analizó por HPLC.

La recuperación de α -tocoferol en las muestras de plasma fue de $96.74\% \pm 1.51$ (n=5).

4.2.- Cuantificación de α -tocoferol en los diferentes órganos (48,62).

Se pesó aproximadamente un gramo del tejido y se homogenizó en 4 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M (pH 7.4) y el homogenizado se separó en 4 tubos con 1 ml cada uno.

a) A dos de los tubos, no se les añadió nada (blancos).

b) A los otros dos, se les añadió una cantidad conocida de α -tocoferol.

A todos los tubos se les añadieron 2 ml de etanol absoluto (conteniendo pirogalol al 1%) mas 0.3 ml de KOH 2.5 M, se taparon se agitaron y se incubaron en un baño María durante 30 minutos a 70°C. Al final los tubos se trasladaron a un baño de hielo y a cada tubo se le agregó 1 ml de agua destilada y 4 ml de n-hexano. Se agitaron durante 2 minutos, se separó la capa de n-hexano, se evaporó con una corriente de nitrógeno, el residuo obtenido se reconstituyó con 0.6 ml de metanol grado HPLC y finalmente se analizó por HPLC.

En la tabla 2 se muestran las recuperaciones de α -tocoferol obtenidas para cada uno de los tejidos analizados. Estas variaron de 94.31 a 100.46%.

Tabla. 2. Recuperaciones de α -tocoferol en tejidos.

Tejido (CT)	n	CT		
		Cantidad añadida en nmoles α -tocoferol	Cantidad recuperada α -tocoferol	% de recuperación
Glándula adrenal	10	12.046	11.36 \pm 0.53	94.31 \pm 4.38
Bazo	9	12.046	11.43 \pm 0.62	94.91 \pm 5.15
Corazón	9	12.046	11.76 \pm 0.75	97.63 \pm 6.2
Pulmón	9	12.046	11.57 \pm 0.47	96.01 \pm 3.89
Cerebro	9	12.046	11.55 \pm 1.24	95.85 \pm 10.32
Hígado	9	12.046	11.45 \pm 0.56	95.06 \pm 4.68
Riñón	10	12.046	11.84 \pm 0.71	98.26 \pm 5.97
Testículo	9	12.046	11.95 \pm 0.68	99.20 \pm 5.68
Músculo	10	12.046	11.42 \pm 0.41	94.79 \pm 3.44

Tejido (SN)	n	SN		
		Cantidad añadida en nmoles α -tocoferol	Cantidad recuperada α -tocoferol	% de recuperación
Glándula adrenal	9	12.046	11.49 \pm 0.42	95.36 \pm 3.47
Bazo	11	12.046	11.74 \pm 0.79	97.42 \pm 6.55
Corazón	9	12.046	11.67 \pm 0.84	96.89 \pm 6.95
Pulmón	11	12.046	12.06 \pm 0.38	100.12 \pm 3.17
Cerebro	9	12.046	11.52 \pm 0.92	95.65 \pm 7.63
Hígado	10	12.046	12.07 \pm 0.52	100.24 \pm 4.31
Riñón	10	12.046	12.10 \pm 0.70	100.46 \pm 5.84
Testículo	9	12.046	11.95 \pm 0.69	99.20 \pm 5.74
Músculo	11	12.046	11.40 \pm 0.61	94.62 \pm 5.04

5). Análisis estadístico

Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar. Se compararon el grupo CT y el SN con una prueba de t no pareada, una $p < 0.05$ se consideró significativa. Para la realización de las gráficas se utilizó un software de GraphPad (San Diego, CA).

V. RESULTADOS

A) Caracterización del síndrome nefrótico.

En la Fig. 8 se observa que las ratas con SN desarrollaron proteinuria a partir del día 4. El pico máximo se alcanzó a los 8 días. Esto nos indica que las ratas se encuentran nefróticas y la barrera de filtración glomerular alterada.

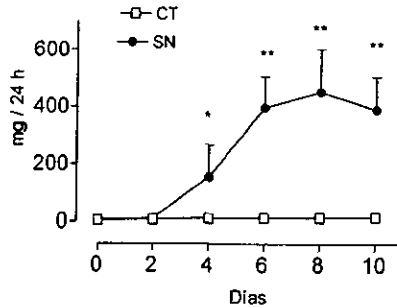


Figura 8. Curso temporal de excreción de proteínas en ratas controles (CT, n=11) y nefróticas (SN, n=12), a lo largo del estudio. * $p < 0.0005$ y ** $p < 0.0001$.

En la Fig. 9 se aprecia que en el volumen urinario, los cambios no fueron significativos. Es importante ya que nos sirve para calcular la depuración de creatinina.

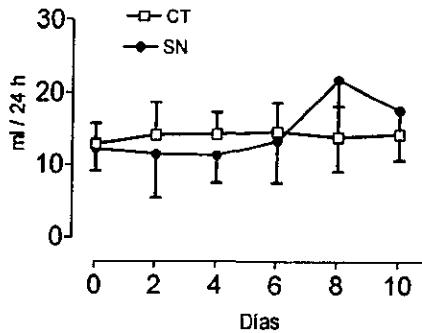


Figura 9. Curso temporal del volumen urinario de ratas controles (CT, n=11) y nefróticas (SN, n=12).

En la Fig. 10 se observa que el peso corporal disminuyó los días 2, 8 y 10 en las ratas con SN. Se observa durante los primeros 6 días un aumento en ambos grupos, sin embargo, en los días 8 y 10, el peso de las ratas nefróticas disminuye.

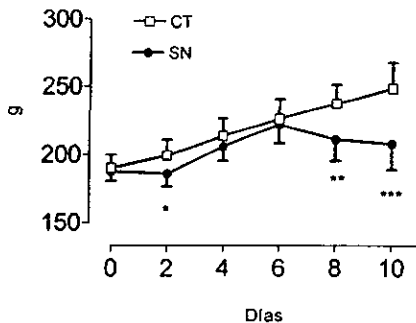


Figura 10. Peso corporal de ratas controles (CT, n=11) y nefróticas (SN, n=12), a lo largo de los diferentes días estudiados. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$.

En la Fig. 11 se observa que el consumo de alimento disminuyó a lo largo de todo el estudio en las ratas con SN. Sin embargo solo alcanzó diferencia significativa los días 6 y 8.

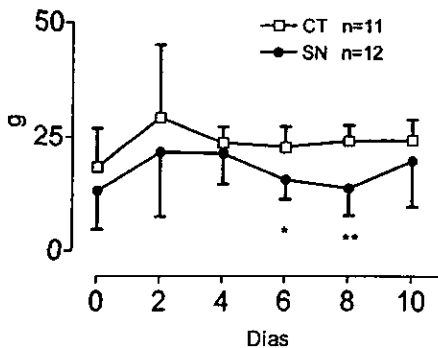


Figura 11. Consumo de alimento de ratas controles (CT, n=11) y nefróticas (SN, n=12), en los diferentes días estudiados. * $p < 0.001$ y ** $p < 0.0001$.

En el plasma de ratas con SN la concentración de proteínas totales y albúmina disminuyó, la de colesterol y nitrógeno de urea aumentó y la de creatinina no cambió (tabla 3).

Las ratas con SN presentaron hipoproteinemia, hipoalbuminemia y aumento en el nitrógeno ureico como consecuencia de la proteinuria, la disminución del contenido de proteínas en circulación principalmente albúmina provoca una baja en la presión oncótica, estimulando la producción de lipoproteínas por el hígado. Este aumento junto con la disminución en el catabolismo de las lipoproteínas produce hipertipoproteinemia e hipercolesterolemia ya que la composición molecular de las lipoproteínas está alterada y su proporción de colesterol es mayor que lo normal.

Tabla 3. Determinaciones bioquímicas en el plasma de ratas controles y con síndrome nefrótico en el día 10

Determinaciones	CT		SN		p
	n		n		
Proteínas (g/dl)	11	64.91 ± 4.60	12	58.67 ± 8.06	0.0352
Albúmina (g/dl)	10	2.64 ± 0.60	11	1.45 ± 0.21	0.0001
Colesterol (mg/dl)	11	52.17 ± 4.36	12	218.11 ± 68.18	0.0001
Creatinina (mg/dl)	11	0.61 ± 0.13	12	0.71 ± 0.48	NS
Nitrógeno de urea (mg/dl)	11	21.73 ± 4.12	12	27.50 ± 6.0	0.0144

La depuración de creatinina no cambió en ratas con SN (0.83 ± 0.45 ml/min vs 1.07 ± 0.33 ml/min en las CT).

B) Cuantificación de α -tocoferol

En la Fig. 12 se aprecia que la concentración de α -tocoferol aumentó en plasma de las ratas con SN, aproximadamente 3 veces.

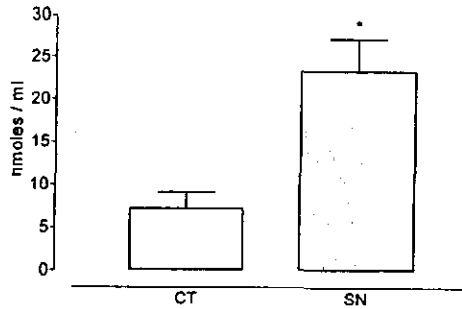


Figura 12. Niveles de α -tocoferol en el plasma de ratas (CT, n=11) y (SN, n=12). *p<0.0001

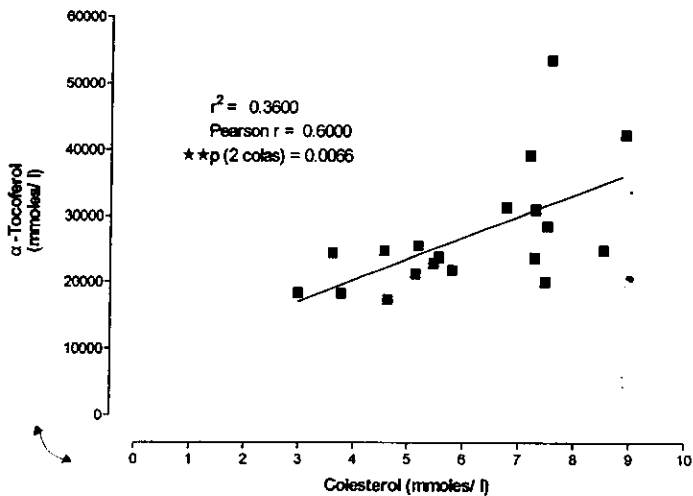
El aumento en el contenido de α -tocoferol se debe a la hiperlipoproteinemia e hipercolesterolemia existente durante el SN, debido a que las lipoproteínas son encargadas del transporte de esta vitamina a diferentes órganos.

En la tabla 4 se muestra el contenido de α -tocoferol en los diferentes tejidos. Se observó un aumento en la glándula adrenal de 1.41 veces y en testículo de 1.22 veces y una disminución del 19% en el bazo de las ratas con SN, mientras que en las demás tejidos no hubo un cambio significativo.

Tabla 4. Contenido de α -tocoferol (nmoles/g de tejido)

Tejidos	n	CT	n	SN	p	
Glándula adrenal	10	260.62 \pm 35.83	9	368.23 \pm 71.06	0.0006	↑ 1.41 veces
Bazo	9	31.51 \pm 5.48	11	25.53 \pm 6.19	0.036	↓ 19.0%
Corazón	9	21.85 \pm 2.95	9	20.20 \pm 4.20	NS	
Pulmón	9	19.49 \pm 9.21	11	18.37 \pm 8.09	NS	
Cerebro	9	19.70 \pm 3.43	9	18.35 \pm 3.42	NS	
Hígado	9	21.09 \pm 5.28	10	18.21 \pm 4.52	NS	
Riñón	10	15.34 \pm 3.25	10	17.28 \pm 4.40	NS	
Testículo	9	12.90 \pm 1.84	9	15.79 \pm 2.82	0.0202	↑ 1.22 veces
Músculo	10	0.88 \pm 0.35	11	1.51 \pm 1.19	NS	

En la Fig. 13 se observa la relación de las concentraciones de α -tocoferol y colesterol en plasma de ratas con SN.



En la Figura 13. Se observa que existe una tendencia positiva entre el contenido de α -tocoferol y el colesterol en plasma de ratas con SN, esta relación alcanzó significancia estadística.

En la Fig. 14 se observa que no hay una tendencia entre el contenido de α -tocoferol y el colesterol de las ratas control.

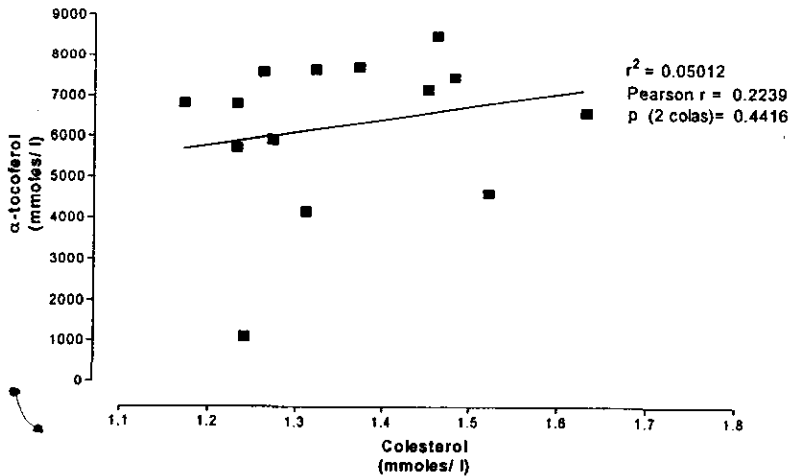


Figura 14. Relación entre el α -tocoferol y el colesterol en plasma en el grupo control.

También se calculó el cociente colesterol / α -tocoferol en ambos grupos de ratas con el fin de ver si había una relación entre el contenido de α -tocoferol y colesterol.

Sin embargo, a pesar de la elevada concentración de α -tocoferol en las ratas nefróticas, este cociente fue similar en ambos grupos (5.22 ± 1.44 en las ratas CT vs 4.59 ± 1.20 en las ratas con SN con una $p < 0.05$) debido a que también aumenta la concentración de colesterol en estas ratas.

VI. DISCUSIÓN

1.-Niveles circulantes de α -tocoferol en el SN

En nuestro trabajo las ratas inyectadas con ANP desarrollaron hipoalbuminemia, hipoproteinemia hipercolesterolemia y proteinuria, lo cual demuestra claramente que desarrollaron SN.

La hipoalbuminemia es un factor crítico para iniciar la hiperlipoproteinemia, la cual se debe a un incremento en la velocidad de síntesis y a la disminución en el catabolismo de las lipoproteínas. El α -tocoferol es transportado por las lipoproteínas (lípidos y proteínas), por lo tanto, se espera que un aumento en la concentración de las lipoproteínas conduzca también a un aumento en la concentración de α -tocoferol. De acuerdo a lo esperado, en este trabajo se encontró un aumento de aproximadamente 3 veces de α -tocoferol en el plasma de las ratas con SN, sin embargo el cociente α -tocoferol / colesterol fue similar al de las ratas controles, lo que podría sugerir que es importante la ingesta alta de vitamina E, en personas con hipercolesterolemia, probablemente para evitar la oxidación de las LDL

Hay solo dos reportes de datos de los niveles circulantes de vitamina E en humanos con síndrome nefrótico, y aunque no son estrictamente comparables debido a que uno se realizó en niños (51) y otro en adultos (52), los resultados son contradictorios puesto que en suero de pacientes adultos con SN se encontraron niveles altos de vitamina E mientras que en niños con SN se encontraron bajos niveles

Es muy importante el aumento de α -tocoferol, ya que esta vitamina inhibe la oxidación de las lipoproteínas y, por lo tanto, favorece su catabolismo normal. En algunas situaciones el α -tocoferol tiene propiedades prooxidantes (cuando no hay suficientes cantidades de coantioxidantes como ascorbato, β -caroteno, etc.). Cuando hay deficiencia de antioxidantes puede haber una modificación química en las LDL y una disminución de su catabolismo (35). En el humano, es muy importante la prevención de la oxidación de las LDL ya que tiene un papel importante en la aterogénesis (43). Cuando abunda el colesterol dentro de la célula, dejan de sintetizarse nuevos receptores de LDL, y así queda bloqueada la incorporación de colesterol y α -tocoferol en la célula. Durante el catabolismo de las LDL hay gran cantidad de colesterol circulante, el cual se introduce a la pared del vaso sanguíneo, ocasiona una línea de grasa, que después se convierte en una lesión con relieve. En la etapa siguiente, los elementos del tejido fibroso producidos por las células del músculo liso (colágena, glucosaminoglicanos, elastina y glucoproteínas) forman una placa fibrosa que contiene lípidos y restos celulares, la cual por último ocluye el vaso sanguíneo. Se encontró que la suplementación con la vitamina E, aumenta el contenido de α -tocoferol en el tejido vascular causando un aumento en las reservas antioxidantes de la pared arterial (41).

Es muy importante la relación existente entre la vitamina E y los fosfolípidos de las membranas biológicas, ya que la membrana plasmática es el tejido blanco para el daño oxidativo y la vitamina E puede proteger y aunque no es el único sistema o compuesto que puede efectuar este proceso de prevención o detoxificación en la membrana.

2.-Contenido de α -tocoferol en los tejidos

En este trabajo se perfundieron los tejidos, para tener un valor más real del contenido de α -tocoferol, en cada órgano analizado, ya que se observó un aumento de α -tocoferol en la sangre de las ratas con SN.

Se ha encontrado que la ingesta y la retención de la vitamina E por los tejidos no es uniforme, en algunos tejidos el intercambio es rápido: plasma, eritrocitos e hígado y en otros el cambio es lento: músculo, testículo, cerebro y la espina dorsal. El tejido neuronal es resistente a la pérdida de vitamina E, se ha encontrado que la función neurológica permanece sin cambios después de 40 semanas con una dieta deficiente de vitamina E (14).

En nuestras ratas control el tejido que tuvo el mayor contenido de α -tocoferol por gramo de tejido fue la *glándula adrenal*, lo cual está de acuerdo con lo informado en la literatura (41,48), y aumenta cuando se indujo el SN. Esta acumulación de α -tocoferol puede deberse a que la glándula adrenal contiene gran cantidad de lípidos insaturados (63), hecho que la podría hacer más susceptible a sufrir lipoperoxidación, y a que se sabe que en el SN inducido por ANP hay un aumento en el estrés oxidativo, lo cual podría aumentar la movilización de vitamina E a este órgano (46). También en la glándula adrenal hay un grupo de proteínas denominadas citocromo P450, las cuales son requeridas para la formación de hormonas esteroideas a partir de colesterol en la corteza adrenal y en los órganos sexuales. El citocromo P450 se necesita en la mitocondria para metabolizar el colesterol a aldosterona, o bien a cortisol en la corteza adrenal, a testosterona en testículo y a estradiol en ovarios, y se ha informado que durante estos pasos se generan radicales de oxígeno (v.gr. anión superóxido), los cuales pueden iniciar la lipoperoxidación (63).

Otro posible mecanismo por el cual encontramos una gran cantidad de α -tocoferol en glándula adrenal es que probablemente exista un mayor aporte de α -tocoferol de las HDL a la glándula adrenal, lo cual resulta de una ingesta alta y eficiente de α -tocoferol, debido a que en las ratas las lipoproteínas que tienen la mayor concentración de α -tocoferol son las HDL (40). En este caso el aumento de α -tocoferol en la glándula adrenal puede ser resultado simplemente del aumento de α -tocoferol circulante.

Por lo que respecta al testículo de ratas, se ha descrito que hay un aumento en su lipoperoxidación a partir del día 10 (21). En este trabajo se encontró un aumento discreto de α -tocoferol con significancia estadística. Posiblemente este aumento se produzca para restablecer el balance entre los productos de lipoperoxidación y los agentes antioxidantes. Estos hallazgos son similares a los descritos en pulmones de ratas sometidos a estrés oxidativo por ozono (46), en donde aumenta el contenido de vitamina E en pulmón. No está clara la razón de la disminución de α -tocoferol en bazo por lo que se necesitarían realizar experimentos adicionales para encontrar la explicación.

Los resultados de este trabajo no comprobaron la hipótesis de una disminución de α -tocoferol en riñón, que es el blanco principal del ANP. Esta hipótesis se planteó por el hecho de que la administración exógena de vitamina E disminuye el daño renal en estos animales (15,22,50). Lo anterior sugiere que el daño renal por radicales libres en riñón de ratas con SN por ANP es causado principalmente por un aumento de radicales libres y no por un deficiente sistema de detoxificación en el cual estaría tomando parte la vitamina E. En otras palabras, lo anterior sugiere que la cantidad de vitamina E en riñón no fue suficiente para contrarrestar la sobreproducción de radicales libres en estas circunstancias. Sin embargo, no sabemos si el contenido renal de vitamina E disminuye en el día 2, que es donde se sabe que se encuentra el pico de máxima lipoperoxidación.

Sería muy interesante explorar el contenido de α -tocoferol en los tejidos de las ratas con nefrosis crónica, por ANP (4- 6 meses) con el propósito de conocer si bajo estas condiciones estos animales desarrollaran deficiencia de α -tocoferol, como se ha descrito en ratas tratadas crónicamente con etanol (44), así como también el contenido de esta vitamina en los picos de lipoperoxidación en el SN (21), con una dieta normal y suplementada con vitamina E y medir uno o varios productos de la lipoperoxidación, en los tejidos examinados.

Este trabajo fue importante ya que no se había evaluado con anterioridad el contenido de α -tocoferol en ratas con síndrome nefrótico agudo.

VII. CONCLUSIONES

Los datos de este trabajo indican que las ratas con SN inducido por ANP no presentan una deficiencia generalizada de α -tocoferol que explique el daño por radicales libres, por el contrario presentan un aumento de α -tocoferol en plasma, testículo y glándula adrenal, lo anteriormente encontrado sugiere que existe una redistribución de α -tocoferol en estas condiciones.

VIII. REFERENCIAS

1. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: Pathophysiology and complications, In: Nephrotic Syndrome. Brenner BM, Stein JH (eds). 1996.
2. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico, In: Tratado de Nefrología. Martínez-Maldonado M, Rodicio JL, Herrera-Acosta J (eds). Ediciones Norma, Madrid, 1993.
3. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:29-38.
4. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. *In vitro* release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev Invest Clin* 1990;42:120-126.
5. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on proteinuria and sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:210-216.
6. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 1990;191:175-184.
7. Marsh JB. Lipoprotein metabolism in experimental nephrosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213:178-186.
8. Frenk S, Antonowicz I, Craig JM, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.
9. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J Lab Clin Med* 1957;50:437-446.
10. Fajardo LF, Eltringham JR, Stewart JR, Klauber MR. Adriamycin nephrotoxicity. *Lab Invest* 1980;43:242-253.
11. Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am J Pathol* 1986;122:481-487.

12. Glasser RJ, Velosa JA, Michael AF. Experimental model of focal sclerosis.I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1977;36:519-526.
13. Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1991;11:215-232.
14. Traber MG, Sies H. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev Nutr* 1996;16:321-347.
15. Pedraza-Chaverri J, Arévalo AE, Hernández-Pando R, Larriva-Sahd J. Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:683-691.
16. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986;29:478-483.
17. Beaman M, Birtwistle R, Howie AJ, Michael J, Adu D. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 1987;73:329-332.
18. Kawaguchi M, Yamada M, Wada H, Okigaki T. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury *in vitro* caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology* 1992;72:329-340.
19. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis: *in vitro* studies. *Kidney Int* 1994;45:1057-1069.
20. Gwinner W, Landmesser U, Brandes RP, Kubat B, Plasger J, Eberhard O, Koch KM, Oibricht CJ. Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1722-1731.
21. Pedraza-Chaverri J, Arévalo AE. Tissue lipoperoxidation and glutathione peroxidase activity in puromycin aminonucleoside injected rats. *Int J Biochem* 1994;26:1139-1145.
22. Trachtman H, Schwob N, Maesaka J, Valderrama E. Dietary vitamin E supplementation ameliorates renal injury in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1811-1819.
23. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-2683.
24. van den Branden C, Verelst R, Vamecq J, Vanden Houte K, Verbeelen D. Effect of vitamin E on antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *Nephron* 1997;76:77-81.
25. McCay PB. Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Annu Rev Nutr* 1985;5:323-340.

26. Meydani M, Macauley JB, Bock GH. Effect of dietary vitamin E and selenium on susceptibility of brain regions to lipid peroxidation. *Lipids* 1988;23:405-409.
27. Rifici VA, Khachadurian AK. Dietary supplementation with vitamins C and E inhibits in vitro oxidation of lipoproteins. *J Am Coll Nutr* 1993;12:631-637.
28. Bjorneboe A, Bjorneboe GEA, Drevon CA. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 1990;120:233-242.
29. Traber MG. Regulation of human plasma vitamin E, In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Academic Press, 1997.
30. Bjorneboe A, Bjorneboe GEA, Bodd E, Hagen BF, Kveseth N, Drevon CA. Transport and distribution of α -tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. *Biochim Biophys Acta* 1986;889:310-315.
31. Dutta-Ror AK, Gordon MJ, Campbell FM, Duthie GG, James WPT. Vitamin E requirements, transport, and metabolism: Role of α -tocopherol-binding proteins. *J Nutr Biochem* 1994;5:562-570.
32. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 1990;10:357-382.
33. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:147-169.
34. Garewal HS. Beta-carotene and vitamin E in oral cancer prevention. *J Cell Biochem* 1993;17F(Suppl):262-269.
35. Stone WL, Stewart ME, Nicholas C, Pavuluri S. Effects of dietary selenium and vitamin E on plasma lipoprotein cholesterol levels in male rats. *Ann Nutr Metab* 1986;30:94-103.
36. Willy C, Thiery J, Menger M, Messmer K, Arfors KE, Lehr HA. Impact of vitamin E supplement in standard laboratory animal diet on microvascular manifestation of ischemia/reperfusion injury. *Free Rad Biol Med* 1995;19:919-926.
37. Knekt P, Aromaa A, Maatela J, Aaran RK, Nikkari T, Hakama M, Hakulinen T, Peto R, Teppo L. Vitamin E and cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 1991;53:283S-286S.
38. Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 1993;34:343-358.
39. McCormick EC, Cornwell DG, Brown JB. Studies on the distribution of tocopherol in human serum lipoproteins. *J Lipid Res* 1960;1:221-228.

40. Liu JF, Huang CJ. Tissue α -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr* 1995;125:3071-3080.
41. Konneh MK, Rutherford C, Anggard E, Ferns GAA. Tissue distribution of α -tocopherol following dietary supplementation in the rat: Effects of concomitant cholesterol feeding. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;210:156-161.
42. Lambert D, Mourot J. Vitamin E and lipoproteins in hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1984;53:327-330.
43. Gotoh N, Noguchi N, Tsuchiya J, Morita K, Sakai H, Shimazaki H, Niki E. Inhibition of oxidation of low density lipoprotein by vitamin E and related compounds. *Free Rad Res* 1996;24:123-134.
44. Meydani M, Seitz HK, Blumberg JB, Russell RM. Effect of chronic ethanol feeding on hepatic and extrahepatic distribution of vitamin E in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:771-774.
45. Warren DL, Reed DJ. Modification of hepatic vitamin E stores *in vivo*. I. Alterations in plasma and liver vitamin E content by methyl ethyl ketone peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;285:45-52.
46. Elsayed NM, Mustafa MG, Mead JF. Increased vitamin E content in the lung after ozone exposure: a possible mobilization in response to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1990;282:263-269.
47. Feingold IB, Colby HD. Sex differences in adrenal and hepatic α -tocopherol concentrations in rats. *Pharmacology* 1992;44:113-116.
48. Huang CJ, Shaw HM. Tissue vitamin E status is compromised by dietary protein insufficiency in young growing rats. *J Nutr* 1994;124:571-579.
49. Drukker A, Eddy AA. Failure of antioxidant therapy to attenuate interstitial disease in rats with reversible nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:243-251.
50. Lee HS, Jeong JY, Kim BC, Kim YS, Zhang YZ, Chung HK. Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1997;51:1151-1159.
51. Rajbala A, Sane AS, Zope J, Mishra VV, Trivedi HL. Oxidative stress status in children with nephrotic syndrome. *Panminerva Med* 1997;39:165-168.
52. Mydlik M, Derzsiova K, Bratova M, Havris S. Serum vitamin A, retinyl esters and vitamin E in nephrotic syndrome. *Int Urol Nephrol* 1991;23:399-405.
53. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

54. Siedel J, Schlumberger H, Klose S, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. *J Clin Chem Clin Biochem* 1981;19:838-839.
55. Dumas B, Watson W, Biggs H. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87-96.
56. Corcoran R, Duran S. Albumin determination by a modified bromocresol green method. *Clin Chem* 1977;23:765-766.
57. Dumas BT, Biggs HG. Determination of serum albumin, In standard methods of clinical chemistry. GR Cooper (Editor). Academic Press, NY 1972;175-188.
58. Bartels H, Böhmer M. Micro-determination of creatinine. *Clin Chim Acta* 1971;32:81-85.
59. Bartels H, Böhmer M, Heierli C. Serum creatinine determination without protein precipitation. *Clin Chim Acta* 1972;37:193-197.
60. Krieg M, Gunsser KJ, Steinhagen Thiessen E, Becher H. Comparative quantitative clinic-chemical analysis of the characteristics of 24-hour urine an morning urine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;11:863-869.
61. Hatam LJ, Kayden HJ. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res* 1979;20:639-645.
62. Buttriss JL, Diplock AT. High performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Meth Enzymol* 1984;105:131-138.
63. Hornsby PJ, Crivello JF. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. *Mol Cell Endocrinol* 1983;30:123-147.