

19



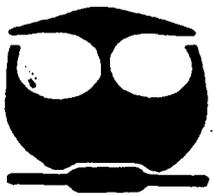
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Evaluación de la P450_{sc} testicular en el síndrome nefrótico experimental.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
NADYA TERESA CASTILLO OCAMPO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002



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:

Prof. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

Prof. MA. DE LOS ANGELES GRANADOS SILVESTRE

Prof. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

Prof. MARIA GUADALUPE ORTIZ LOPEZ

Prof. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

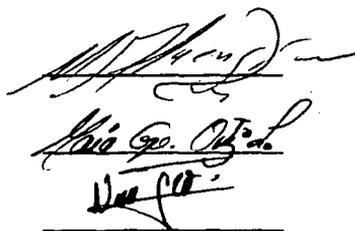
Laboratorio de Química Clínica, Departamento de Biología, Edificio B. Facultad de Química, UNAM, México, D. F.

Laboratorio de Endocrinología Molecular, Hospital Juárez de México, México, D. F.

Asesor: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Supervisor Técnico: Dra. María Guadalupe Ortiz López

Sustentante: Nadya Teresa Castillo Ocampo



ESTA TESIS ESTA DEDICADA A:

A mi abuelita Tere y mi mamá, gracias por todo el amor y dedicación que me brindan.

Desde lo mas profundo de mi corazón a: el regalo que me dio el cielo, mi hija Valeria y el mejor compañero que me dio la vida Alberto mi esposo, mi amigo; porque su amor, apoyo y aliento fueron el motivo de mi esfuerzo.

Los amo.

A mis compañeras y amigas de toda la vida: mis hermanas Abril y Paola, mi tía Roberta, mis primas Vicky y Erica. Gracias por estar siempre conmigo.

Un especial agradecimiento a Sofia. Gracias por apoyarme y cobijarme en tu familia, así como a Alma, Cuba, Marlenin.

A mis grandes amig@s y compañer@s: Dania, Héctor, Indira, Leticia, Mirna, Vicky y Violeta. Así como a mis compañeros que conocí en el transcurso de mi formación en especial a: Martín, Gabi, Lázaro, Cielo, Pati, Flor, Carlos, Alan, Tonatiu, Alejandro, Isela y Miguel.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los integrantes del laboratorio de Química Clínica del departamento de Biología de la facultad de química, UNAM, así como al laboratorio de Endocrinología Molecular, del Hospital Juárez de México, por las facilidades para la realización del presente trabajo de tesis. Así mismo agradezco a los integrantes del jurado: Dr. José Pedraza Chaverrí, Dra. Ma. De los Angeles Granados Silvestre, M en C. Perla Deyanira Maldonado Jiménez y muy especialmente a la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta, la Dra. Guadalupe Ortiz López y M en C Mario Cárdenas, por las sugerencias para el mejoramiento del presente trabajo.

INDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Riñón.....	3
2. Síndrome nefrótico.....	6
2.1. Características del síndrome nefrótico.....	6
2.2. Causas del síndrome nefrótico.....	9
3. Síndrome nefrótico experimental.....	10
4. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo.....	12
5. Biosíntesis de hormonas esteroides en el testículo.....	15
5.1. P450 _{scc}	16
6. Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal.....	19
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS	
1. Objetivo general	21
2. Objetivo específico.....	21
MATERIAL Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	36
RESUMEN DE RESULTADOS.....	48
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54
APÉNDICE I.....	60
APÉNDICE II.....	62

RESUMEN

El síndrome nefrótico inducido en ratas con la administración subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP), es un modelo experimental de la enfermedad denominada de cambios mínimos en el humano; y que se caracteriza por la presencia de proteinuria, hipoproteinemia, hiperlipidemia y edema. Asociado a estos cambios metabólicos, también se han encontrado alteraciones endocrinas, sin embargo, poco se ha estudiado acerca de los cambios endócrino-reproductivos, tanto en modelos experimentales, como en seres humanos con síndrome nefrótico. Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado los cambios hormonales, particularmente la disminución de las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol, asociados a este padecimiento en la nefrosis experimental en ratas macho y hembra, así como en pacientes con síndrome nefrótico idiopático. Asociado a esto la enzima P450scc (*side cleavage chain*) constituye el paso limitante en la síntesis de esteroides sexuales. Teniendo como base dichos antecedentes, en el presente proyecto se estudió la expresión de la enzima P450scc testicular durante la etapa aguda del síndrome nefrótico en la rata adulta. El síndrome nefrótico experimental fue inducido con una sola dosis de ANP de 15 mg/100 g de peso y en cada caso se incluyeron ratas macho control. Mediante determinaciones bioquímicas, principalmente de proteínas en suero y orina, y de colesterol en suero se determinó la instalación del síndrome nefrótico al día 10 después del ANP (fase aguda). Adicionalmente, se incluyeron dos grupos de ratas nefróticas y dos grupos de ratas controles que recibieron uno o cuatro estímulos con gonadotropina coriónica humana (hCG) en dosis de 8 UI, respectivamente. Las concentraciones circulantes de cortisol, progesterona, testosterona y estradiol se midieron por radioinmunoanálisis específicos y los niveles de ARN mensajero se evaluaron por la técnica de Northern Blot. Todas las hormonas determinadas disminuyeron al día 10, indicando la presencia de hipogonadismo-hipogonadotrópico en los machos nefróticos. La inyección de 1 o 4 dosis de hCG, incrementó la concentración de testosterona circulante en ambos grupos de ratas (control y nefróticas). Sin embargo, a diferencia de los valores basales, no hubo diferencia significativa entre los grupos estimulados (control y nefróticos). La inyección de 1 o 4 dosis de hCG fue incapaz de aumentar la concentración de estradiol en las ratas nefróticas así como en los controles. Respecto a la expresión del ARNm de la P450scc en testículo en el día 10 disminuyó significativamente en la rata nefrótica y no aumentó después de la administración de 1 o 4 dosis de hCG. En conclusión los resultados del presente estudio muestran que el ARNm de la P450scc testicular se encuentra significativamente disminuida y que la hCG es incapaz de aumentar en el síndrome nefrótico experimental.

ANTECEDENTES

El síndrome nefrótico inducido en ratas con la administración subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP), es un modelo experimental de la enfermedad denominada de cambios mínimos en el humano; y que se caracteriza por la presencia de proteinuria, hipoproteinemia, hiperlipidemia y edema. Asociado a estos cambios metabólicos, se han encontrado alteraciones endocrinas. Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de los cambios endocrinos reproductivos, tanto en modelos experimentales como en seres humanos con síndrome nefrótico. Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado los cambios hormonales, particularmente la disminución de la concentración de progesterona, testosterona y estradiol, asociados a este padecimiento en la nefrosis experimental en ratas, así como en pacientes con síndrome nefrótico idiopático. Teniendo como base dichos antecedentes, que indican un daño en la síntesis de hormonas sexuales en la gónada, en el presente trabajo se estudia la expresión de la enzima P450_{scc} testicular durante la etapa aguda del síndrome nefrótico en la rata adulta, puesto que la enzima P450_{scc} (side cleavage chain) constituye el paso limitante en la síntesis de esteroides sexuales.

INTRODUCCIÓN

1. Riñón

Se encuentra en la parte dorsal del abdomen, a cada lado de la columna vertebral, cada riñón mide aproximadamente 11 cm de largo por 6 cm de ancho 2.5 cm de grosor (1) (Figura 1).

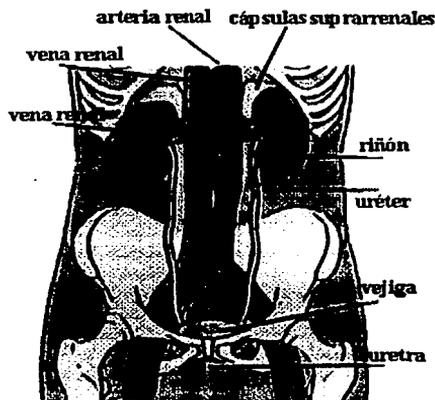


Figura 1. Ubicación del riñón

La unidad morfológica del riñón es la nefrona, está formada por el glomérulo renal constituido por capilares sanguíneos, que está rodeado por la cápsula de Bowman. La presión de la sangre impulsa el agua y las sustancias disueltas, a excepción de las proteínas plasmáticas, a través de las paredes semipermeables del capilar y hacia la cápsula de Bowman, mediante un proceso de ultrafiltración (Figura 2). El túbulo renal consta de: tubo contorneado proximal, asa de Henle, tubo contorneado distal y tubo colector.

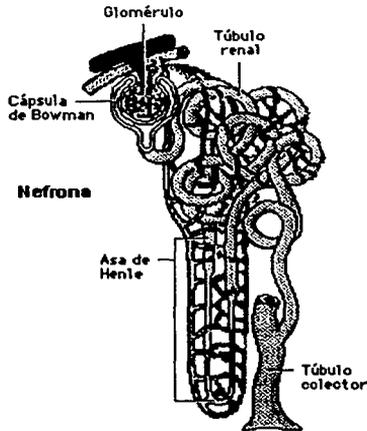


Figura 2. Nefrona. Principales componentes

La pared capilar glomerular (Figura 3), consta de tres componentes:

1) **Las células endoteliales.** Las cuales están dispuestas a lo largo de la parte interna de la membrana basal glomerular, por lo que están en contacto con la sangre. Miden aproximadamente 40 nm de grosor y una de sus características es que presentan agujeros o fenestras que no tienen diafragmas que los cierren (2,3). La superficie celular polianiónica de estas células se debe a la presencia de una sialoproteína llamada podocalixina (4).

2) **La membrana basal glomerular.** Compuesta por tres capas: lámina rara interna, lámina densa y lámina rara externa. En el humano el espesor total de la membrana basal glomerular es de 240-340 nm y cada capa ocupa aproximadamente una tercera parte del total. Los componentes de la membrana basal glomerular han sido difíciles de identificar dado que en los procesos de filtración hay elementos que parecen haber sido atrapados por la matriz de la membrana basal glomerular y por tanto son contaminantes (5). Dentro de los componentes que se reconocen como constituyentes básicos de la membrana

basal glomerular están: colágena tipo IV, proteoglicanos heparán sulfato (6), laminina nidogen (7), fibronectina y entactina (8).

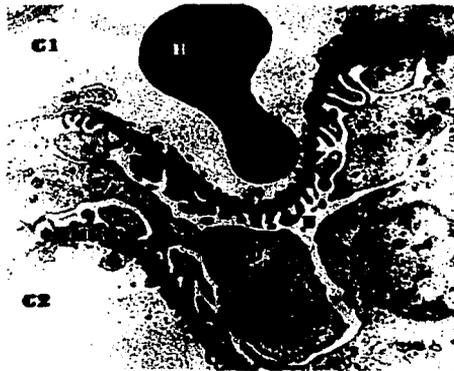


Figura 3. Pared capilar glomerular. (MBG) membrana basal glomerular, (P) podocitos, (C1, C2) Luz del capilar glomerular, (U) Espacio urinario,

3) Células epiteliales o podocitos. Están parcialmente embebidas en la capa externa o lámina rara externa a una profundidad de 40-50 nm. Los podocitos constituyen la parte más externa de la barrera de filtración glomerular y están en contacto directo con el espacio urinario. En los podocitos se realizan procesos de filtración denominados procesos podocíticos, ellos contienen elementos contráctiles como microfilamentos y microtúbulos (9). Otro constituyente importante es la sialoproteína podocalixina que es más abundante en los podocitos que en las células epiteliales, los podocitos tienen un ancho de 20-30 nm en su punto más angosto, en donde presentan un diafragma delgado de 4-6 nm de grosor conocido como diafragma de filtración, cuya composición química es actualmente desconocida (10) (Figura 3).

De acuerdo con la composición de la barrera de filtración, los factores que determinan el paso de las moléculas por la barrera de filtración son: el tamaño,

peso molecular, la carga eléctrica y la configuración tridimensional, así como la hemodinámica glomerular.

2. Síndrome nefrótico

El síndrome nefrótico se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, hiperlipidemia y edema, así como anormalidades en la coagulación y alteraciones en la concentración de casi todas las proteínas plasmáticas (11). Estas alteraciones son las consecuencias directas o indirectas de un aumento en la permeabilidad glomerular de las proteínas del plasma hacia la orina. La alteración de la pared capilar glomerular que sufre una filtración excesiva de las proteínas del plasma puede originarse como consecuencia de una amplia variedad de procesos patológicos, incluyendo trastornos inmunitarios, lesiones tóxicas, alteraciones metabólicas, defectos bioquímicos y trastornos vasculares. Así pues, el síndrome nefrótico deberá ser visto como el punto final común de una variedad de procesos patológicos que dañan las propiedades de permeabilidad de la pared de los capilares glomerulares (11).

2.1 Características del síndrome nefrótico

Proteinuria

La proteinuria abundante es la distinción del estado nefrótico. Arbitrariamente, la excesiva excreción de proteínas de 3.5 g por 1.73 m² /día en el humano, se consideran que están en el límite nefrótico, principalmente debido a que rara vez se observa proteinuria de esta magnitud en las enfermedades túbulo intersticiales y vasculares del riñón (11). A menudo, aunque no invariablemente, la proteinuria abundante sostenida se acompaña de hipoalbuminemia (11).

El mecanismo por el cual se produce la proteinuria en el humano no está completamente dilucidado. Sin embargo, las evidencias indican que existe un daño en la barrera de filtración glomerular.

En la nefrosis inducida por aminonucleósido de puromicina (ANP), la depuración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga se encuentran muy elevada, lo que sugiere que la selectividad, tanto de tamaño como de carga, esta alterada (12,13). La lesión renal característica del síndrome nefrótico es la fusión de los procesos podocíticos, la cual parece deberse a la pérdida de la carga negativa de su superficie (14). Esto se apoya en el hecho de que la administración de policationes al riñón produce proteinuria y fusión de podocitos. No está claro si los proteoglicanos heparán sulfato de la barrera de filtración glomerular disminuyen en la nefrosis por ANP. Sin embargo, en los pacientes con síndrome nefrótico congénito, los sitios aniónicos ricos en heparán sulfato, están prácticamente ausentes (15,16).

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

Hipoproteinemia

En el síndrome nefrótico, sólo una fracción de las proteínas filtradas aparece en orina, el resto se reabsorbe y se metaboliza en el túbulo proximal. Esto produce pérdida de proteína del espacio intravascular mucho mayor que la esperada por la magnitud de la proteinuria. El resultado es un incremento importante en el catabolismo de las proteínas que la síntesis hepática no alcanza a compensar, lo que trae como consecuencia la hipoproteinemia. En ocasiones la hipoalbuminemia abundante puede coincidir con excesiva reducción del volumen plasmático, hipotensión postural, con síncope y choque, y a veces con insuficiencia renal aguda (11).

Hiperlipidemia

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

acompañante frecuente del estado nefrótico. En el síndrome nefrótico están elevadas prácticamente todas las fracciones de lípidos y lipoproteínas séricas, incluyendo el colesterol y todas sus fracciones (total, libre, esterificado), así como los fosfolípidos, en tanto que los triglicéridos no siempre se elevan (17). Estos trastornos se normalizan con rapidez al remitir el síndrome nefrótico (11). Otro factor que contribuye a la hipercolesterolemia del síndrome nefrótico es el aumento en la síntesis de colesterol inducido por la elevación del ácido mevalónico, que a su vez se debe a disminución de su catabolismo renal (18).

Edema

De acuerdo con la hipótesis clásica, la hipoalbuminemia es el paso inicial en la formación del edema y en la retención de sodio (15). La hipoalbuminemia produce disminución de la presión coloidosmótica de la sangre, lo que favorece el movimiento de agua y solutos al espacio intersticial causando hipovolemia. Esto activa a los sensores de volumen y a los barorreceptores, los cuales por medio de una variedad de mecanismos neurohormonales y hemodinámicos, envían señales al riñón que se traduce en retención de sodio y agua. De acuerdo con esta hipótesis los pacientes con síndrome nefrótico deberían tener las siguientes características: 1) volumen sanguíneo bajo durante la formación del edema, 2) diuresis y natriuresis en respuesta a maniobras que aumentan el volumen sanguíneo, y 3) evidencia funcional de hipovolemia. Sin embargo, esto no se ha demostrado en la mayor parte de los casos (15).

Otras alteraciones

El aumento en la excreción urinaria de la transferrina puede causar anemia microcítica hipocrómica resistente al hierro (19). Las pérdidas por la orina de antitrombina III pueden coincidir con un aumento de la coagulación que puede equilibrarse o no por las pérdidas por la orina de factores procoagulantes (20). Si esto no sucede se puede producir un estado hipercoagulante y el aumento en la tendencia a la trombosis puede conducir a la trombosis de la vena renal.

2.2 Causas del síndrome nefrótico

El síndrome nefrótico puede desarrollarse por diversas causas, sobre la base de lo cual se clasifican de la siguiente manera:

- A. Síndrome nefrótico primario. Que también se le conoce como idiopático. Este se puede clasificar de acuerdo a las lesiones histológicas en: enfermedad de cambios mínimos, glomerulonefritis proliferativa del mesangio, glomérulo-esclerosis focal y segmentaria, glomerulopatía membranosa y glomerulonefritis membranoproliferativa.
- B. Síndrome nefrótico secundario que es consecuencia de otras enfermedades o alteraciones sistémicas como: infecciones virales y bacterianas, medicamentos, neoplasia, multisistémicas (diabetes mellitus, lupus eritematoso) y heredofamiliares.

Las enfermedades glomerulares primarias son conocidas como síndrome nefrótico idiopático, cuyo diagnóstico se hace por exclusión entre las causas conocidas del síndrome nefrótico. Además, las formas idiopáticas del síndrome nefrótico se clasifican de acuerdo con las características morfológicas que se encuentran en la biopsia renal. Se requiere hacer una biopsia renal al menos en los adultos para asegurar el diagnóstico de síndrome nefrótico idiopático y para la formulación de un plan racional de tratamiento. Los niños no siempre necesitan someterse a biopsia renal, puesto que a menudo un estudio clínico cuidadoso puede llevar al diagnóstico seguro (11).

Enfermedad de cambios mínimos.

La enfermedad de los cambios mínimos es la forma más frecuente de síndrome nefrótico idiopático este padecimiento en los niños tiene una frecuencia del 70-80%, en el adulto representa el 15-20% de casos en pacientes mayores de 16 años, presentándose con mayor porcentaje en los hombres que en las mujeres. En esta forma el síndrome nefrótico idiopático en el microscopio de luz no muestra

alteraciones de los capilares glomerulares (de aquí la designación de "cambios mínimos").

Típicamente, los pacientes se presentan con síndrome nefrótico declarado, presión arterial normal, velocidad de filtración glomerular normal o reducida ligeramente y un sedimento urinario benigno. Inexplicablemente casi siempre se presentan remisiones y recaídas espontáneas con abundante proteinuria.

3. Síndrome nefrótico experimental.

El síndrome nefrótico puede ser inducido experimentalmente inyectando suero antirriñón, daunomicina, adriamicina ó aminonucleósido de puomicina (ANP).

Aminonucleósido de puomicina.

El aminonucleósido de puomicina [6-dimetilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi- β -D-ribofurasonil)purina] (21) es un derivado de la puomicina (figura 4). Este último se obtiene del hongo actinomiceto *Streptomyces alboniger*, se presenta de forma cristalina y transparente en el suelo donde vive el hongo(22). La puomicina también conocida como acromicina, fué utilizada como antibiótico en el tratamiento de la tripanosomiasis (22). La puomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas debido a que su estructura es muy semejante al aminoacil ARN de transferencia (ARNt), lo que impide la unión del fragmento aminoacil ARNt al sitio A del ribosoma (23) y evita la transferencia de aminoácidos del ARNt a la proteína, es decir que el crecimiento de la cadena peptídica se interrumpe en el ribosoma (24) o que permite la formación de pequeños péptidos a partir de los aminoácidos unidos originalmente al ARNt (25).

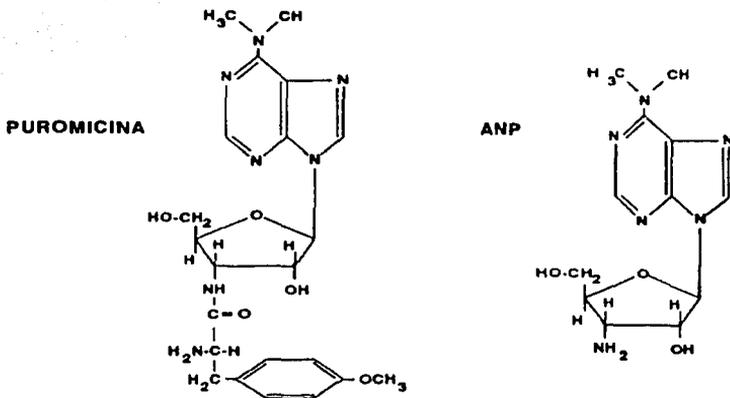


Figura 4. Aminonucleósido de puromicina.

Muchos autores se refieren indistintamente a la puromicina y al ANP, esto ha creado cierta confusión, ya que, el mecanismo de acción aún no está definido para el ANP, se sabe que inhibe la síntesis de ARN pero no la síntesis de proteínas (24) como se ha descrito para la puromicina. El mecanismo que se ha sugerido por el cual el ANP interfiere con la síntesis de ARN, es que interviene en la ruta del metabolismo de las purinas, bloqueando las vías enzimáticas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y nucleoproteínas (26). También se desconoce el mecanismo por el cual el ANP causa daño renal, pero existen estudios que indican que el daño celular es mediado por la presencia de radicales libres de oxígeno y sus especies reactivas tales como peróxidos de hidrógeno (H₂O₂), iones superóxido (O₂⁻) e hidroxilo (OH), que son productos del metabolismo del ANP (27).

El ANP es un compuesto muy utilizado para el estudio del síndrome nefrótico dado que en especies animales como la rata, su administración en dosis que varían alrededor de 15 mg/100g de peso, induce el padecimiento con las

características del síndrome nefrótico denominado de cambios mínimos del humano, principalmente entre los días 7-10 (28). De la dosis administrada de ANP, en la rata el 80% se excreta en menos de 24 horas, la mayoría dentro de las primeras 8 hrs (29), otros autores indican que casi el 90% se excreta en orina en 8 horas y de este entre el 90-60% se elimina en la primera hora (30).

4. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

El hipotálamo constituye el punto de unión entre el cerebro y la glándula hipofisiaria. La secreción de hormonas adenohipofisarias es controlada positiva y negativamente por factores hipotalámicos. Las hormonas hipofisarias, liberadas a la circulación periférica, regulan el crecimiento celular, la diferenciación, así como actividades funcionales en los órganos blanco (figura 5). El mantenimiento del medio ambiente interno requiere múltiples señales que convergen sobre el sistema neuronal del hipotálamo, el cual según el caso provee a través de las hormonas hipofisarias una respuesta endocrina-metabólica específica (31).

La íntima asociación anatómica y funcional de la glándula hipofisiaria con el hipotálamo se lleva a cabo entre la eminencia media hipotalámica y la adenohipofisis, por medio de un sistema microvascular portal, el cual provee un delimitado paso de sustancias provenientes del cerebro, tales como el factor liberador de gonadotropinas (GnRH), que es el responsable del control de la glándula hipofisiaria anterior. Estudios recientes demuestran que la arquitectura de la unidad hipotalámica hipofisiaria es mucho más compleja de lo que se pensaba y que la red vascular existente entre el cerebro y la hipófisis está dispuesta de tal manera que la glándula hipofisiaria puede también controlar la secreción hipotalámica (31).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

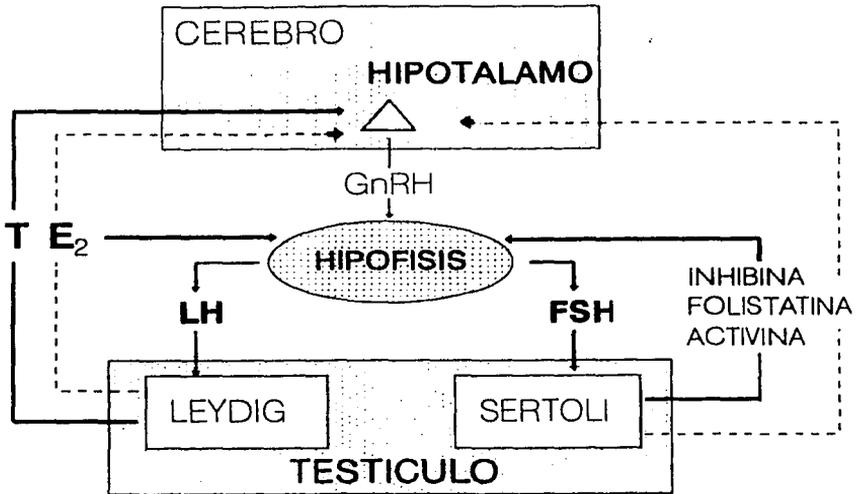


Figura 5. Eje hipotálamo- hipófisis-testículo.

Hormonas hipofisarias

Las hormonas hipofisarias que controlan las gónadas son la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Ambas hormonas son excretadas por células basófilas en la hipófisis por estímulo de GnRH. El peso molecular de LH es aproximadamente de 28,000 y FSH de 33,000 aunque este peso no es exacto por la gran cantidad y variabilidad de los carbohidratos que constituyen estas moléculas (31).

Las funciones biológicas de LH y FSH son estimular la maduración y función del testículo y ovario, así como regular la gametogénesis y la esteroidogénesis en las gónadas. La unión hormona-receptor estimula la adenilato ciclasa unida a la membrana, que cataliza la formación de AMPc. La liberación de AMPc al interior citoplasmático es seguida de la unión de éste a la proteína cinasa, la cual se disocia de su subunidad reguladora y en consecuencia

activa la subunidad catalítica. La activación de la proteína cinasa actúa mediante pasos intermedios que resultan finalmente en la estimulación de las enzimas responsables de la ruptura de la cadena lateral del colesterol que da lugar a la formación de pregnenolona. La ruptura del colesterol que constituye el paso limitante en la esteroidogénesis, conduce de esta manera a un aumento en la síntesis de esteroides sexuales (31).

Función testicular de las gonadotropinas

El testículo contiene dos unidades funcionales: una red tubular que consta de células germinales y células de Sertoli, para la producción y transporte de espermatozoides al conducto excretor, y un sistema intersticial constituido por las células de Leydig, las cuales contienen toda la maquinaria enzimática para la producción de andrógenos (32).

En las células de Leydig, la función de la LH es la activación de la esteroidogénesis. En general es aceptado que la LH promueve la síntesis de esteroides en las células de Leydig, basándose en cambio mínimo en la producción de AMPc, el cual incrementa la actividad de la proteína cinasa, fosforilación de componentes regulatorios celulares y síntesis de proteínas que modulan la ruta esteroidogénica (31). Al parecer existen receptores en exceso para LH en las células de Leydig, dado que la mayor respuesta fisiológica se produce cuando solo una fracción de estos sitios han sido ocupados. La regulación de la biosíntesis de testosterona por LH ocurre en los estadios iniciales de su biosíntesis, principalmente en la conversión de colesterol a pregnenolona en la mitocondria. Así mismo se sabe que las hormonas LH y hCG se unen al mismo receptor y estimulan la producción de andrógenos en el testículo, ya que comparativamente muestran una similitud en sus secuencias de aminoácidos y presenta propiedades biológicas casi idénticas asociadas con la subunidad α (31).

La FSH en el testículo actúa principalmente en la maduración de los tubos seminíferos y la espermatogénesis (31). En las células de Sertoli, la FSH se une a

su receptor específico y da a una serie de eventos bioquímicos similares a los producidos por LH. En las células de Sertoli se activa la proteína cinasa dependiente de AMPc y se estimula la transcripción y la síntesis proteica, la cual incluye la síntesis de proteínas unidoras de andrógenos (33), así como la activación del complejo de aromatasa que convierte testosterona en estradiol. La FSH juega además un papel indirecto en la esteroidogénesis, dado que induce la maduración de las células de Leydig durante el desarrollo e incrementa el número de receptores para LH en estas células (figura 5).

5. Biosíntesis de hormonas esteroides en el testículo.

En los mamíferos existen tres órganos endocrinos especializados en la producción de esteroides: la glándula suprarrenal, el ovario y el testículo. Las rutas bioquímicas y sus complejos enzimáticos son muy similares en todos los tejidos esteroidogénicos. Los esteroides son derivados del colesterol, el cual es producto de la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en forma de lípidos en el organismo; estas reservas se forman por síntesis de novo del colesterol o por transferencia de éste a las células a partir del torrente sanguíneo (34).

En las células de Leydig del testículo, el primer paso en la biosíntesis de andrógenos es la ruptura de la cadena lateral del colesterol, este paso lo realiza la enzima conocida como P450_{scc}, la cual es en realidad un complejo enzimático asociado a la membrana mitocondrial y que cataliza tres reacciones separadas: 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y la escisión en C20 y C22 del colesterol, estas reacciones son consideradas el paso limitante en la esteroidogénesis (35). La pregnenolona resultante de la reacción anterior es convertida a progesterona por la reacción catalizada por un complejo enzimático microsomal designado como 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^4 - Δ^5 -isomerasa (3 β -HSD), este complejo produce la deshidrogenación e isomerización de esteroides C21 y C19, conectando así las vías denominadas como ruta Δ^4 y ruta Δ^5 (36). Los substratos

para esta enzima son además de la pregnenolona, la 17 α -hidroxilación de la pregnenolona a la progesterona que da por resultado la ruptura de las uniones en C17-C20, es catalizada por un complejo enzimático constituido por la 17 α -hidroxilasa citocromo P450 y la 17-20 esteroide desmolasa (P450c17) (27), esta constituye la reacción clave en la biosíntesis de andrógenos. El paso final en la biosíntesis de andrógenos en el testículo, es la reacción reversible entre la androstendiona y la testosterona por medio de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa testicular tipo 3 (17 β -HSD) (Figura 6).

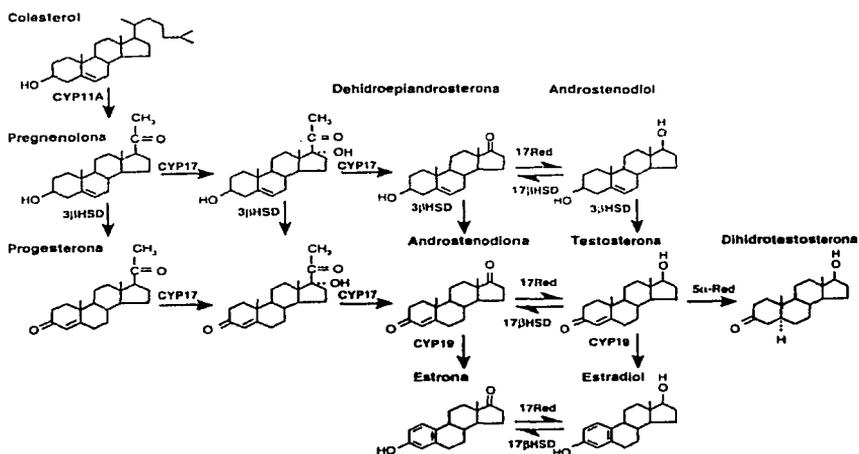


Figura 6. Síntesis de hormonas esteroideas

5.1 P450sc

Para la síntesis de varias hormonas esteroideas en tejidos endocrinos intervienen distintas formas de citocromos P450. La expresión específica de estas proteínas, la cual está bajo el control de la hipófisis y regulada principalmente a nivel transcripcional, determina la formación de los productos finales de la vía biosintética en cada tejido. La regulación aguda de la producción de esteroideos por hormonas hipofisiarias, depende exclusivamente de la disponibilidad de

colesterol para la reacción de rompimiento de la cadena lateral. La regulación lenta o crónica por el contrario, involucra un incremento en la transcripción génica incluyendo la P450scc. La evidencia disponible indica que el AMPc es el principal mediador en la inducción hormonal de las enzimas esteroideas (37).

Conversión de colesterol a pregnenolona (P450scc). La conversión de colesterol a pregnenolona representa el paso inicial y limitante en la biosíntesis de todas las hormonas esteroideas. Esta reacción involucra tres pasos secuenciales distintos; 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y el rompimiento de la cadena lateral del colesterol entre los átomos de carbono 20 y 22 para producir pregnenolona y ácido isocaproico (35). La conversión de colesterol a pregnenolona es catalizada por el sitio activo único del citocromo P450scc (el producto del gen CYP11A1), el cual se encuentra unido a la membrana interna de la mitocondria como un multímero de 16 subunidades, llegando a totalizar cerca de los 850,000 daltones.

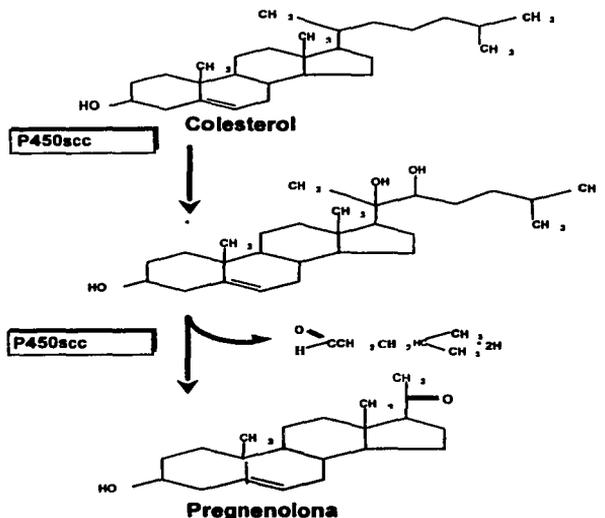


Figura 7. Corte de la cadena lateral del colesterol, paso limitante en la síntesis de hormonas esteroideas.

El gen de esta enzima, conocida anteriormente como 20, 22 desmolasa, se encuentra en la región q23-q24 del cromosoma 15 y está constituido de 9 exones y 8 intrones que abarcan cerca de 20 kb del ADN genómico. El ADNc de la P450scc codifica para un precursor de 521 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 60,200 d (38).

La P450scc se expresa predominantemente en la corteza adrenal, en testículo éste se encuentra en las células de Leydig, en el ovario se expresa tanto en las células de la teca como de la granulosa y en el cuerpo lúteo. Además de los tejidos esteroideogénicos clásicos, la P450scc está presente en la placenta para proveer los esteroides necesarios para mantener el embarazo y el desarrollo fetal. A la fecha no se conoce la deficiencia genética de la P450scc en el humano (39, 40).

Mecanismos regulatorios de la síntesis de hormonas.

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

En los mamíferos macho el eje hipotálamo-hipófisis-testículo opera de manera negativa, dado que los niveles normales de esteroides gonadales inhiben la secreción de LH y FSH. Tanto testosterona como el estradiol inhiben la secreción de LH. La testosterona puede ser metabolizada a estradiol en el cerebro y la hipófisis, pero las dos hormonas actúan independiente (32). La testosterona parece tener acción negativa sobre la secreción de LH no sólo a nivel hipotalámico, sino que también a nivel de la glándula hipofisaria, dado que en pacientes deficientes de GnRH, la administración exógena de testosterona resulta en una disminución de la concentración de LH. El control regulatorio de FSH es mediado principalmente por esteroides gonadales a nivel hipotalámico e

hipofisiario, sin embargo, existen factores de estructura no esteroidal como inhibina, folistatina y activina, que son péptidos de origen gonadal que participan en el control de la secreción de FSH. En modelos animales ha sido demostrada la importante participación de inhibina, ya que ni testosterona, ni el estradiol son capaces de inhibir completamente la liberación de FSH.

6. Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal.

La secreción de glucocorticoides es regulada por la interacción hormonal entre el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales (glándula adrenal en rata), así como por estímulos nerviosos y de otra índole. Los estímulos nerviosos provenientes del cerebro, como por ejemplo, durante la respuesta al estrés, inducen la liberación en la sangre portal hipotalámica-hipofisiaria de factor liberador de corticotrofina, arginina vasopresina y otras sustancias derivadas de las neuronas hipotalámicas. Estos compuestos son transportados hasta la hipófisis, donde estimulan la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la circulación sistémica. Esta actúa sobre la corteza suprarrenal para inducir la secreción de cortisol y otros esteroides (31).

Esteroidogénesis en la corteza suprarrenal.

La acción principal de la ACTH sobre la corteza suprarrenal es aumentar la secreción de cortisol mediante un incremento de la síntesis de esta hormona; el almacenamiento de cortisol intrasuprarrenal es de mínima magnitud. La ACTH induce una depleción del colesterol suprarrenal, hallazgo que se correlaciona con un aumento en la síntesis de esteroides (31).

La ACTH actúa mediante la fijación a receptores de superficie celular. La gran mayoría de las acciones de la ACTH estarían mediadas por AMPc. Los efectos de la ACTH sobre la esteroidogénesis pueden dividirse en efectos agudos, que se producen en el curso de minutos, y efectos crónicos que se desarrollan en el curso de horas o días. El efecto agudo de ACTH es aumentar la conversión de

colesterol en Δ^5 -pregnenolona, el paso inicial y limitante de la velocidad de biosíntesis de cortisol. Este efecto es mediado por la activación de la enzima de corte de cadenas laterales del colesterol P450_{scc} preexistente. Por el contrario, los efectos crónicos de la ACTH son un incremento de la síntesis de ARN y ADN de proteínas celulares de la corteza suprarrenal y el crecimiento celular (31).

La ACTH se secreta en pulsos episódicos breves que determinan un aumento del nivel plasmático de cortisol seguido por una declinación más lenta debido al tiempo prolongado de depuración plasmática del cortisol. Los niveles plasmáticos de cortisol y ACTH son máximos en las primeras horas de la mañana, (31).

HIPÓTESIS

Las alteraciones endocrino-reproductivas, asociadas al síndrome nefrótico nos permite plantear la posibilidad de la existencia de un daño en la enzima P450scc testicular, que da por resultado alteraciones en la síntesis de esteroides sexuales en la rata nefrótica.

OBJETIVO

Evaluar la expresión génica de la P450scc testicular en la rata macho nefrótica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer el perfil hormonal reproductivo en la rata con síndrome nefrótico experimental con o sin estímulo de hCG.
2. Evaluar la expresión del ARNm de la enzima P450scc testicular en la rata con síndrome nefrótico experimental.
3. Evaluar el perfil hormonal reproductivo y la expresión del ARNm de la enzima P450scc testicular después de la estimulación con hCG en la rata con síndrome nefrótico experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental:

Animales:

Se emplearon ratas macho Wistar, adultas de 225-250g de peso, mantenidas en ciclos de 14 h luz y 10 h oscuridad, con agua y comida *ad libitum*.

Reactivos:

-Aminonucleósido de puromicina (ANP) Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Para inducir el síndrome nefrótico en los animales.

-Gonadotropina coriónica humana (hCG) 5000 U/mL (gonadotropy-c, Hoechst Marion Roussel, México) para estimular con 1 o 4 dosis.

El estudio se diseñó para explorar las alteraciones endocrinas reproductivas en fase aguda, para ello se tomo como base los reportes de la literatura que indican que el síndrome inducido por ANP en la rata se establece entre los 7-10 días, por lo que consideramos al día 10 como fase aguda del padecimiento. Cada experimento se realizó por duplicado.

Se emplearon tres grupos control y tres grupos nefróticos de acuerdo a la tabla 1, el síndrome nefrótico se les indujo inyectando dosis única vía subcutánea, de ANP 15 mg/100 g de peso (día 0). A los grupos control se inyectaron con solución salina isotónica (s.s.i.). Así mismo se sabe que las hormonas LH y hCG se unen al mismo receptor y estimulan la esteroidogénesis en el testículo (31), por lo que se incluyeron grupos controles y nefróticos, los cuales fueron estimulados con hCG (8 UI/dosis); un grupo recibió cuatro dosis, una dosis diaria a partir del día 7 al 10 de la administración de ANP y otro grupo recibió dosis única al día 10.

Tabla 1. Grupos experimentales de animales control y nefróticos.

	Día 10	+ 1 hCG	+ 4 hCG
Control	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Nefrótico	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI

Toma de muestra

El día 9 se colocan las ratas en jaulas metabólicas, para recolectar la orina de 24 hrs. Día 10 se recolecta la orina y se midió el volumen, el cual se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.; así mismo se observó el volumen corporal (ascitis). Se sacrificaron las ratas por decapitación y se recolectó la sangre total, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener muestras de suero, las cuales se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Se procedió a tomar muestras de tejidos, en la rata macho: testículo, hígado, y glándula adrenal, congelándose inmediatamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuantificaciones

1. Determinaciones bioquímicas.

1.1 Colesterol, (Método enzimático CHOD-PAD Spinreact)

Esta técnica enzimática para la determinación de colesterol, resulta adecuada debido a su especificidad, exactitud y facilidad de realizarse. Básicamente este tipo de método consta de tres etapas: Hidrólisis de los ésteres de colesterol por método químico o utilizando colesterol esterasa. Oxidación del colesterol catalizada por la colesterol oxidasa, reacción que produce $\Delta 4$ -colestona y peróxido de hidrógeno y finalmente, cuantificación del oxígeno consumido o el peróxido de hidrógeno formado.

Fundamento del método. La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma H_2O_2 y colesterona. El H_2O_2 se valora por la reacción de Trinder, mediante un

cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina, en presencia de peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, encarnada es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

- Técnica.

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	-----	10 µL	-----
Muestra	-----	-----	10 µL
Reactivo al uso	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Mezclar e incubar 5 min. a 37°C o 10 min. a temperatura ambiente.
 Ajustar el aparato a 0 con el blanco de reactivos.
 Leer a 505 nm (500-550) la D. O. del estándar y de la muestra.

- Cálculos.

D. O muestra X Conc. estándar (200 mg/dL) = Conc. muestra (mg/dL)

D. O. estándar

- Control de calidad. SPINTROL. Normal y Patológico. Sueros control valorados.

1.2 Proteínas totales en suero.

Por el método de Lowry (41).

Para esto se utilizó como patrón albúmina sérica bovina (ASB) 5-50µg / 0.2 mL. La técnica consta de dos fases: en la primera ocurre la formación del complejo de reacción proteína-cobre en solución alcalina y en la segunda fase el complejo se reduce a un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (Reactivo de Folin y Ciocalteu) produciendo un intenso color azul el cual se lee a 660 nm. La lectura obtenida es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra; los resultados se expresan en g/dL (suero).

- Técnica. Curva estándar y muestras:

Concentración ($\mu\text{g}/200\mu\text{L}$)	ASB (μL)	H ₂ O (μL)	Vol. De la muestra diluida(μL)	Solución C (μL)	Agitar y esperar 10 min.	Solución D (μL)	Con agitación simultánea, esperar 30'
Blanco	----	200	----	1			
5	10	190	----	1		100	
10	20	180	----	1		100	
15	30	170	----	1		100	
25	50	150	----	1		100	
35	70	130	----	1		100	
50	100	100	----	1		100	
Muestra *	----	----	200	1		100	

Leer a 660 nm.

*Muestras: Diluir las muestras en agua 1:300 y con esta dilución realizar la técnica.

- Cálculos:

$$\frac{\text{D.O. Muestra} \times 5 \times \text{Dilución de la muestra} \times 0.1}{1000} = \text{Conc. de la muestra (g/dL)}$$

1.3 Proteínas totales en orina (Turbidimetría).

Se utiliza ácido tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas presentes en el fluido biológico. La cantidad de proteínas presentes en la muestra es directamente proporcional a la cantidad de turbidez producida.

- Técnica. Curva estándar y muestra

Concentración (mg/mL)	ASB 0.1% (μ L)	H ₂ O (μ L)	Vol. De la muestra diluida (mL)	TCA 12.5% (μ L)	Agitar en vortex por 1 min.
Blanco	-----	1000	-----	250	
0.04	40	960	-----	250	
0.1	100	900	-----	250	
0.2	200	800	-----	250	
0.4	400	600	-----	250	
0.6	600	400	-----	250	
0.8	800	200	-----	250	
**Muestra	-----	250	1	-----	
**Muestra	-----	-----	1	250	

Leer a 420 nm agitando los tubos justo antes de leer su D. O.

**Diluir la orina en agua: Ratas control 1:3

Ratas nefróticas 1:70

- Cálculos:

Mstra c/TCA - Mstra c/H₂O x Dilución x Vol. Orina en 24 hrs. = Conc. mg/24 Hrs.

2. Actividad de la aconitasa en riñón y testículo.

Se mide la actividad de la aconitasa para el estudio del estrés oxidativo (42) y así evaluar que, el daño producido por el ANP es únicamente en el riñón y no en el testículo. La aconitasa (citrate-isocitrate hydratase) es una enzima del ciclo del ácido cítrico que contiene un centro hierro azufre y que se localiza tanto en la mitocondria como en el citosol (43, 44). Esta enzima cataliza la conversión reversible del citrato a isocitrato vía el intermediario cis-aconitato. La aconitasa es blanco de oxidantes en la célula debido a la pérdida de un átomo de hierro del racimo (4 Fe-4S) inducido por la oxidación (45).

- **Fundamento del método.**

Se mide espectrofotométricamente como la formación de cis-acnitato a partir de isocitrato, siguiendo un incremento en la absorbencia a 240 nm.

- **Preparación del homogenado.**

Se homogenizan 0.1 g del tejido en 0.9 mL de amortiguador de homogenización: Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, citrato de sodio 1 mM y 0.5 mM de $MnCl_2$. Se realiza la homogenización con un politrón, el homogenizado se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga a 2600 rpm por 10 min. A 4 °C. Se separa 600 μ L de este homogenizado y se transfieren a un tubo eppendorf, esta porción del homogenizado se centrifuga a 13000 rpm durante 10 min., se separa el sobrenadante (fracción citosolica) en otro tubo eppendorf y el pellet se resuspende en 200 μ L de amortiguador de resuspensión (fracción mitocondrial).

- **Preparación de las diluciones.**

Para ambas fracciones se realiza una dilución 1:20 con amortiguados de homogenización. Se colocan 15 μ L de la fracción más 285 μ L del amortiguador. Las diluciones se mantienen en hielo hasta el momento de la reacción.

- **Técnica.**

Se utiliza isocitrato como sustrato. Se colocan 50 μ L de homogenado de riñón diluido (1:20) en un tubo y la reacción se inicia por la adición de 500 μ L del sustrato en amortiguador de ensayo, mezclar perfectamente. Se registra la densidad óptica por intervalos de 1 min. 0,1,2 minutos a 240 nm. El amortiguador de ensayo consiste de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 que contiene isocitrato 20 mM y $MnCl_2$ 0.5 mM (Apéndice I).

- Cálculos.

Para hacer los cálculos se utiliza el coeficiente de extinción milimolar del cis aconitato a 240 nm.

$$\text{Promedio } \Delta A \times 0.2778 \mu\text{mol/mL} \times 1000 \text{ (para pasar a mU)} = \text{mU/ mg proteína} \\ \text{mg de proteína agregados al ensayo}$$

Los resultados de la determinación de la actividad de la aconitasa sirven para el cálculo de porcentaje de cambio entre el grupo control (100%) y el tratado con ANP tanto en riñón como en testículo. Adicionalmente, para tener una medida real del efecto del daño oxidativo que sobre la aconitasa ejerce el ANP, se determino la concentración de otra enzima mitocondrial, la fumarasa, la cual no se afecta por el estrés oxidativo como la aconitasa (42, 46). Así, los resultados finales se presentan como porcentaje de la relación aconitasa/fumarasa.

3. Cuantificaciones hormonales.

La técnica de radioinmunoanálisis (RIA) fue desarrollada por Yallo y Benson (47) y se basa en la competencia entre la sustancia a cuantificar (analito) y análogo marcado radiactivamente (marca) por una cantidad limitada de sitios de unión del anticuerpo. La cantidad de marca unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito (48).

En el presente trabajo las hormonas esteroides se midieron en suero por radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida. Para cuantificar cortisol, progesterona, testosterona y estradiol, se emplearon estuches comerciales (Diagnostic Products Co. Los Angeles CA).

3.1 Progesterona (4-pregнено-3,20-diona)

Para cuantificar progesterona se utilizo el estándar DSL 3900, la curva estándar se realizó con seis puntos con las siguientes concentraciones: 0, 0.3, 1.0, 5.0, 20.0 y 60.0 ng/mL. Se utilizo un antígeno marcado con 125 en una concentración $< 5 \mu\text{Ci}$ por frasco, así como un anticuerpo de conejo inmovilizado

anti-progesterona. Como controles un nivel bajo y nivel alto con las siguientes concentraciones 1.16 y 10.57 ng/mL respectivamente. Límite de detección mínima 0.12 ng/mL. Especificidad 100%.

3.2 Testosterona (17 β -hidroxi-4-androsteno-3-ona)

Se utilizo el estándar DSL-4000, antígeno marcado con I¹²⁵ en una concentración de < 5 μ Ci por frasco, así como anticuerpo de conejo inmovilizado anti-testosterona. Se realizó una curva estándar con las siguientes concentraciones 0, 0.1, 0.5, 2.5, 10.0 y 25.0 ng/mL. Los controles de testosterona: nivel bajo y nivel alto con concentración de 0.3 y 5.4 ng/mL. Límite de detección mínima 0.08 ng/mL. Especificidad 100%.

3.3 Estradiol 1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol)

Se utilizo un suero humano como estándar de estradiol en concentración de 20 a 3600 pg/mL, un antígeno marcado con I¹²⁵ en una concentración de 3.5 μ Ci por frasco, así como anticuerpo de conejo inmovilizado anti-estradiol. Se realizo una curva estándar con las siguientes concentraciones 0, 20, 50, 150, 500,1800 y 3600 pg/mL. Los controles comerciales CON6: nivel bajo, nivel medio y nivel alto con concentración de 113, 245 y 1514 pg/mL respectivamente. Límite de detección mínima 8 pg/mL, Especificidad 100%.

3.4 Cortisol (11 β ,17 α ,21-trihidroxi-4-pregнено-3,20-diona).

Se utilizó un antígeno marcado con I¹²⁵ en una concentración de 5.5 μ Ci por frasco, así como anticuerpo de conejo inmovilizado anti-cortisol. Se realizo una curva estándar con las siguientes concentraciones 0, 1, 5, 10, 20 y 50 μ g/dL. Los controles comerciales de cortisol CON6: nivel bajo, nivel medio y nivel alto con concentración de 4.9, 11 y 20 μ g/dL respectivamente. Límite de detección mínima 0.2 μ g/dL. Especificidad 100%.

4. Evaluación de la expresión del ARNm.

Extracción de ARN total.

Método Chomczynski y Sacchi modificado (49).

Se utiliza una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol Reagent). En el momento de la homogenización o lisis de las muestras, utilizando Trizol Reagent se mantiene intacto el ARN, en el momento de la ruptura de células y disolución de los componentes celulares, adicionando cloroformo seguido de ultracentrifugación, se logra separar en la fase acuosa el ARN, mediante la precipitación con isopropanol.

1. El tejido (20 a 100 mg) se homogenizó con un politrón (Brinkmann Instruments) en 2 ml de TRIZOL^R LS Reagent (GIBCO BRL. Manufactured for: LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, N. Y.)
2. Se incubo el homogenado por 5 min. sobre hielo.
3. Se adiciono a las muestras 0.2 mL de cloroformo (Sigma Chemical Co.) por 1 mL de solución.
4. Las muestras se agitaron vigorosamente.
5. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C en la centrifuga RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, (DuPont Instruments, Sorvall^R SN9001003).
6. Se obtuvo la fase acuosa y se pasó a otro tubo esteril.
7. Se adicionaron 0.5 ml de isopropanol (Sigma Chemical Co.) por cada ml de solución inicial.
8. Las muestras se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente.
9. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. a 4°C.
10. Se decantó el sobrenadante.
11. Se lavo el pellet con etanol al 75% (Sigma Chemical Co.).
12. Se repitieron los pasos 9 y 10.
13. Se disolvió el pellet con agua tratada con DEPC (Apéndice II), aproximadamente 100 µL el volumen varia de acuerdo al tamaño de la pastilla.

14. Se cuantifico el ARN en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible lambda 20, para determinar la densidad óptica D.O. a 260/280 nm y se corrió la electroforesis. La relación 260/280 deberá ser entre 1.7 y 2.0, pues esto indica una preparación libre de contaminantes. Una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a una concentración de 40 µg de ARN por mL.

Técnica de Northern Blot.

Esta técnica puede utilizarse para saber si un gen es transcripcionalmente activo en un tipo celular o en un tejido. Esta técnica detecta el ARN que es complementario al segmento de ADN de interés. La transferencia northern también proporciona otras informaciones de los ARNm transcritos. Si se corre un ARN marcador en un carril adyacente, se puede calcular el tamaño del ARNm de un gen de interés. Además la cantidad de ARN transcrito presente en una célula o en un tejido está relacionado con la densidad de la banda, lo que proporciona la medida relativa de la actividad transcripcional (50).

Electroforesis de ARN en gel de agarosa.

Los ácidos nucleicos están eléctricamente cargados, la electroforesis nos proporciona la información: del tamaño, la conformación, peso molecular y la carga neta de las moléculas (50).

1) Preparación del gel.

- a) Se disolvió la agarosa al 1% (Easy-Bag™ Agarose. Quantum Bioprober) (Apéndice II), en 37.5 mL de agua destilada estéril mediante calentamiento. Se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 50 °C.
- b) Se agregó el MOPS (Sigma Chemical Co.) 4.15 mL.
- c) Se agregó el formaldehído 37% (Sigma Chemical Co.) 8.13 mL.
- d) Se agregó el bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.) 0.5 µL.

2) Preparación de la muestra

- a) Se colocó a baño María a 60°C durante 10 min. una mezcla de ARN equivalente a 10 µg y 23 µL de la solución desnaturalizante (Apéndice II).

- b) Se sacó y colocó en hielo inmediatamente
 - c) Se agregó a cada muestra 3 μ L de la solución buffer de carga (Apéndice II).
 - d) Se montó la cámara de electroforesis y se agregó la mitad del amortiguados de corrida (250 mL con el fin de apenas cubrir la mitad de los pozos con el amortiguador MOPS 1X) (Apéndice II).
- 3) Se colocaron las muestras en los pozos del gel se agregó la otra mitad del amortiguador de corrida. Se corrió la electroforesis durante 4-5 hrs. a 40 volts.
 - 4) Se observó el gel con luz U. V. para confirmar que se tenía el ARN ribosomal 28 y 18 S se utilizó el control de peso molecular 0.24-9.5 Kb ARN ladder (Invitrogen life technologies, Cat No. 15620-016, U.S.A.).
 - 5) se obtuvieron fotografías del mismo.

Transferencia del ARN de agarosa a la membrana de nylon.

- 1. Se removió el exceso de formaldehído enjuagando el gel varias veces en agua destilada.
- 2. Se equilibró el gel incubándolo con amortiguador de fosfatos 0.025 M pH 6.5 durante 20 min. a temperatura ambiente con agitación suave o con SSC 10X (Apéndice II).
- 3. Se cortó la membrana (Z-probe Bio Rad) a la medida exacta del gel (usar guantes).
- 4. Se humedeció la membrana en el SSC 10X (Apéndice II), durante 15 min. antes de colocar el gel.
- 5. Se humedecieron 1-2 piezas de papel filtro No. 2 con SSC 10X y colocarías en el soporte de vidrio elevado de modo que los extremos del papel queden inmersos en el amortiguador.
- 6. Se colocó el gel sobre el papel filtro.
- 7. Se colocó la membrana sobre el gel, la membrana se cortó exactamente a la medida del gel.
- 8. Se colocó 4 piezas de papel filtro (de la misma medida del gel) sobre la membrana.

9. Se colocaron toallas absorbentes (cortadas de la misma medida del gel) sobre el papel filtro.
10. Se dejó que continúe la transferencia por lo menos 12 hrs.
11. Se retiraron las toallas y el papel filtro sin despegar la membrana.
12. Se retiró el gel y la membrana como unidad.
13. Se marcaron las líneas de aplicación de las muestras en la membrana con lápiz del No. 2 y se comprobó mediante U. V. la transferencia de todo el ARN.
14. Se lavó cuidadosamente la membrana con agua estéril desionizada para eliminar el residuo de agarosa.
15. Se secó la membrana con papel filtro a temperatura ambiente.
16. Se colocó la membrana que contiene el ARN envuelta en papel filtro, en un horno "U.V. Crosslinker Hoefer", para fijar el ARN a la membrana.

Preparación de la sonda ADNc.

La sonda se preparo diseñando los oligonucleótidos de los 21 primeras bases del exon 1 (dirección 5'-3', sence) y de las 21 últimas bases, tomando la secuencia de bases complementaria (dirección 3'-5', antisence), el cual consta de aproximadamente 200 pb.

rP450 ₁	5' ATG CTG GCA AAA GGT CTT TGC 3'
rP450 ₂	5' CCT GTA AAT GGG GCC ATA CTT 3'

Los oligos P450₁ y P450₂, se amplificaron por PCR, y se purificaron por columna . Se midió la D.O a 260-280 nm para saber la concentración de la sonda (51).

Prehibridación

1. Se agitó la solución Quikhyb (Stratagene Cat. No. 201220) previamente calentada a 68°C durante 15 minutos.
2. Se colocó la membrana dentro de una bolsa plástica y se agregaron 150µl de la solución Quikhyb por cada cm² de la membrana.

3. Se eliminaron las burbujas y se selló perfectamente la membrana.
4. Se incubó en baño María a 68 °C durante 24 hrs.

Preparación de la P450scc marcada con P³².

El marcaje se efectuó usando el método de haxanucleotidos al azar usando el estuche de Invitrogen life Technologies (RadPrime DNA Labeling System, Cat. No: 18428-011, Invitrogen Co. New Zealand).

1. En un tubo eppendorf se colocaron 5 µL (aproximadamente 200 ng) de la sonda P450scc en el 16 µL de agua destilada estéril.
2. Se desnaturalizó durante 5 minutos en agua hirviendo.
3. Al término se puso en hielo inmediatamente.
4. Se agregó en orden:
1 µL dATP 500 µM
1 µL dGTP 500 µM
1 µL dTTP 500 µM
20 µL Solución Random Primers 2.5 X
5 µL de P³²
5. Se agitó muy bien. Se adicionó 1 µL de Fragment Klenow, se mezcló muy bien y se incubó a 37°C durante 10 minutos.
6. Se adicionaron 5 µL de buffer Stop.
7. Se purificó la sonda pasándola en una columna (en jeringa de insulina) con Sephadex G50 (Sigma Chemical Co.) centrifugando a 200 rpm durante 5 minutos. El eluido se colectó en un tubo.
8. Se desnaturalizó durante 5 minutos en agua hirviendo y se pasó a hielo.

Hibridación del ARN total.

1. Se retiraron 1.5 mL de la solución de prehibridación de la bolsa y se mezcló con la sonda marcada preparada anteriormente.
2. Se agregó la sonda a la bolsa plástica y se selló muy bien teniendo cuidado de no dejar burbujas ni fugas de material radiactivo.

3. Se hibridó a 68°C durante 24 hrs, en agitación.
4. Se abrió la bolsa y se recolectó la solución radiactiva en un tubo para desechar.
5. La membrana se sacó de la bolsa para lavarla 2 veces con buffer SSC 2X (Apéndice II) a temperatura ambiente, en agitación durante 20 minutos cada lavado.
6. Se lavó con buffer SDS 0.1% (Apéndice II) a 59°C durante 45 minutos en agitación.
7. Después del lavado, se dejó secar la membrana con una pieza de papel filtro y se colocó en una bolsa plástica. Se colocó en los intensificadores de cassette Kodak X-Omatt.
8. En el cuarto oscuro se colocó la película sobre la membrana y se cerró el cassette Kodak X-Omatt..
9. Se colocó a -70 °C durante 24 hrs.
10. Terminado el tiempo se relevó la película.

5. Determinación de la intensidad de la banda en el ARNm.

La intensidad y el área de la banda del ARNm se determinó mediante un programa de cómputo llamado Sigma Scan-Pro. Se realizó en la placa autorradiografía del Northern Blot a la banda que correspondía al ARNm de la P450scc.

Análisis estadístico.

Se empleó la prueba de t de Student no pareada para comparar los resultados de cada grupo respecto de los controles respectivos. Cuando se compararon mas de dos grupos se utilizó, análisis de varianza de una vía. Una $p < 0.05$ se consideró significativa. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Graph Pad Prism (versión 3, Graph Pad Software Inc, San Diego, CA).

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del estudio. La tabla 2 muestra los resultados de las determinaciones bioquímicas al día 10 que señalan el establecimiento del síndrome nefrótico. Se observa una disminución significativa en la concentración de proteínas en suero y un aumento en la concentración tanto de proteínas en orina como de colesterol en suero. En los animales nefróticos se observó también retención de líquido intraperitoneal aproximadamente de 30 mL.

Tabla 2. Comparación de las pruebas bioquímicas de la rata macho estimulada con hCG.

Día 10	Proteínas en orina mg / 24 hr.	Proteínas en suero g / dL	Colesterol mg / dL	n
C	31 ± 3	9.7 ± 1.1	55 ± 5	7
N	* 538 ± 72	* 6.2 ± 0.8	* 378 ± 42	7
C + hCG 1d	26 ± 5	8.3 ± 0.2	59 ± 6	5
N + hCG 1d	* 368 ± 90	* 5.9 ± 0.1	* 433 ± 39	5
C + hCG 4d	28 ± 2	7.9 ± 0.2	60 ± 5	6
N + hCG 4d	* 212 ± 65	* 4.9 ± 0.6	* 280 ± 48	6

*Resultados proporcionados media ± EEM. Analizados por t de Student no pareada. * p<0.05 control vs. nefrótica.*

Asimismo la tabla 2 muestra los valores de las ratas con síndrome nefrótico estimuladas con 1 y 4 dosis de hCG de 8 UI/día, donde se observa como disminuyen los valores de proteinuria en ratas nefróticas a la 4ª dosis con hCG, característica principal del síndrome, así como una disminución de los valores de colesterol mayor con respecto a las ratas nefróticas sin estímulo.

Proteinuria

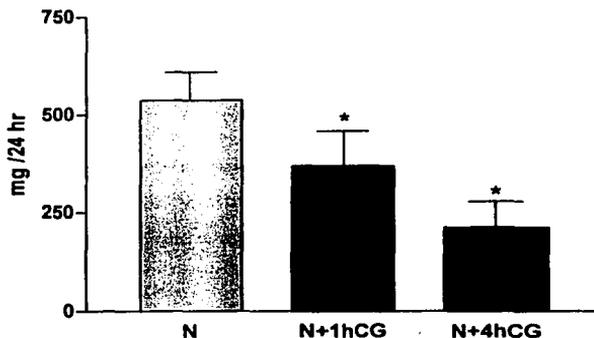


Figura. 8 Proteinuria en animales nefróticos al día 10, los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. N (sin hCG).

La figura 8 muestra como la proteinuria en los animales nefróticos se mejora con la administración de hCG. Los animales nefróticos que recibieron estímulo con 4 dosis de hCG 8 U/día tienen una disminución significativa con respecto al animal nefrótico basal.

Actividad enzimática de la aconitasa.

En la figura 9 los resultados expresados como relación aconitasa/fumarasa muestran un daño oxidativo a nivel de riñón y no en testículo, en animales nefróticos

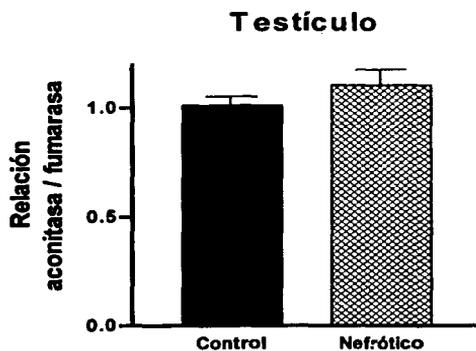
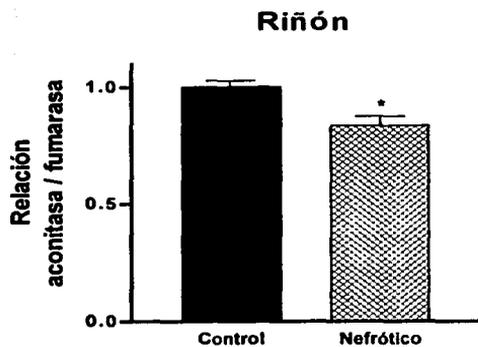


Figura 9. Relación aconitasa/fumarasa en riñón y testículo de ratas nefróticas, tomando como 1 la relación aconitasa/fumarasa de la rata control. Los datos se expresan en promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ control vs. nefrótica,

Perfil endocrino.

La figura 10 muestra una baja significativa en las concentración de progesterona en suero al día 10 en la rata nefrótica. Asimismo, los animales nefróticos responden de manera normal a estímulos con 1 o 4 dosis hCG, incrementando los niveles de progesterona.

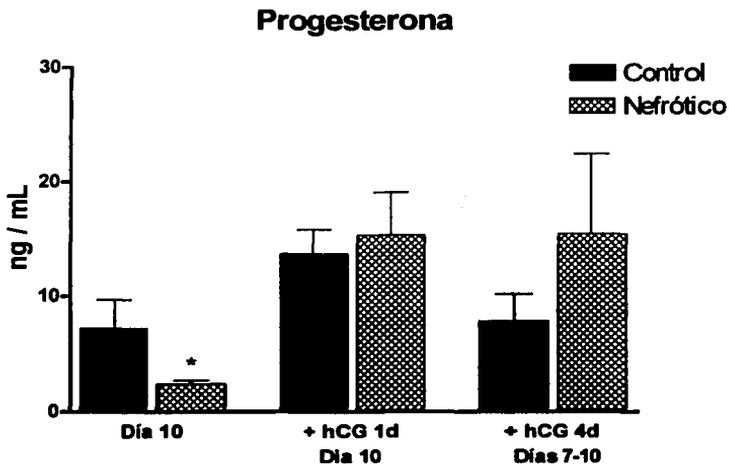


Figura 10. Concentraciones de progesterona en suero de rata macho adulta control y nefrótica al día 10, basal y con estímulo con 1 o 4 dosis hCG. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ control vs. nefrótica.

La figura 11 muestra una disminución significativa de testosterona en las ratas nefróticas al día 10, así como una respuesta normal de los animales nefróticos al estímulo con 1 ó 4 dosis de hCG.

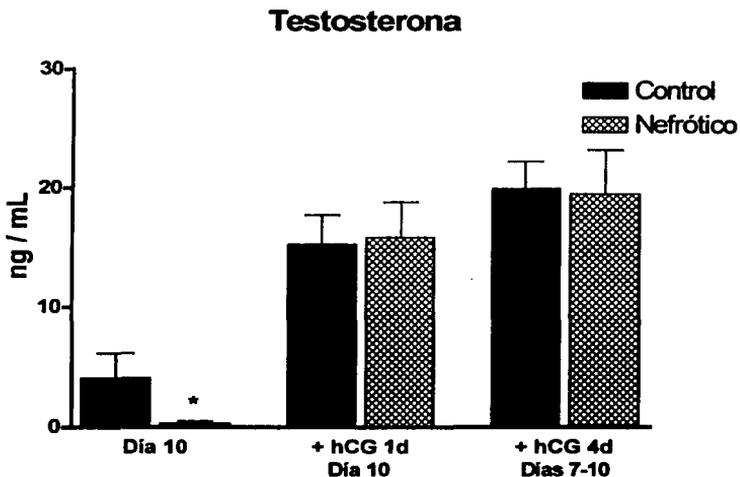


Figura 11. Concentraciones de testosterona en suero de rata macho adulta control y nefrótica al día 10, basal y con estímulo con 1 o 4 dosis de hCG. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ control vs. nefrótica.

La figura 12 muestra los resultados de la concentración de estradiol obtenidos, antes y después de la administración de hCG. Los niveles de estradiol no se modificaron ni en la rata control ni en la rata nefrótica. La concentración de estradiol en la rata nefrótica fue indetectable.

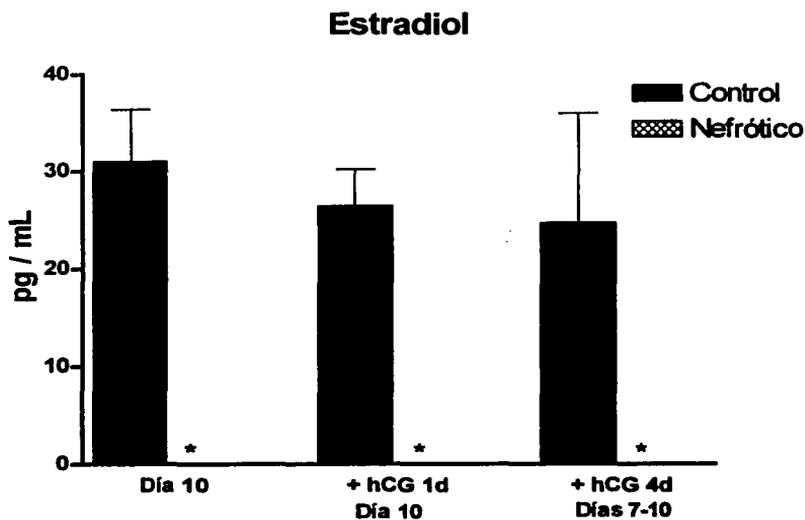


Figura 12. . Concentraciones de estradiol en suero de rata macho adulta control y nefrótica al día 10, basal y con estímulo con 1 o 4 dosis de hCG. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ control vs. nefrótica.

Como hormona control sintetizada por la glándula adrenal se determinó el cortisol. Los resultados de la medición de cortisol se presentan en la tabla 3. Estos resultados muestran que no existen cambios significativos entre ratas controles y nefróticas en condiciones basales o después de 1 o 4 estímulos con hCG.

Tabla 3. Determinación de cortisol en ratas control (C) y nefrótico (N) estimuladas con hCG 1 y 4 dosis.

Cortisol Día 10	Basales µg / dL	+ hCG 1d µg / dL	+ hCG 4d µg / dL	n
C	0.329 ± 0.15	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.08	4
N	0.33 ± 0.04	0.216 ± 0.09	0.562 ± 0.32	4

Resultados proporcionados media ± EEM.

Expresión de la P450scc.

La figura 13 muestra la expresión de la P450scc en hígado (tejido control negativo); la glándula adrenal (tejido control positivo) y los testículos control y nefrótico. Después de la hibridación con la sonda marcada con fósforo radiactivo, la figura 13 señala una mayor expresión del ARN mensajero en la glándula adrenal que en el testículo control, asimismo en el testículo nefrótico y en el hígado la expresión del mensajero es nula. El control de carga fue el ARN ribosomal 18 S, teñido con bromuro de etidio. Este experimento se realizó por duplicado.

La figura 14, muestra el análisis por densitometría de las bandas del ARN mensajero expresado en cada uno de los tejidos, en donde se indica que en el hígado el valor es de cero; contrario a esto, en la glándula adrenal el área y la intensidad de la banda es mayor. En el testículo control y en el nefrótico, existe una marcada diferencia en el área y la intensidad de la banda en la expresión de la enzima, siendo cero en este último.

Expresión de la P450scc en diferentes tejidos

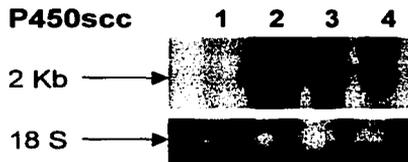


Figura 13. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la enzima P450scc en los siguientes tejidos: Carril (1). Hígado (control negativo), (2). Glándula adrenal (control positivo), (3). Testículo control, (4). Testículo nefrótico. Cantidad de ARN total 10 μ g en cada carril, se utilizó la sonda ADNc de rata marcado con P^{32} .

Expresión de la P450scc en varios tejidos

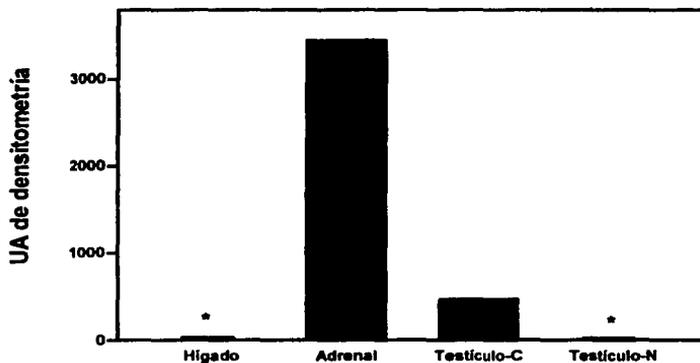


Figura 14. Análisis por densitometría de la intensidad de la banda del ARNm de la enzima P450scc expresado en unidades arbitrarias. *no existe expresión del ARNm.

En la figura 15, se presenta la expresión del ARNm de la P450scc en el testículo, dicho mensajero se ubica en 2 Kb. Solo en el testículo de los grupos control presentan expresión de la P450scc, esta expresión está en relación con 1 o 4 dosis de hCG administradas, es decir el testículo C+4hCG tiene mayor expresión del ARNm. Sin embargo, en los testículos nefróticos la expresión del ARNm esta completamente ausente, aun en aquellos animales que recibieron estímulos de 1 o 4 dosis de hCG. El control de carga fue el ARN ribosomal 18 S, teñido con bromuro de etidio. Este experimento se realizó por duplicado.

El grafico de la figura 16 señala que no hay expresión de la P450scc en el hígado y los testículos nefróticos. La intensidad y el área de la banda en el testículo de los grupos control: basal, C+1hCG y C+4hCG aumenta con el número de estímulos que recibió el tejido.

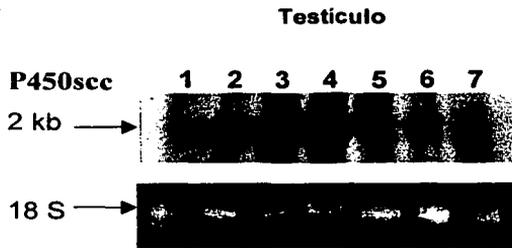


Figura 15. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la enzima P450scc testicular de la rata adulta en el síndrome nefrótico. Carril (1). hígado (control negativo), (2). rata control basal, (3). rata control +1 hCG, (4). rata control +4 hCG, (5). rata nefrótica basal, (6). rata nefrótica +1 hCG, (7). rata nefrótica +4 hCG. Cantidad de ARN total 10 μ g en cada carril, se utilizó la sonda ADNc de rata marcado con P^{32} .

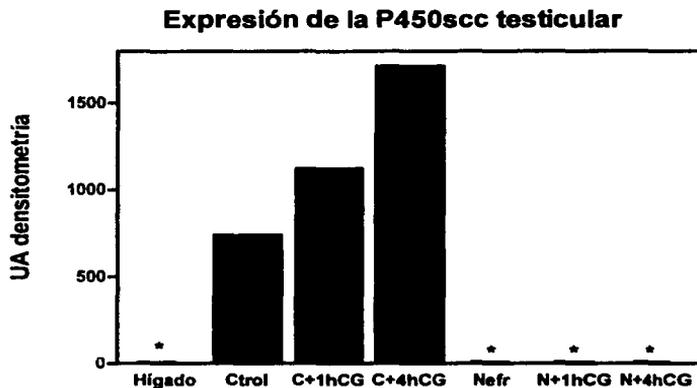


Figura 16. Análisis por densitometría de la cantidad del ARNm de la enzima P450scc la cantidad se expresa en unidades arbitrarias, * no existe expresión del ARNm.

Los resultados de la expresión del ARNm de la P450scc en la glándula adrenal se señalan en la figura 17. En donde se muestra que el ARNm de la P450scc se expresa indistintamente en la glándula adrenal de los grupos control y nefróticos en condiciones basales y con estímulo con hCG. La expresión de esta enzima en el hígado es nula. Sin embargo, se puede distinguir que existe mayor expresión de la glándula adrenal en los animales nefróticos: Día 10 y N+4hCG que en el resto de los animales. La muestra cargada fue controlada por tinción con bromuro de etidio del ARN ribosomal 18 S. Este experimento se realizó por duplicado.

El análisis de las bandas de la P450scc en la glándula adrenal, se presentan en la figura 18, la intensidad en las bandas de la expresión del ARNm de la P450scc no desaparece en la glándula adrenal, de las ratas control y nefróticas tanto en grupos basales como estimulados con 1 o 4 dosis de hCG. De hecho los animales nefróticos tienen mayor expresión de la P450scc que el grupo control.

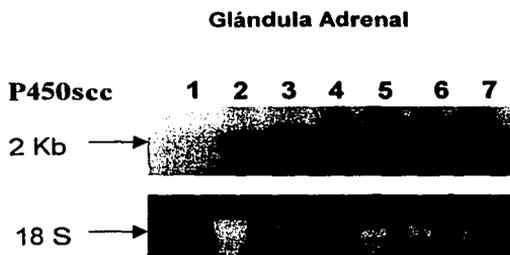


Figura 17. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la enzima P450scc adrenal de la rata adulta en el síndrome nefrótico. Carril (1). hígado (control negativo), (2). rata control basal, (3). rata control +1hCG, (4). rata control +4hCG, (5). rata nefrótica basal, (6). rata nefrótica +1hCG, (7). rata nefrótica +4hCG. Cantidad de ARN total 10 µg en cada carril, se utilizó la sonda ADNc de rata marcado con P³².

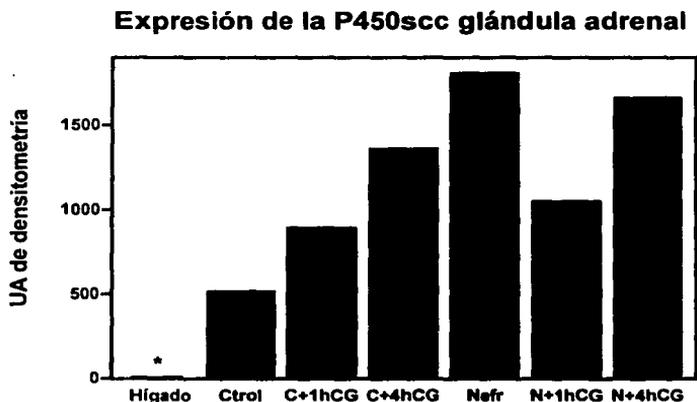


Figura 18. Análisis por densitometría de la cantidad del ARNm de la enzima P450scc expresado en unidades arbitrarias, * no existe expresión del ARNm.

RESUMEN DE RESULTADOS

Los resultados del presente estudio muestran que:

- El ANP tiene un efecto adverso (estrés oxidativo) específicamente sobre el riñón y no sobre el testículo.
- La expresión de la enzima P450scc en el testículo se abate durante el síndrome nefrótico.
- El estímulo gonadal con hCG es capaz de inducir la síntesis de progesterona y testosterona, pero no tiene efecto sobre la expresión de la P450scc.
- La enzima P450scc no se afecta en la glándula adrenal de las ratas con síndrome nefrótico, lo que indica que solo se interrumpe la biosíntesis de hormonas esteroideas en el testículo.
- El hipoestrogenismo es una característica distintiva del síndrome nefrótico, que aun con hCG no es posible revertirlo, por lo que se sugiere una alteración en la actividad y la expresión de la P450 aromatasa.
- La administración de hCG tiene un efecto positivo concerniente a la filtración glomerular, particularmente sobre la pérdida de proteínas. Por lo que pudiéramos estar ante un nuevo tratamiento alternativo para el síndrome nefrótico.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la expresión de la enzima P450_{scc} durante la fase aguda del síndrome nefrótico, enzima que interviene en el paso limitante de la conversión de colesterol a pregnenolona en la biosíntesis de esteroides, tanto en el testículo como en la glándula suprarrenal.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas establecen la presencia del síndrome nefrótico en la rata macho en base a la presencia de hipoproteinemia e hipercolesterolemia como consecuencia directa de la pérdida urinaria de proteínas, características principales que constituyen esta enfermedad glomerular. Asimismo, las determinaciones bioquímicas revelan que en los animales nefróticos que recibieron 1 y 4 dosis de hCG el nivel de proteínas en orina disminuye, indicando que al administrar a los animales nefróticos hCG estos mejoran su capacidad de filtración glomerular. Este inesperado hallazgo es muy importante dado que el tratamiento del síndrome nefrótico es asintomático y basado fundamentalmente en el uso de corticoesteroides, por lo que, de confirmarse el efecto benéfico de la hCG sobre la fisiología renal, pudiéramos estar ante un nuevo tratamiento alternativo para el síndrome nefrótico. Respecto del mecanismo por el cual la hCG ejerce un efecto positivo sobre el riñón, es posible especular que dado que esta hormona aumenta la síntesis de testosterona a nivel testicular, y que la testosterona es un esteroide anabólico, se activa un mecanismo que induce síntesis proteica y diferenciación celular vía sus receptores específicos presentes en riñón (52). Por otro lado, la testosterona pudiera convertirse en estradiol en tejido periférico, y sabiendo que los estrógenos han probado tener un efecto antioxidante (53, 54), el estradiol tendría un efecto protector sobre el daño renal.

Tomando en cuenta los informes que evalúan el estrés oxidativo en base a la determinación de la relación de una enzima sensible a estrés como la aconitasa y otra no sensible como la fumarasa (42, 44), en el presente estudio se midió el

índice de daño oxidativo producido por ANP en base a la relación de las enzimas mitocondriales aconitasa y fumarasa. Los resultados muestran por primera vez la existencia de una disminución significativa en la actividad de la aconitasa con respecto a la fumarasa en riñón y no en testículo (Figura 9), lo cual señala claramente que el efecto del ANP es específico sobre riñón y no afecta al testículo, indicado que las alteraciones endocrinas asociadas al síndrome nefrótico son consecuencia del padecimiento y no del ANP.

Datos reportados por nuestro grupo (55, 56) indican que en la fase aguda del síndrome nefrótico la rata macho desarrolla hipogonadismo-hipogonadotrópico. Tomando como base dichos antecedentes, en el presente estudio se evaluaron las hormonas esteroideas: progesterona, testosterona y estradiol durante la fase aguda del síndrome nefrótico, tanto basal como con estímulo gonadal de la gonadotropina hCG. Como se observa en la figura 11 y 12, las concentraciones circulantes de progesterona, testosterona y estradiol en el día 10 disminuyeron significativamente en ratas nefróticas, sin embargo aquellos grupos de animales nefróticos que recibieron 1 o 4 dosis de hCG incrementaron significativamente las concentraciones de testosterona, aunque no las de estradiol. Estos datos indican que existe una alteración generalizada en la ruta esteroidogénica en la fase aguda del síndrome nefrótico, a la vez que señalan mediante la prueba con hCG, que los receptores para gonadotropinas se encuentran aparentemente en buen estado y que parecen estimular la síntesis de progesterona y testosterona, aunque fallan en el estímulo para la síntesis de estradiol.

En numerosos estudios experimentales se ha demostrado, que las hormonas LH y ACTH al unirse a sus receptores específicos en la gónada o en la adrenal estimulan la esteroidogénesis activando la síntesis de la enzima P450_{scc}, enzima que rompe la cadena lateral del colesterol en ambos tejidos (55). Dicha actividad de LH se realiza por medio de un segundo mensajero específico que es el AMPc, que activa a regiones promotoras del gen de la P450_{scc} en sitios denominados CRE, asimismo se conocen factores de transcripción como SF1, Sp1 y la proteína StAR

que participan en la regulación de la P450scc (57, 58). Así, en el presente estudio los resultados obtenidos por la técnica de Northern Blot, indican que la expresión del ARNm de la enzima P450scc desaparece en el tejido testicular de animales nefróticos al día 10 y es indetectable aún en aquellos grupos de ratas a los cuales se les dio estímulo con 1 o 4 dosis de hCG. Esto refleja un daño a la gónada como consecuencia del síndrome nefrótico que se manifiesta a nivel de la transcripción de la P450scc, que por ser el paso limitante en la biosíntesis de los esteroides sexuales, esperaríamos que estos disminuyeran generalizadamente. Sin embargo, a pesar de que los resultados de las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol durante el día 10 se encuentran disminuidos, el incremento en progesterona y testosterona después de la aplicación de hCG, no concuerda con la ausencia de expresión de la P450scc y lo podemos explicar en base a una posible activación de la P450scc previamente sintetizada, mediada por la gonadotropina (LH ó hCG) vía el mismo segundo mensajero que estimula la expresión de la enzima, el AMPc (59). Por otro lado, dado que no se encontró alteración alguna en las concentraciones circulantes de cortisol y la expresión de la P450scc en glándula adrenal permaneció normal o incrementado al día 10 o posterior al estímulo con hCG, es posible especular que el daño sobre la expresión de la P450scc sea específico de la gónada y apoya fuertemente el concepto vertido en base a la prueba de la medición del efecto del ANP sobre la actividad de la aconitasa, en cuanto a que las alteraciones endocrinas asociadas al síndrome nefrótico son propias de la enfermedad y no de la inducción del modelo experimental.

Respecto de la síntesis del estradiol, el cual estuvo permanentemente disminuido, los resultados de este estudio concuerdan con los datos reportados por nuestro grupo, en los que se revela la existencia de hipoestrogenismo tanto en el modelo experimental en fase aguda ó crónica, como en pacientes nefróticos (52, 55, 56, 60). Asimismo las fallas encontradas en las concentraciones de estradiol en el día 10 y posterior al estímulo con hCG, señalan claramente la existencia de daño a nivel de otra importante enzima esteroidogénica, la P450 aromatasa, la cual se

sabe que es regulada por medio las regiones promotoras del gen de manera tejido específica en Ovario (células de Sertoli), testículo (células de Leydig), cerebro (hipotálamo, amígdala e hipocampo), placenta y tejido adiposo (hombres y mujeres) (61), y dado que el estradiol es indetectable en todas las mediciones realizadas, es posible especular que algún factor común a todas las regiones promotoras se afecta durante el síndrome nefrótico.

CONCLUSIONES

- **La expresión de la P540sc testicular desaparece en el síndrome nefrótico, y este efecto no puede ser revertido con estímulos de 1 o 4 dosis de hCG.**
- **La expresión de la P450sc solo se ve afectada en el testículo y no en la glándula adrenal, repercutiendo así en la síntesis de esteroides sexuales.**

REFERENCIAS

1. **Diccionario** Mosby de medicina, enfermería y ciencias de la salud. Ed. Harcourt, S. A. 2000
2. **Karnovsky MJ.** The ultrastructure of glomerular filtration. *Annu Rev Med:* 213-224, 1979.
3. **Dale AR.** Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membranes. *Am J Physiol* 253:F783-F794, 1987.
4. **Hovart R, Hovorka A, Dekan G, Poczewiski H, Kerjaschki D.** Endothelial cell membranes contain podocalyxin the mayor sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol* 102: 484-491, 1986.
5. **Parthasarathy N, Spiro RG.** Characterization of the glycosaminoglican component of the renal glomerular basement membrane and its relationship to the peptide portion. *J Biol Chem* 256: 507-513, 1981.
6. **Kanwar YS, Farquhar MG.** Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1303-1307, 1979.
7. **Dziadek M, Paulsson M, Timpl R.** Identification and interaction repertoire of large forms of the basement membrane protein nidogen. *EMBO J* 4:2513-2518, 1985.
8. **Sariola H, Kuusela P, Ekblom P.** Cellular origin of fibronectin in interspecies hybrid kidneys. *J Cell Biol* 99:2099-2107, 1984.
9. **Orci L, Singh A, Amherdt M, Brown D, Perrel A.** Microheterogeneity of protein and sterol content in kidney podocyte membrane. *Nature* 293:646-647, 1981.
10. **Rodenwal R, Karnowsky MJ.** Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60:423-433, 1974.
11. **Glasscock RJ, Brenner BM.** Glomerulopatías Importantes. En: *Principios de Medicina Interna.* Harrison T. R. ed. Saunders, Filadelfia. 294:2277-2290, 1986.
12. **Bohrer MP, Baylis V, Humes HD, Glasscock RJ, Robertson CR, Brenner BM.** Permselectivity of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations. *J Clin Invest* 61:72-78, 1978.

13. **Christensen EI, Carone FA, Rennke HG.** Effect of molecular charge on endocytic uptake of ferritin in renal proximal tubule cells. *Lab Invest* 44:351-356, 1981.
14. **Bertolatus JA, Hunsicker LG.** Glomerular sieving of anionic and neutral bovine albumins in proteinuria rats. *Kidney Int* 28:467-476, 1985.
15. **Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J.** Fisiopatología del síndrome nefrótico. En: *Tratado de Nefrología*. Martínez-Maldonado M ed. Ediciones Norma, Madrid. 685-694, 1993.
16. **Brenner B, Coe F, Rector FC.** Structure and function of the renal circulations. En: *Renal Physiology in Health and Disease*. Brenner, B, Coe F, Rector F. eds. WB Saunders Co, Filadelfia, 1987.
17. **Jensen H.** Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 182:465-473, 1967.
18. **Golper TA, Schuwart SH.** Impaired renal mevalonate metabolism in nephrotic syndrome: a stimulus for increased hepatic cholesterogenesis independent of GFR and hypoalbuminemia. *Metabolism* 31:471-475, 1982.
19. **Alfrey AC, Hammond WS.** Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 37:1409-1413. 1990.
20. **Cruz C, Juárez.Nicolás F, Tapia E, Correa-Rotter R, Pedraza-Chaverri J.** Abnormalities of coagulation in experimental nephrotic syndrome. *Nephron* 68:489-496, 1994.
21. **Baker BR, Joseph JP, Williams JH.** Puromycin synthetic studies. VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 76:2838, 1954.
22. **Porter JN, Hewitt RI, Hesseltine CW, Krupka G, Lowery JA, Wallace WS; Bohonos N, Williams JH.** Achromycin: a new antibiotic having trypanocidal properties. *Antibiot and Chemother* 2:409-410, 1952.
23. **Lessard J, Pestka S.** Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. *J Biol Chem* 247:6909-6912, 1972.
24. **Rabinovitz M, Fixher JM.** A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein synthesis by Erlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 23:447-481, 1962.

25. **Nathans D, Von Ehrenstein G, Monro R, Lipmann F.** Protein synthesis from aminoacyl-soluble ribonucleic acid. *Fed Proc* 21:127, 1962
26. **Dickie N, Alexander CS, Nagasawa HT.** Inhibition of nucleic acid synthesis in *Escherichia coli* B by puromycin aminonucleoside. *Biochim Biophys Acta* 95:156-169, 1965.
27. **Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky DA.** A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 29: 478-483, 1986.
28. **Frenk S, Antonowics VM, Craig JM, Metcalf J.** Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolytes composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:424-427, 1955.
29. **Alexander CS, Nagasawa HT, Filbin D.** Distribution and excretion of aminonucleoside-8-¹⁴C in normal and nephrotic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:521-526, 1962.
30. **Derr RF, Alexander CS, Nagasawa HT.** Metabolism of puromycin aminonucleoside in the normal, "pre-nephrotic" and nephrotic rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 248-252, 1967.
31. **Yen Samuel S. C, Jaffe Robert B y Barbieri Robert L.** Endocrinología de la reproducción Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Ed. Medica Panamericana, 523-525. 2001.
32. **Griffin JE, Wilson JD.** Disorders of the testes and the male reproductive tract. En: *Williams Textbook of Endocrinology*. Wilson and Foster eds. Saunders, Filadelfia, 799-838, 1992.
33. **Means AR, Fakunding JL, Huckins C.** Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 32:477-527, 1976.
34. **Gwynne JT, Strauss JL.** The role of lipoproteins in the steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 3:299-329, 1982.
35. **Miller VL.** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9:295-318, 1988.
36. **Labrie F, Simard J, LuuThe V, Bélanger A, Pelletier G.** Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-

- 4ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:805-826, 1992.
37. **Simpson ER**. Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 and the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 13:213-217, 1979.
38. **Chung BC**, Leonard-Picado J, Haniu M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE, Miller WL. Cytochrome P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:407-411, 1987.
39. **Keeney DS**, Ikeda Y, Waterman MR, Parker KLK Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression in the primitive gut of the mouse embryo does not require steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* 9:1091-1098, 1995.
40. **Morales A**, Cuellar A, Ramírez J, Vilchis F, Díaz-Sánchez V. Síntesis of steroids in pancreas: Evidence of cytochrome P-450scc activity. *Pancreas* 19:39-44, 1999.
41. **Lowry OH**, Resebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
42. **Li QY**, Pedersen C, Day BJ, Patel M. Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation. *J Neurochem* 78:746-755, 2001.
43. **Gruer MJ**, Artymiuk PJ, Guest JR. The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem Sci* 22:3-6, 1997.
44. **Belnert H**, Kennedy MC. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J* 7:1442-9, 1993.
45. **Gardner PR**. Superoxide-driven aconitase Fe-S center cycling. *Biosci Rep* 17:33-42, 1997.
46. **Burkhard GM**, Patel M, Sheng H, Calvi CL, Batinic-Haberle I, Day BJ, Liang LP, Fridovich I, Crapo JD, Pearlstein RD. Neuroprotection from delayed postischemic administration of a metalloporphyrin catalytic antioxidant. *J Neurosci* 21:4582-4592, 2001

47. **Yellow RS, Benson SA.** Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39: 1157-1175, 1960.
48. **Zambrano F, Díaz V.** El radioinmunoanálisis y su control de calidad. *Centro nuclear de México* 31-33, 1996.
49. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-Step Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
50. **Klug WS, Cummings, MR.** Conceptos de genética. Prentice Hall Iberia. 5a edición. Madrid 1999.
51. **Oonk R, Parker K, Gibson J, Richards S.** Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P450scc) gene, *J. Biol Chem* 265:22392-22401, 1990.
52. **Menjívar M, Ortiz-López MG, Vilchis F, Díaz Bonilla L, Zambrano E, Zariñán T, Pedraza-Chaverri J.** Evaluation of the pituitary-testicular function during experimental nephrosis. *Life Sci*, 70: 2769-2782, 2002.
53. **Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH.** In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39:405-411, 2002.
54. **Liu Y, Shimizu I, Omoya T, Ito S, Gu XS, Zuo J.** Protective effect of estradiol on hepatocytic oxidative damage. *World J Gastroenterol* 8:363-366, 2002.
55. **Menjívar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pérez G, Pedraza-Chaverri J.** Transient alteration of the reproductive function in nephrotic rats. *Life Sci* 61: 12 1159-1167, 1997.
56. **Ortiz G, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, Menjívar M** Reproductive function in rats with chronic nephrosis. *J Reprod Fertil* 117:223-228, 1999.
57. **Hanukoglu I.** Steroidogenic enzymes: structure function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43, 8:779-804, 1992.
58. **Venepally P, Waterman MR,** Two Sp1-binding sites mediate cAMP-induced transcription of the bovine CYP11A gene through the protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem* 270: 25402-25410. 1995

59. **Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF.** Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: Structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242:1430-1433, 1988.
60. **Menjivar M, Ortiz-López MG, Vilchis F, Pedraza-Chaverri J, Larrea F, Correa R.** Pituitary-testicular axis alterations in men with nephrotic syndrome. En: Program of the 81st annual meeting of the Endocrine Society, 1999; San Diego, CA. Abstract P2-435.
61. **Simpson E, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Corbin Cjo, Mendelson CR,** Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 321-330, 1993.

APÉNDICE I

Reactivos para proteínas en suero

Solución A

Na ₂ CO ₃	2 %
NaOH	0.4 %
Tartrato de sodio	0.02 %
Almacenar a temperatura ambiente	

Solución B

CuSO ₄	0.5 %
Almacenar a temperatura ambiente	

Solución C

Se prepara en el momento del ensayo	Para 50 tubos (1 ml/tubo)
Sol A	50 mL
Sol B	1 mL

Solución D

Se prepara en el momento del ensayo	Para 50 tubos (1 µL/tubo)
Folin 1 N	25 µL
Agua destilada	25 µL

Reactivos para proteínas en orina.

TCA

Ácido tricloroacético (TCA)	12.5 %
En agua destilada	(p/v)
Almacenar a temperatura ambiente	

Reactivos para aconitasa

Amortiguador de ensayo

Tris HCl 50 mM	7.8 g
Agua	cbp 1000 mL
Ajustar a pH 7.4 con NaOH	

Amortiguador de homogenización

Citrato de sodio 1 mM	147 µL
MnCl ₂ 0.5 mM	49 µL
Tris HCl 50 mM pH 7.4	cbp 500 mL

Amortiguador de resuspensión
Tritón X-100 1%
Amortiguador de homogenización

0.5 mL
50 mL

Mezcla de reacción
MnCl₂ 0.05 mM
Isocitrato
Tris HCl 50 mM pH 7.4

1 μL
51 μL
cbp 10 mL (10 muestra)

APÉNDICE II

Reactivos para Northern blot

Agua con DEPC 0.1%

Agua destilada desionizada estéril	100 mL
Dietilpirocarbonato (DEPC)	100 µL
Incubar 24 h a 37°C	
Esterilizar dos veces	

MOPS 12X

Ácido propanesulfónico 3-N-Morfolino (MOPS)	5.65 g
Acetato de sodio 0.06 M	6 mL
Etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) 0.5 M pH 8	2.4 mL
Agua destilada desionizada estéril	100 mL

Gel de agarosa

Agarosa	0.5 g
Agua destilada desionizada estéril	37.5 mL
MOPS 12X	4.15 mL
Formaldehído 37%	8.13 mL
Bromuro de etidio	0.5 µL

Solución desnaturizante

Formamida	500 µL
MOPS 12X	83 µL
Formaldehído 37%	162 µL

Solución buffer de carga

Azul de bromofenol	0.25%
Cianol-xileno	0.25%
Ficoll	15.0%

MOPS 1X

MOPS 12X	20.83 mL
Agua destilada desionizada estéril	Aforar a 250 mL

Solución SSC 20X

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
Agua estéril, ajustar el pH a 7.0	cbp 1 L

TEN

Tris HCl pH 8 1 M	1 mL
EDTA pH 8 0.5 M	0.2 mL
NaCl 5 M	2 mL
Agua destilada estéril	cbp 100 mL

Buffer SDS 7%

Lauril sulfato de sodio (SDS)	7 g
Agua destilada desionizada estéril	cbp 100mL

Agregar poco a poco SDS y calentar si es necesario.

Buffer SSC 2X

SSC 20X	25 mL
SDS 7%	3.57 mL

Aforar a 250 mL

Buffer SDS 0.1%

SSC 20X	1.25 mL
SDS 7%	3.57 mL

Aforar a 250 mL