

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS

ESTUDIO DE LA FUNCION OVARICA EN EL
SINDROME NEFROTICO DE LA RATA

T E S I S

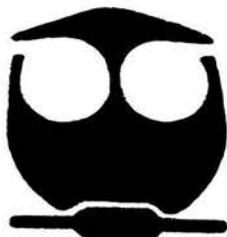
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL PEÑA RICO

TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN OVÁRICA EN EL SÍNDROME NEFRÓTICO DE LA RATA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta en el laboratorio de Bioquímica Clínica, Departamento de Biología de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México; Departamento de Biología de la Reproducción y bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Dr. Rolando E. Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología, UNAM
Dr. Armando Tovar Palacio	INNSZ

Se reconoce la colaboración de la M en C Ma. Guadalupe Ortiz López, laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de Northern blot y cuantificación hormonal.

Se reconoce la asesoría técnica del M en C Mario Cárdenas León, Departamento de Biología de la Reproducción del INNZS, en el manejo de los animales y la recolección de tejidos.

Se reconoce la asesoría del M en C Omar Noel Medina Campos por los experimentos de determinación de colesterol y la cuantificación de proteínas en orina y suero.

Se reconoce la asesoría de la Dra. Perla D. Maldonado por los experimentos de determinación de proteínas oxidadas.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT con número de registro 177946 para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverrí	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Rolando E. Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología, UNAM
Secretario	Dr. Gerardo Gamba Ayala	INNSZ
Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Fisiología, UNAM
Suplente	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

A mis padres **Virginia** y **Máximo**
por todo su apoyo.

A mis hermanos **César Eduardo,**
Luis Enrique y **Erick Fernando.**

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México** por todo el apoyo recibido para realización de este trabajo de tesis de maestría.

Al **Hospital Juárez de México**, laboratorio de Endocrinología Molecular de la unidad de Investigación por haber facilitado la realización de este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada, número de registro 177946, durante mis estudios de maestría.

Al **Posgrado en Ciencias Bioquímicas** por todas las facilidades recibidas. De manera muy especial a **Leticia García** por su paciencia y ayuda durante mi estancia en dicho posgrado.

A la **Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta** por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por sus consejos y principalmente por su amistad.

A la **M en C Guadalupe Ortiz López** por su guía en la realización de las técnicas moleculares y por su amistad.

Al **Dr. José Pedraza Chaverri** por sus consejos para el mejoramiento de este trabajo.

Al comité tutorial integrado por la **Dra. Marta A. Menjivar Iraheta**, **Dr. Rolando E. Hernández Muñoz** y el **Dr. Armando Tovar Palacio** por sus consejos en el mejoramiento de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio **Isela, Verónica, Katy, Ma. de los Angeles** y **Alejandro Cabrera W.**

A mi novia **Luz del Carmen** por toda su paciencia, cariño y principalmente por su amistad

INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
FUNCIÓN OVÁRICA	
Ciclo ovulatorio	2
ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA	5
<i>Citocromo P450_{scc}</i>	7
<i>Proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory)</i>	8
<i>Regulación del gen StAR</i>	11
<i>3β-HSD (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5-Δ^4 isomerasa)</i>	12
<i>Citocromo P450_{17α} (P450_{17α}-hidroxilasa)</i>	12
<i>17β-HSD (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa)</i>	13
<i>Citocromo P450_{arom} (P450 aromatasa)</i>	14
EL RIÑÓN	15
<i>Glomérulo</i>	17
<i>Podocitos</i>	19
<i>Túbulo proximal</i>	20
<i>Asa de Henle</i>	20
<i>Túbulo distal</i>	21
<i>Túbulo conector</i>	21
<i>Túbulo colector</i>	21
SÍNDROME NEFRÓTICO	22
EL OLFATO, LAS FEROMONAS Y EL ÓRGANO VOMERONASAL	25
FUNCIÓN REPRODUCTIVA Y SÍNDROME NEFRÓTICO	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVO PRINCIPAL	32
Objetivos particulares	32
5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	33
Diseño experimental	33
Reactivos	34
Animales	34
Monitoreo del ciclo estral	34
Determinaciones bioquímicas	35
Determinación del estrés oxidativo	35
Determinaciones hormonales	35
Preparación de las sondas	35
Expresión del ARNm de la P450 _{scc} y la proteína StAR.	36
Análisis estadístico	36
6 RESULTADOS	37
Determinación de proteínas oxidadas	37
EVALUACIÓN DE LA ETAPA 1 Y ETAPA 2	38

Determinaciones bioquímicas de la etapa 1 y etapa 2	38
Ciclo estral de la etapa 1 y etapa 2	40
Perfil hormonal de la etapa 1 y etapa 2	42
Expresión del gen de la enzima P450scc en la etapa 1 y etapa 2	44
Expresión génica de la proteína StAR en la etapa 1 y etapa 2	46
Evaluación del efecto de las feromonas: etapas 3A y 3B	49
Determinaciones bioquímicas de la etapa 3: A) presencia del macho fértil y B) presencia de la orina del macho fértil	49
Ciclo estral de la etapa 3: A) presencia del macho fértil y B) presencia de la orina del macho fértil	51
Perfil hormonal de la etapa 3A) presencia del macho fértil y 3B) presencia de la orina del macho fértil	53
7 RESUMEN DE RESULTADOS	56
8. DISCUSIÓN	57
9 CONCLUSIONES	62
10 PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	72
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	72
Medición de proteínas totales en suero: método de Lowry	72
Determinación proteínas urinarias: método turbidimétrico	73
Determinación de colesterol: prueba enzimático-colorimétrico (CHOD-PAD)	75
Proteínas oxidadas	75
DETERMINACIONES HORMONALES	78
Progesterona	78
Testosterona	79
Estradiol	81
EVALUACIÓN MOLECULAR	82
Extracción de ARN total (método de Chomczynski y sacchi modificado)	82
Electroforesis de ARN en gel de agarosa al 1%	83
Diseño de sondas de la enzima P450scc y proteína StAR	85
Hibridación del ADNc de la enzima P450scc	86
Hibridación (marcaje de la sonda específica de la proteína StAR)	89
SOLUCIONES	92

ABREVIATURAS

- P450scc.**- Citocromo P450 side cholesterol chain cleavage
- StAR.**- Proteína regulatoria de la esteroidogénesis aguda
- ANP.**- Aminonucleósido de puromicina
- ARNm.**- Ácido ribonucleico mensajero
- hCG.**- Hormona Gonadotropina coriónica humana
- U.I.**- Unidades internacionales
- LH.**- Hormona luteinizante
- FSH.**- Hormona folículo estimulante
- AMPc.**- Adenosina monofosfato ciclico
- LHRH o GnRH.** Factor liberador de gonadotropinas
- P450 C17.**- Citocromo P450 17α -hidroxilasa
- 3 β -HSD.**- (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 isomerasa)
- P450 arom.**- Citocromo P450 aromatasa
- 17 β -HSD.**-17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
- NADPH.**- Nicotin aminodinucleotido fosfato
- CYP11A.**- Gen que codifica a la enzima citocromo P450scc
- CYP17.**- Gen que codifica a la enzima citocromo P450 17α -hidroxilasa
- CYP19.**- Gen que codifica a la enzima citocromo P450 aromatasa
- RE- α .**- Receptor de estrógeno alfa
- ADNc.**- Ácido desoxirribonucleico complementario
- PKA.**- Proteína cinasa A
- START.**- Dominio de transferencia de lípidos asociado a la proteína StAR
- SF-1.**- Factor esteroidogénico-1
- GATA-4.**- Sitio de unión a GATA -4
- ACTH.**- Hormona adenocorticotrópica
- IGF-1.**- Factor de crecimiento tipo insulina- 1
- C19.**- Carbono 19
- C21.**- Carbono 21
- C18.**- Carbono 18
- DHEA.**- Dehidroepiandrosterona

EDH17B1.- Gen que codifica a la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

EDH17B2.- Gen que codifica a la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

MBG.- Membrana basal glomerular

MH.- Membrana de la hendidura

PP.- Podocitos

ECM.- Enfermedad de cambios mínimos

LC.- Lumen capilar

ES.- Espacio urinario

NPHS1.- Gen que codifica la proteína nefrina

IgGs.- Inmunoglobulinas

EO.- Epitelio olfativo

CO.- Corteza olfativa

BOP.- Bulbo olfativo principal

OVN.- Órgano vomeronasal

BAO.- Bulbo accesorio olfativo

Ros.- Receptores de olores

RAPG.- Receptores acoplados a proteínas G

FSGS.-Glomérulo esclerosis focal y segmentaria

RESUMEN

Antecedentes: El síndrome nefrótico es un padecimiento renal que se caracteriza por proteinuria, hiperlipidemia e hipoproteinemia. También se han caracterizado alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada tanto en el modelo experimental como en pacientes con síndrome nefrótico. **Planteamiento del problema:** Particularmente en la rata hembra con síndrome nefrótico se ha reportado una disminución de la concentración de gonadotropinas y de esteroides sexuales. **Objetivo:** Evaluar la expresión de los componentes indispensables para el inicio de la esteroidogénesis: la enzima P450scc (side cholesterol chain cleavage) y la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) en la rata con síndrome nefrótico inducido por la administración del aminonucleósido de puromicina (ANP). **Métodos:** La esteroidogénesis se evaluó con base a la concentración circulante de progesterona, testosterona y estradiol, y por la determinación de la expresión de los ARNm de la enzima P450scc y la proteína StAR en ovario y la glándula suprarrenal. Las concentraciones de esteroides se midieron por radioinmunoanálisis específico y la expresión del ARNm de la enzima P450scc y la proteína StAR en ovario y la glándula suprarrenal se evaluaron por Northern blot. El estudio se realizó en tres etapas: en la primera se analizó en las ratas control y con síndrome nefrótico en fase aguda (día 10), en la segunda se examinó a los animales control y con síndrome nefrótico después de la administración de una o cuatro dosis de gonadotropina coriónica (hCG) (8 UI) y en la etapa tres se evaluó el efecto de feromonas mediante la presencia del macho fértil así como de la orina del macho fértil, en ratas control y nefróticas. **Resultados:** Las determinaciones hormonales muestran que las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol se encuentran disminuidas al día 10 y no responden al estímulo con hCG, excepto la testosterona la cual aumenta significativamente después del estímulo de 4 dosis de hCG. La expresión del ARNm de la enzima P450scc en el ovario con síndrome nefrótico disminuyó en el día 10 y aumentó tras los estímulos con una y cuatro dosis de hCG. Respecto de la proteína StAR, la expresión del gen disminuyó significativamente en el día 10 y permaneció baja después del tratamiento con hCG. La expresión de los ARNm de la P450scc y de la proteína StAR en la glándula suprarrenal no cambió en los grupos con síndrome nefrótico evaluados. Por otro lado, la evaluación del efecto de las feromonas indica que la presencia del macho fértil o su orina no tienen efecto sobre los niveles de las hormonas esteroides sexuales las cuales permanecen disminuidas significativamente en todos los grupos estudiados, durante este padecimiento renal. **Conclusión:** En conjunto, los datos presentados revelan la existencia de alteración de la función ovárica durante el síndrome nefrótico, específicamente en la expresión de la enzima P450scc y la proteína StAR, lo cual explica el hipogonadismo asociado a la condición nefrótica. **Perspectivas:** Los resultados de este trabajo y los que lo anteceden, dan un amplio panorama de las alteraciones endocrino-reproductivas en el síndrome nefrótico. Sin embargo, aun se desconocen muchos factores implicados en dichas anomalías, así la utilización del cultivo de células gonadales y la administración de compuestos tales como FSH, hCG, 8-bromo AMPc, antioxidantes o la combinación de estos, aportarán un conocimiento más amplio de los factores implicados en la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en el síndrome nefrótico.

INTRODUCCIÓN

FUNCIÓN OVÁRICA

La importancia de la función ovárica tiene su base en la necesidad de preservar la especie. De tal forma que el objetivo central de la función ovárica es la generación de un huevo fertilizable, razón por la cual se considera al ovario una glándula maestra. Sin embargo, y a pesar de su enorme potencial, su funcionamiento correcto depende de la contribución de otros componentes que se integran en el denominado eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Fig. 1). El hipotálamo, situado entorno al tercer ventrículo y en su base por debajo del tálamo y por encima de la hipófisis, regula la secreción pulsátil de las hormonas hipofisarias: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), a través del factor liberador de gonadotropinas denominado LHRH o GnRH. Tanto LH como FSH son los efectores hipotalámico-hipofisarios que ejercen sus efectos sobre el ovario, el cual responde de manera cíclica a través de sus células específicas dando lugar a la síntesis de esteroides sexuales, el desarrollo folicular y la maduración de un huevo fértil (el óvulo). La secreción de esteroides tiene un efecto de control negativo sobre la unidad hipotalámica-hipofisaria, con excepción del período preovulatorio (1).

Ciclo ovulatorio

El ovario de los mamíferos está compuesto por varias estructuras, pero básicamente puede ser dividido en dos compartimentos, la corteza y la médula. La corteza contiene estructuras foliculares en diferentes estados de desarrollo, las cuales están rodeadas por células del estroma e intersticiales. La médula está compuesta principalmente por vasos sanguíneos, nervios y fibras musculares. En el ovario la esteroidogénesis toma lugar en dos tipos de células foliculares, tecas y granulosa, las cuales sintetizan progestinas, estrógenos y en menor grado andrógenos. Así, la actividad principal del ovario se clasifica como reproductiva y secretora (2). Durante un ciclo ovulatorio un mecanismo coordinado multihormonal conduce al desarrollo folicular (Fig. 2). El folículo

es el microambiente en el cual una célula germinal da por resultado un huevo maduro, el cual es liberado del folículo fenómeno conocido como ovulación. Inicialmente el ovario solo contiene folículos primordiales y primarios, en estos últimos el óvulo inmaduro se encuentra rodeado por una monocapa de células cuboidales. Bajo circunstancias que aún no están claras, los folículos primarios son reclutados para su maduración dando lugar a la formación de folículos preantrales. Posteriormente, las células foliculares adquieren receptores para la FSH (2,3), permitiendo así que la FSH actúe sobre la maduración del folículo. En este sentido, el crecimiento de los folículos se da a través de estadios sucesivos de maduración, lo cual se refleja en el aumento de la capacidad de síntesis de estrógenos (2,4). Sin embargo, solo un folículo alcanza el estadio preovulatorio, y el resto entran en regresión, a esta fase se le denomina fase folicular. Esta es la primera fase de la maduración del endometrio, es decir, el inicio del ciclo uterino. Un patrón característico de fluctuación de las concentraciones hormonales en suero se asocia con el ciclo ovulatorio. Al inicio del ciclo, la FSH estimula la producción de estrógenos en las células de la granulosa y la LH induce la producción de andrógenos en las células de la teca (2,5). La producción de andrógenos y estrógenos en el ovario inhiben la liberación de gonadotropinas por la glándula hipofisiaria. Adicionalmente, la FSH estimula la síntesis de inhibina, activina y folistatina en células de la granulosa (6). De estas moléculas, se conoce que la inhibina y la folistatina inhiben la síntesis y secreción de FSH en la hipófisis y que la activina puede estimular la secreción de FSH (7). Los folículos diferenciados al estadio preovulatorio producen altas cantidades de estrógenos, las cuales alcanzan su máximo con lo que estimulan la liberación de la LH hipofisiaria. La ovulación se realiza cuando los folículos preovulatorios son expuestos a una concentración elevada de LH. Posteriormente, las células foliculares, teca y granulosa, sufren cambios morfológicos y bioquímicos, proceso que se denomina luteinización y que culmina con la formación del cuerpo lúteo el cual produce progesterona (2,8). Durante esta segunda fase del ciclo (lútea secretoria), las células epiteliales del endometrio se diferencian bajo la influencia de la progesterona a células secretorias (9), mientras que las células del estroma experimentan predecidualización. Si la fertilización no ocurre, el cuerpo lúteo es finalmente reemplazado por tejido fibroso. El endometrio entonces sheds conduciendo a

la menstruación y dando término al ciclo uterino (10). En esta etapa nuevos folículos primarios inician su crecimiento y maduración, iniciándose así un nuevo ciclo. A diferencia del humano el ciclo estral de la rata es extremadamente corto de entre 4 a 6 y el cual está dividido esencialmente en cuatro fases: diestro 1, diestro 2, proestro y estro, esta última representa el final del ciclo estral de la rata y fase en la que el animal es fértil.

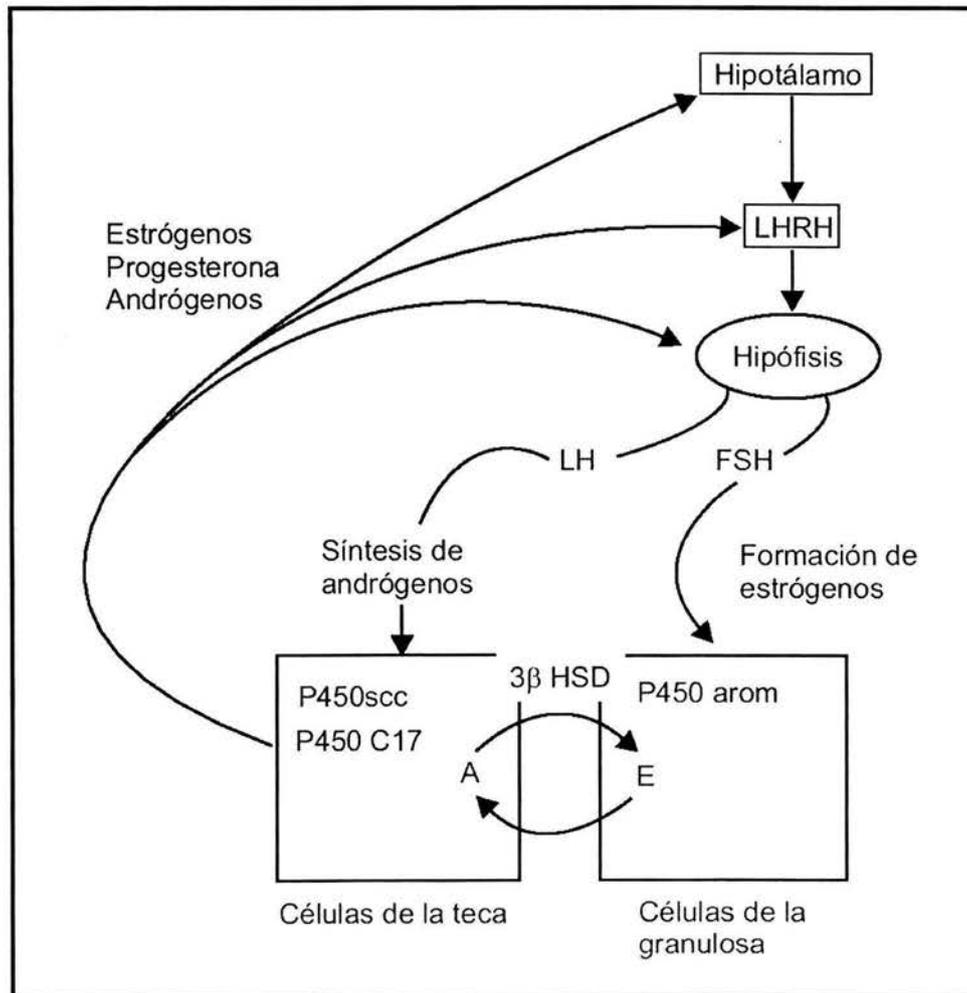


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario; LHRH: factor liberador de gonadotropinas; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; P450_{scc}: citocromo P450_{scc}; P450_{C17}: citocromo P450 α -hidroxilasa; 13 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450_{arom}: citocromo P450 aromatasa; A: andrógenos; E: estrógenos.

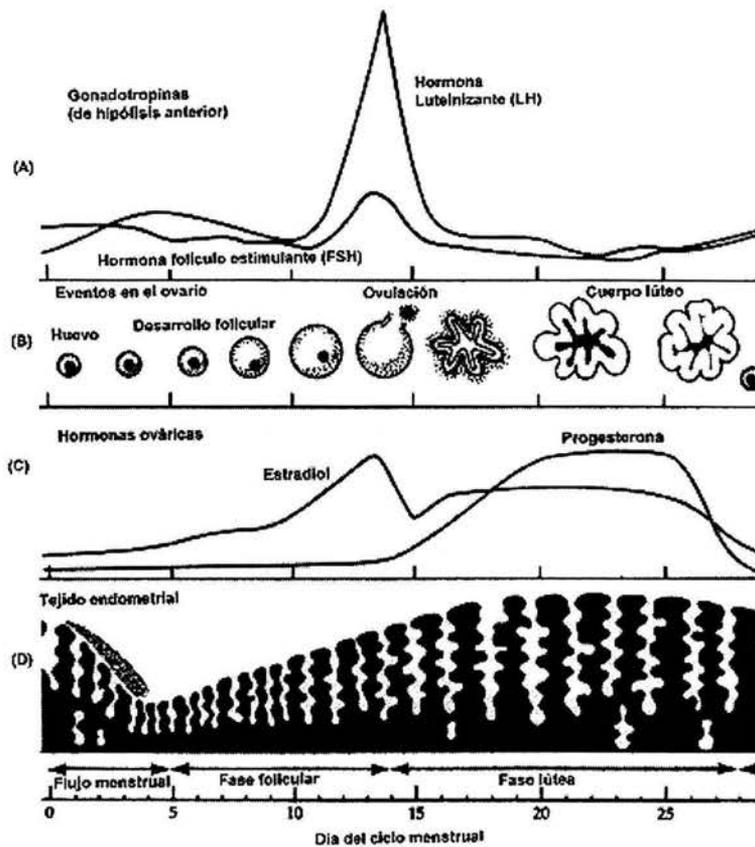


Figura 2. Eventos que acompañan al ciclo menstrual. (A) Fluctuación en los niveles de gonadotropinas, (B) Ciclo ovárico, (C) Cambios en los niveles de hormonas ováricas y (D) Ciclo uterino.

ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA

Las principales hormonas secretadas por el ovario son estradiol (1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol), progesterona (4-pregнено-3,20-diona) y andrógenos (2). El estradiol es el principal esteroide secretado previo a la ovulación y posteriormente la progesterona alcanza su máximo. Los andrógenos no cambian significativamente durante el ciclo ovulatorio, solamente se presenta un leve incremento en la concentración de la testosterona previo a la ovulación. La variación en la producción hormonal resulta de una regulación coordinada de la expresión de las enzimas esteroiogénicas (11). La esteroiogénesis inicia a partir de la biosíntesis de colesterol "de novo", 5-colesteno-3- β -ol, en las células de la granulosa o de la toma de colesterol de las lipoproteínas circulantes en las células de la teca o la granulosa (2). A continuación el colesterol es

convertido a pregnenolona (3 β -hidroxi-5-pregнено-20-ona), por acción de la enzima encargada de romper la cadena lateral del colesterol la cual está asociada a citocromo P450 (P450_{scc}) (12). En el siguiente paso la pregnenolona es convertida en progesterona, en una reacción catalizada por un complejo enzimático microsomal denominado 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3 β -HSD) (13). Posteriormente, se efectúa una 17 α -hidroxilación de pregnenolona o progesterona y la ruptura en el carbón 17 y 22, evento catalizado por la 17 α -hidroxilasa asociada a citocromo P450 (P450_{c17}) (11). Este paso constituye una reacción importante en la síntesis de andrógenos. En el ovario la P450_{c17} se expresa únicamente en las células de la teca. El paso final de la esteroidogénesis conduce a la formación de estradiol y es catalizado por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) y la aromatasa. La 17 β -HSD cataliza la interconversión de 17-hidroxi y 17-cetoesteroides, como la estrona y el estradiol. Finalmente, la aromatasa (P450_{arom}) que es un complejo enzimático de dos componentes, aromatasa citocromo P450 y NADPH citocromo P450 reductasa (13), cataliza la aromatización del anillo A de los andrógenos dando como producto un anillo A fenólico característico de los estrógenos (Fig. 3)

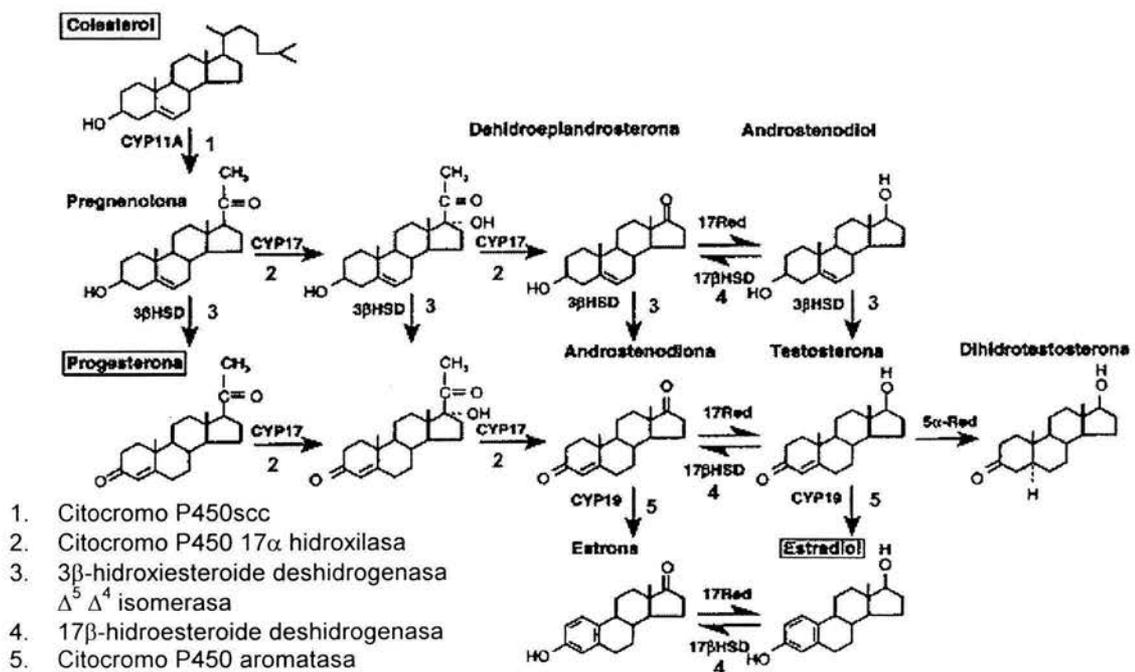


Figura 3 Ruta esteroidogénica ovárica. Formación de las hormonas esteroides sexuales a partir de colesterol

Citocromo P450scc (side cholesterol chain cleavage)

La esteroidogénesis inicia con la conversión de colesterol a pregnenolona, representando el primer paso y hasta hace algunos años considerado limitante en la biosíntesis de todas las hormonas esteroideas. Esta reacción involucra tres pasos secuenciales distintos; 20 α -hidroxilasa, 22-hidroxilación y el rompimiento de la cadena lateral del colesterol entre los átomos de carbono 20 y 22 para producir pregnenolona y ácido isocaproíco (15). La conversión de colesterol a pregnenolona es catalizada por el único sitio activo del citocromo P450scc (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 850,000 daltones.

El citocromo P450scc es una hemoproteína que funciona como la oxidasa terminal de un sistema de transporte de electrones mitocondrial, y está constituido por tres componentes funcionales básicos. Estos tres componentes funcionan de la siguiente manera: los electrones del NADPH son aceptados por una flavoproteína denominada ferredoxina reductasa que está asociada débilmente a la membrana mitocondrial interna. La ferredoxina reductasa transfiere los electrones a una proteína con centro hierro-azufre denominada ferredoxina, que se encuentra en solución en la matriz mitocondrial, la cual a su vez transfiere los electrones al P450scc. Se piensa que la ferredoxina reductasa y la ferredoxina funciona como proteínas genéricas para el transporte de electrones para todos los P450s mitocondriales y no solo para aquellos involucrados en esteroidogénesis (16).

A nivel genómico, el gen de esta enzima, conocida anteriormente como 20-22 desmolasa (EC 1.14.15.67), 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 DNA genómico.

La enzima P450scc se expresa predominantemente en las tres zonas de la corteza suprarrenal (zona glomerulosa, zona fasciculada y zona reticularis); en el testículo, ésta

se encuentra en las células de Leydig y en el ovario se expresa tanto en las células tecales como de la granulosa. Durante la luteinización la P450scc se expresa grandemente en el cuerpo lúteo, el cual secreta altas cantidades de progesterona (17). Además de los tejidos esteroideogénicos clásicos, la P450scc está presente en la placenta en donde promueve la síntesis de los esteroides necesarios para mantener el embarazo y el desarrollo fetal. Además, su expresión se ha detectado en ciertas áreas cerebrales, activando probablemente la síntesis de neuroesteroides, así como en el intestino primitivo que dará origen al colon, en la piel, el páncreas y el pulmón (18).

Numerosos estudios indican que el AMPc es el principal mediador de la inducción de la expresión hormonal de las enzimas esteroideogénicas primordialmente de la P450scc, así como de otros citocromos P450. Los mecanismos que regulan a la P450scc son procesos complejos tejido- y especie-específicos (18). Tanto la esteroideogénesis como la acumulación del ARNm del P450scc en las células de Leydig y la placenta son estimuladas por LH y la gonadotropina corionica humana (hCG), esta última comparte el mismo receptor que la LH, las zonas reticularis y fasciculada de la suprarrenal, por ACTH y las células ováricas de la granulosa, por la LH y FSH (19). Hay evidencia experimental que sugiere que, al menos en la placenta, otro transactivador nuclear (RE- α) podría estar influyendo sobre la actividad enzimática y los niveles de ARNm de la P450scc (20).

Proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory)

La proteína StAR es un componente indispensable en la regulación aguda de la esteroideogénesis, mediando la transferencia del colesterol al interior de la membrana interna mitocondrial (21), sitio en donde la enzima P450scc se encarga de transformarlo mediante una serie de reacciones químicas a pregnenolona. Se sabe que traslocación del colesterol a la membrana interna mitocondrial es el verdadero paso limitante en la esteroideogénesis.

La proteína StAR es una fosfoproteína de 30 kDa asociada a la mitocondria, que se origina a partir de un precursor de 37 kDa (22). La proteína StAR fue purificada, y su gen clonado, secuenciado y expresado en 1994 (23). La deducción de la secuencia de aminoácidos a partir del ADNc reveló que es una proteína de 285 aminoácidos (en algunas especies de 284). El amino terminal de la proteína StAR presenta las características de una proteína que es sintetizada en el citoplasma y que posteriormente es importada a la mitocondria. Sus primeros 26 residuos de aminoácidos forman una hélice anfipática (24). Así mismo, se sugiere que la proteína StAR adquiere una configuración globular desdoblada a pH 3.5-4.0, el cual podría estar generándose en las cercanías de la mitocondria (25). Esta configuración facilita el desdoblamiento de la proteína StAR lo que la prepara para su acción sobre la mitocondria y el subsecuente movimiento a través del poro en la matriz mitocondrial (24).

Además, se sabe que cuando se truncan 10 o más residuos de aminoácidos del carboxilo terminal de la proteína StAR, existe una marcada disminución de la actividad esteroideogénica. En este sentido, el empleo de construcciones moleculares que afectan la importación de la proteína StAR, confirman la hipótesis de que ésta puede actuar fuera de la mitocondria (26) y que se requiere la síntesis continua de esta proteína para mantener la esteroideogénesis (24).

Se han propuesto varios mecanismos de acción de la proteína StAR. Uno de ellos sugiere que esta proteína actúa como una lanzadera intermembranal, entrando al espacio entre la membrana exterior mitocondrial y la interior de la misma, movilizándolo el colesterol que se encuentra unido al dominio START de manera vectorial a través de las membranas (24).

La proteína StAR es una fosfoproteína, lo que ha sido confirmado en diversos estudios en los que se demuestra la existencia una correlación entre la forma fosforilada de la proteína y la esteroideogénesis. La fosforilación es inducida por AMPc y se asume que es catalizada por la PKA (proteína cinasa A). En este contexto, la clonación del ADNc

de la proteína StAR reveló que su secuencia contiene 2 sitios de fosforilación conservados, los cuales son sitios de PKA. En el humano, la fosforilación está dirigida directamente sobre los residuos de serina 57 y 195 (27), demostrándose posteriormente que solo la fosforilación del residuo de serina 195 es esencial para su funcionalidad (24).

De este modo, la evidencia más clara del papel indispensable de la proteína StAR en la regulación de la esteroidogénesis, mediando la transferencia de colesterol, fue el hallazgo de que mutaciones en el gen de la proteína StAR llevan a una condición potencialmente fatal, conocida como hiperplasia congénita lipoide de la suprarrenal (28). Este padecimiento se caracteriza por la incapacidad casi completa del recién nacido para sintetizar hormonas esteroides, como consecuencia de un daño en el sitio de liberación del colesterol, lugar en donde posteriormente será convertido a pregnenolona vía la enzima P450scc (21). Este hecho fue confirmado con ratones knock-out de la proteína StAR, los cuales mostraron un fenotipo idéntico al presentado por esta enfermedad, demostrando así la importancia de la proteína StAR en la esteroidogénesis (29).

Por otro lado, todo indica que la expresión de la proteína StAR está confinada a tejidos esteroidogénicos (21). Así, la proteína StAR se expresa en la corteza de la glándula suprarrenal (tanto en células de la glomerulosa como en células de la fasciculata-reticularis) (30), ovarios (células de la teca, granulosa y células del cuerpo lúteo) (31), testículos (células de Leydig) (32). Interesantemente, la proteína StAR se expresa también en células de Sertoli (33), las cuales no son consideradas generalmente esteroidogénicas; sin embargo, estas células pueden ser inducidas a expresar la enzima P450scc sintetizando pequeñas cantidades de pregnenolona, lo que hace suponer que éstas tienen alguna actividad esteroidogénica (34). La proteína StAR también se expresa en cerebro, donde su distribución celular se empalma con la enzima P450scc y la enzima 3 β -HSD (35). Estos hallazgos podrían implicar a la proteína StAR en la biosíntesis de neuroesteroides (21). También está presente en riñón humano, pero su papel en este tejido se desconoce (36).

Regulación del gen de StAR

Al ser la proteína StAR el paso limitante en la esteroidogénesis, su expresión es finamente regulada. Si bien inicialmente se postuló que la expresión del gen *StAR* debe ser capaz de responder rápidamente a las diferentes señales que regulan la esteroidogénesis, hallazgos recientes indican que algunos eventos de la regulación de la expresión de la proteína StAR podrían ocurrir a nivel post-transcripcional (37,38).

Un factor de transcripción que es considerado importante en la regulación de la expresión del gen de la proteína StAR es el factor esteroidogénico 1 (SF-1) (22). Interesantemente, ratones con deficiencia homociga del gen SF-1, estos no expresan el ARNm de StAR, subrayando la importancia de este factor de transcripción como elemento de este gen (39).

El SF-1 es miembro de una familia de factores de transcripción que controlan la expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de hormonas esteroides, que se identificó por primera vez en células de la corteza suprarrenal. Se han encontrado al menos 6 sitios de unión para SF-1 en el promotor del gen *StAR*. Sin embargo, además de SF-1 existen otros factores de transcripción relevantes en el control de la transcripción de este gen, como por ejemplo GATA-4 y C/EBP β (38).

Además de las señales generadas a través de los receptores de membrana, algunos estimuladores podrían actuar directamente sobre el gen de StAR, indicando que su promotor podría contener varios elementos regulatorios. Así la producción de esteroides y la expresión de StAR están sobrerregulados por LH (40), gonadotropina coriónica (41), ACTH (42), FSH, análogos de AMPc (43), agentes inductores de AMPc intracelular (44), IGF-1 (41) y estradiol (45).

3 β -HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 isomerasa)

La enzima 3 β -HSD es un complejo enzimático que cataliza la deshidrogenación e isomerización de esteroides C21 y C19 (15). La 3 β -HSD se localiza en las membranas de retículo endoplásmico y mitocondria. Además de la pregnenolona, esteroides como la 17 α -hidroxipregnenolona y la DHEA (dehidroepiandrosterona) son substratos de la 3 β -HSD. Hasta ahora varias isoenzimas 3 β -HSD se han caracterizado, las cuales son codificadas por una familia genómica (46,47), a diferencia de las P450s esteroideogénicas donde cada una es codificada por un gen.

La actividad de la 3 β -HSD se ha detectado no solo en los tejidos clásicamente esteroideogénicos como placenta, glándulas suprarrenales, ovario y testículo, sino que también en tejidos como pulmón, endometrio, próstata, epidídimo, vesícula seminal, glándula mamaria, intestino, riñón, glándulas salivales, corazón y cerebro (47). La amplia distribución de esta enzima indica que juega un importante papel en la formación de esteroides sexuales en tejidos periféricos. Por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha localizado la 3 β -HSD en los mismos tejidos esteroideogénicos en donde se encuentra el citocromo P450_{scc}; así, está presente en las tres zonas de la corteza suprarrenal, en las células de Leydig testicular (no en los túbulos seminíferos), y en la teca interna. Antes de la ovulación, la 3 β -HSD es localizada en las células de la teca y posteriormente aparece constitutivamente en el cuerpo lúteo (48).

Citocromo P450_{17 α} (P450 17 α -hidroxilasa)

La conversión enzimática de pregnenolona a 17 α -pregnenolona y de progesterona a 17 α -progesterona requiere de hidroxilaciones en la posición 17. Posteriormente, estos intermediarios pueden ser convertidos a dehidroepiandrosterona y androstendiona respectivamente. Se ha demostrado que el citocromo P450_{17 α} , producto único del gen

CYP17, posee la actividad enzimática tanto de 17α -hidroxilación como de $17,20$ -liasa (15). El gen de la 17α -hidroxilasa se ha localizado en la región q24-25 del cromosoma 10 y consiste de siete exones y seis intrones que abarcan 6569 pb. La enzima microsomal P450 17α (esteroide 17α -monooxigenasa EC 1.14.99.9) es una hemoproteína de 508 aminoácidos (57,379 daltones), con dominios de unión al hemo y al esteroide bien preservados, los cuales se encuentran en la región C-terminal entre los residuos 433-453 y 346-366 (49).

Dentro de la corteza suprarrenal, la P450 17α se expresa en las zonas fascicular y reticular en donde participa en la formación de glucocorticoides y andrógenos suprarrenales. De igual forma, la P450 17α se expresa en tejido gonadal en donde dirige la síntesis de andrógenos y estrógenos. En estudios de hibridación *in situ* se demostró la expresión del CYP17 en diferentes áreas del sistema nervioso central y periférico, incluyendo motoneuronas, núcleos pontinos, cerebelo y locus ceruleus, en donde presumiblemente participa en la formación de neuroesteroides activos (50).

17 β -HSD (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa)

La actividad de 17β -HSD esta distribuida ampliamente en tejidos esteroideogénicos y en no esteroideogénicos como en la glándula mamaria, endometrio, tejido adiposo, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, próstata y piel (51,52). Las 17β -HSDs son enzimas que catalizan la interconversión entre grupos 17 -ceto y 17β -hidroxi presentes en estrógenos y andrógenos (47) tales como estrona y estradiol o androstendiona y testosterona (17β -hidroxi-4-androsteno-3-ona). Además de la actividad de 17β -HSD, esta enzima presenta actividad de 20α -hidroxiesteroide (53,54). Hasta el momento se conocen 7 isoenzimas 17β -HSD, de las cuales la tipo 1 cataliza la síntesis de estradiol principalmente en ovario y placenta (55). Estudios inmunológicos han mostrado que la expresión de la 17β -HSD tipo 1 en endometrio fluctúa durante el ciclo menstrual y que es estimulada por progesterona (56). Otros estudios han indicado que análogos de AMPc así como activadores de la proteína cinasa C inducen la expresión de la 17β -HSD tipo 1 en células de coriocarcinoma humano (57), mientras que el tratamiento de

células de la granulosa humana con AMPc causa disminución de la expresión de la 17 β -HSD tipo 1 (58).

El ADNc y el gen de la 17 β -HSD tipo 1 han sido caracterizados (59,60) y se ha mostrado que hay dos genes (EDH17B1 y EDH17B2) los cuales están localizados en serie en el cromosoma 17 (bandas q12-q21) (56). La homología entre las secuencias de ambos genes es de 89 %, la secuencia del gen 1 tiene un codón de paro por lo que representa un gen no funcional o pseudogen. Una clona genómica del gen 2 contiene 6 exones y 5 intrones. La región 5' de ésta incluye elementos de respuesta a andrógenos y a AMPc (61). La 17 β -HSD tipo1 es una enzima citosólica altamente específica para estrógenos con un solo sitio de unión a NADPH. Basados en la secuencia de nucleótidos se deduce que su estructura primaria está compuesta de una secuencia de 327 aminoácidos que corresponden a una proteína de 34.8 kDa (59). En la secuencia de aminoácidos de la 17 β -HSD tipo 1 no se predicen sitios de glicosilación, aunque se reconoce un sitio potencial de fosforilación dependiente de AMPc (básico-básico-X-ser) (59).

Citocromo P450arom (P450 aromatasa)

La conversión de esteroides C-19 a compuestos estrogénicos C-18, es catalizada por el complejo enzimático del retículo endoplásmico conocido como aromatasa. Este complejo incluye el citocromo P450 aromatasa y una flavoproteína NADPH citocromo P450 reductasa, que es una proteína ubicada en retículo endoplásmico. Por tanto, en fracciones subcelulares la aromatasa es una hemoproteína microsomal, producto del gen CYP19, y es responsable de la fijación de esteroides C-19, así como de las dos reacciones de hidroxilación en la posición 19 y de la hidroxilación en C-2 que consecuentemente origina la aromatización del anillo A (15). Corbin y cols. (62) expresaron el ADNc completo de P450arom humana en células COS-1, confirmando que todas las reacciones de aromatización se efectúan en un sitio catalítico simple. Al adicionar androstendiona, testosterona o 16 α -androstendiona a estas células transfectadas se formó el correspondiente estrógeno, con lo cual no hubo duda de la

actividad catalítica de la proteína expresada de forma simple. Por medio de estudios de marcaje de ADN genómico humano se ha localizado el gen de la P450arom, se localiza en el cromosoma 15q21.1 (63).

Los tejidos que efectúan aromatización por excelencia son las gónadas y el cerebro, lo que se ha observado en numerosas especies. Sin embargo, en el humano, además de biosintetizar estrógenos en células de la granulosa del ovario, en las células de Sertoli y de Leydig del testículo, y en varios sitios del cerebro como hipotálamo, amígdala e hipocampo, este proceso también ocurre en placenta y en el tejido adiposo tanto en hombres como en mujeres. En el desarrollo folicular la P450arom es regulada por gonadotropinas hipofisarias (64). Se ha encontrado que la expresión de la aromataasa en todos estos tejidos, está determinada en parte por el uso de promotores tejido específico. Así por ejemplo, en el ovario humano, la P450arom parece utilizar un promotor proximal al sitio de iniciación de transcripción, mientras que en la placenta se emplea un promotor situado al menos 40 kb corriente arriba. En tejido adiposo parece requerir de un tercer promotor específico (65). A pesar de esta diversidad en el uso de promotores alternos, la región reguladora del CYP19 humano parece contener un solo sitio de unión para el factor esteroideogénico SF1 el cual es activado por FSH (66).

EL RIÑÓN.

Los riñones están situados en la parte posterior del abdomen, uno a cada lado de la columna vertebral (Fig. 4A). Cada riñón pesa alrededor de 125-170 gramos en el hombre y 115-155 gramos en la mujer, midiendo de 11 a 12 cm. de longitud, de 5 a 7.5 cm. de ancho y de 2.5 a 3 cm. de grosor en los adultos (67).

En el riñón pueden distinguirse dos regiones diferentes, una exterior de aspecto pálido (la corteza) y una interior oscura (la médula) (Fig. 4B). La médula está dividida en 8 a 18 formas cónicas estriadas, las denominadas pirámides renales. La corteza renal tiene aproximadamente 1 cm de grosor, forma una cápsula sobre las base de cada pirámide renal y se extiende hacia abajo entre las pirámides individuales originando las columnas renales de Bertin (67).

La pelvis renal representa la porción expandida del tracto urinario superior, en el exterior de la parte superior de esta se encuentran los cálices mayores, de los cuales varios cálices menores se extienden hacia las papilas de las pirámides drenando la orina formada por cada pirámide. En tanto que los uréteres salen de la porción baja de la pelvis renal en la unión ureteropélvica descendiendo aproximadamente de 28 a 34 cm., hasta la vejiga en los humanos. Las paredes de los cálices, pelvis y uréteres contienen músculo liso que se contrae de manera rítmica impulsando la orina hacia la vejiga (67).

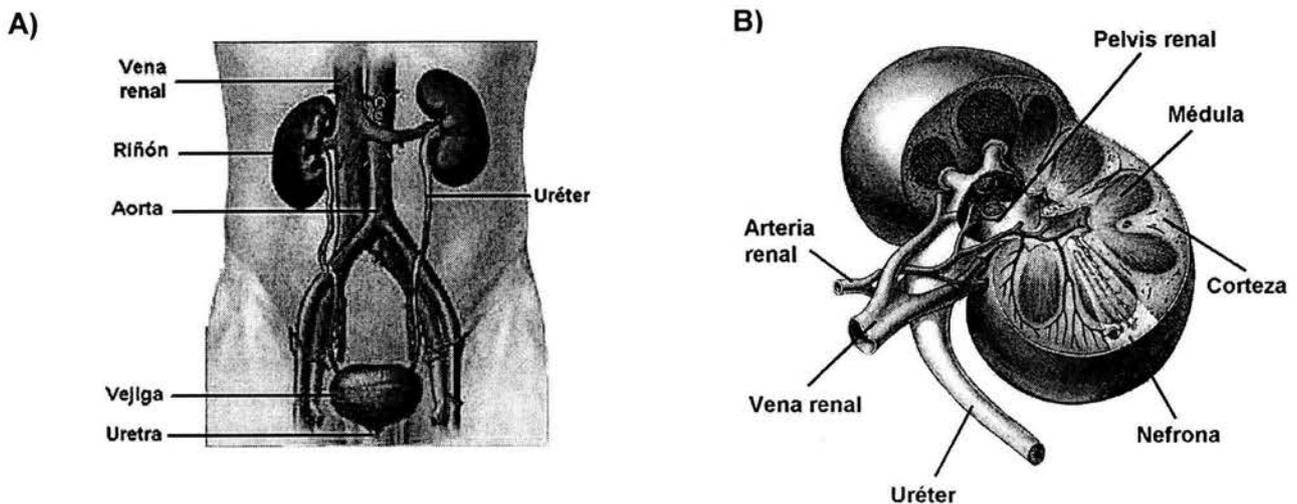


Figura 4. A) Los riñones producen orina y regulan la composición de la sangre. La orina es transportada de la vejiga a través del uréter, saliendo finalmente por la uretra. B) Esquema del riñón en el que se muestran algunas de las estructuras que forman a este órgano.

Cada riñón está formado, en promedio por un millón de nefronas, la unidad morfofuncional de este tejido (Fig. 5). La nefrona posee un componente de filtración denominado glomérulo y un túbulo que se extiende a partir del glomérulo, y el cual está dividido en diferentes secciones (68).

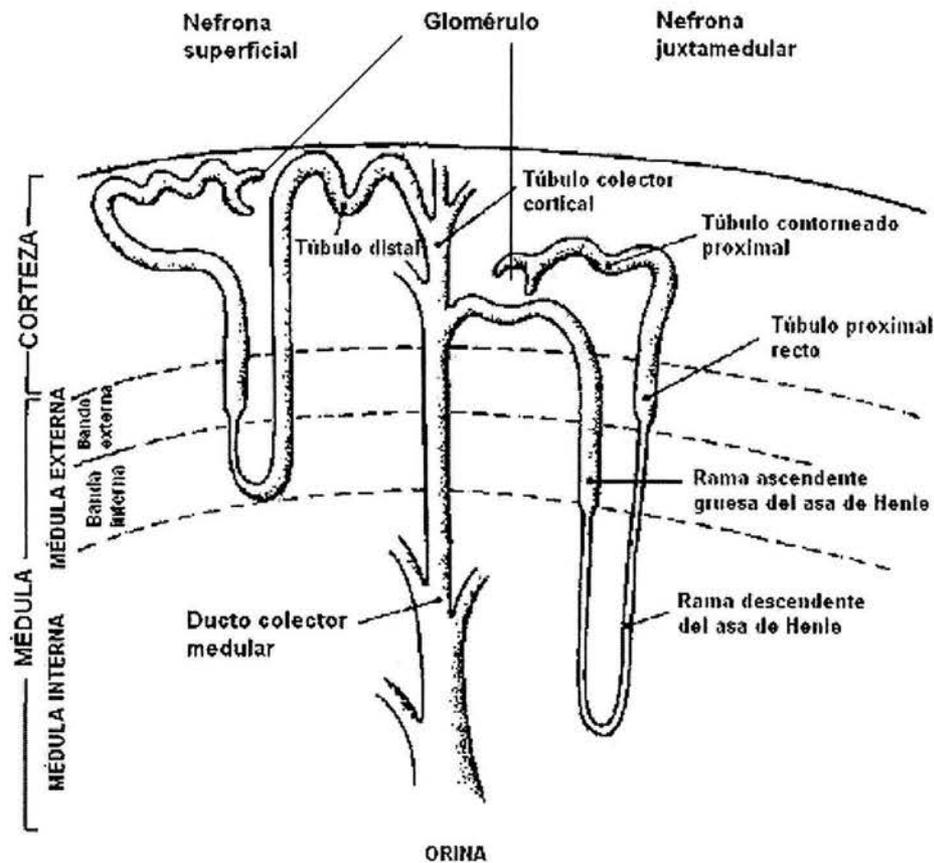


Figura 5. Representación esquemática de la nefrona, clasificación de acuerdo a la localización del glomérulo. Tomada de Brenner and Rector (67).

Glomérulo

El glomérulo está constituido por una red de capilares interconectados denominados capilares glomerulares y una cápsula hueca, la cápsula de Bowman (Fig. 6). En el interior del glomérulo, toda la red de capilares hace contacto con un lado de la cápsula de Bowman, sin interactuar con la parte opuesta de ésta, de tal forma que existe un espacio entre las dos caras de la cápsula, el denominado espacio de Bowman. Hacia el interior de este espacio se filtra el líquido desde los capilares glomerulares, a través de las membranas superpuestas del propio capilar y de la cápsula de Bowman (68). El diámetro promedio del glomérulo en un humano es de aproximadamente 200 μm (67).



Figura 6. Microscopía electrónica de barrido de un glomérulo: E) Ramas que forman el plexo capilar peritubular, CL) Asa capilar. Tomada de Brenner and Rector (67).

Esta barrera de filtración glomerular está compuesta por un endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular (MBG) y las células endoteliales (podocitos), los cuales se encuentran conectados por una estructura extracelular amplia de 35-45 nm. denominada membrana de la hendidura (Fig. 7). Normalmente, el agua y pequeños solutos del plasma son filtrados fácilmente a través de este tamiz; sin embargo, el paso de proteínas con un tamaño semejante al de la albúmina está restringido casi por completo. Se piensa que la MBG es el componente más importante del proceso selectivo por tamaño y carga eléctrica (69). Se ha observado que los defectos en la MBG son los responsables de la proteinuria en muchas enfermedades glomerulares (70), como en el síndrome nefrótico.

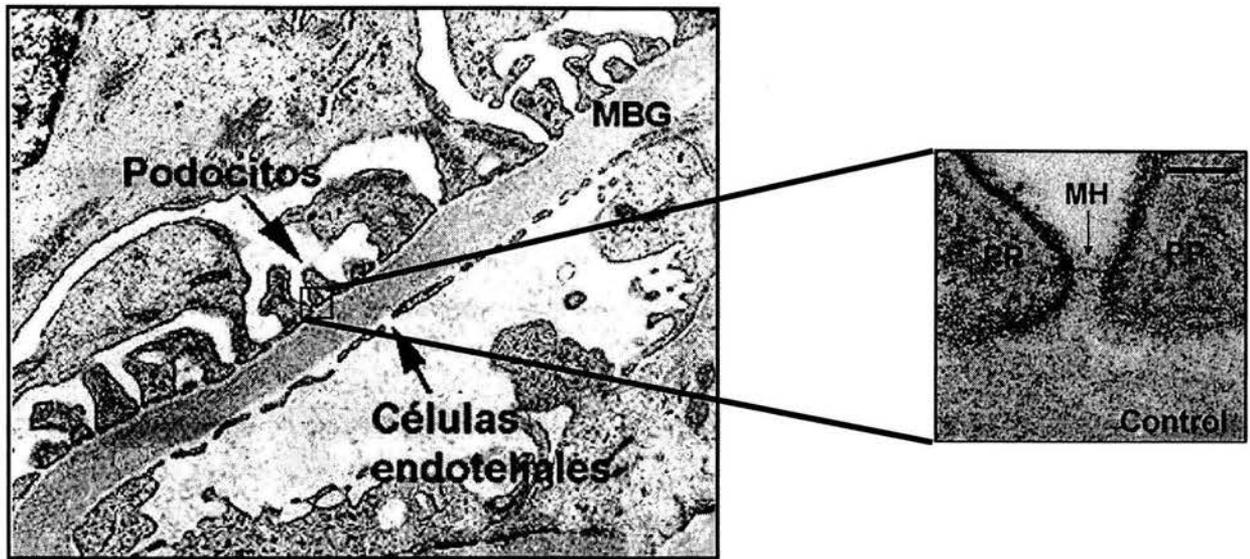


Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra la barrera de filtración glomerular, así como una ampliación de la estructura de unión entre podocitos (PP), la membrana de la hendidura (MH). Imágenes tomadas de Brenner and Rector (67) y Patrakka J y cols (69).

Podocitos

Los podocitos son células altamente diferenciadas. Son células epiteliales polarizadas con un dominio luminal o apical y una membrana basal celular, referida únicamente a los procesos podocíticos, los cuales están embebidos en la MBG. La frontera entre la membrana basal y la membrana luminal está representada por la membrana de la hendidura, y se encuentran cubiertas por una delgada capa rica en sialoglicoproteínas que incluye podocalixina, podoendina, entre otras, siendo estas las responsables de la carga negativa de la superficie de los podocitos (71,72). Tanto la membrana basal como la apical son heterogéneas con respecto a su composición de lípidos, y las dos contienen regiones ricas en colesterol que se encuentra densamente distribuidas (73,74).

Túbulo proximal

El segmento del túbulo que drena la cápsula de Bowman es el túbulo proximal que inicialmente forma varias espiras (la parte contorneada) seguido de una parte relativamente recta que desciende hacia la médula. El túbulo proximal tiene una longitud aproximada de 14 mm (75) y un diámetro exterior de 40 μm en el humano (67).

El túbulo proximal se encarga de la reabsorción de Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , agua y compuestos orgánicos como la glucosa y aminoácidos. Aproximadamente la mitad del ultrafiltrado glomerular es reabsorbido en el túbulo proximal. La reabsorción del fluido está acoplada al transporte activo de Na^+ y los cambios que ocurren en la osmolalidad o en la concentración de Na^+ en el fluido tubular a lo largo del túbulo proximal hacia los capilares peritubulares, indicando que la reabsorción del fluido en este segmento es isosmótico (76).

Asa de Henle

El siguiente segmento, en el cual desemboca la porción recta, es la rama descendente delgada del asa de Henle. A nivel de la vuelta en forma de horquilla, empieza la rama ascendente del asa de Henle. En las asas largas, la primera porción de la rama ascendente permanece delgada y después la porción superior se vuelve gruesa, mientras que en las asas cortas, toda la rama ascendente es gruesa. El asa delgada de Henle es de suma importancia en el mantenimiento de la hipertonicidad del intersticio medular, así como para la concentración o dilución de la orina (77). En este sentido, la rama descendente delgada es permeable al agua pero posee poca permeabilidad para el Na^+ y Cl^- , permitiendo que el agua sea extraíble del fluido tubular. Por el contrario la rama ascendente delgada es impermeable al agua pero altamente permeable al Na^+ y al Cl^- lo que provoca que la sal difunda hacia fuera del túbulo (67). Por otro lado, el asa gruesa de Henle está involucrada en el transporte activo de Na^+ y Cl^- del lumen hacia los alrededores del intersticio. Como el epitelio es casi impermeable al agua, la reabsorción de sal contribuye a la formación de un intersticio medular hipertónico (67).

Túbulo distal

Al final de la rama ascendente del asa de Henle, el túbulo pasa entre las arteriolas que suministran la sangre a su glomérulo de origen a este segmento, que es muy corto, y que se llama mácula densa. Más allá de la mácula densa, el túbulo forma espiras una vez más, y a esta sección se le llama túbulo contorneado distal, en donde continúa la reabsorción de Na^+ y Cl^- continúa (68).

Túbulo conector

El túbulo conector representa una región de transición entre la nefrona distal y el túbulo colector y está constituido principalmente por una porción del túbulo distal; este juega un papel importante en la secreción de K^+ , la cual está regulada en parte por los mineralocorticoides.

Túbulo colector

Desde el glomérulo hasta el final del túbulo colector inicial, cada uno del millón de túbulos está completamente separado de los otros. Varios túbulos colectores iniciales procedentes de las nefronas separadas se juntan para formar túbulos colectores corticales, los que entonces tuercen hacia abajo para entrar a la médula (túbulos colectores medulares) y finalmente se vacían en uno de los cálices de la pelvis renal; a la última porción se le llama ducto papilar. El cáliz se continúa con el uréter, el cual desemboca en la vejiga urinaria donde la orina se almacena en forma temporal y desde la cual se elimina a intervalos (68). El túbulo colector es capaz tanto de reabsorber y secretar HCO_3^- . Una de las principales funciones del túbulo colector es la secreción de K^+ , proceso que está regulado por los mineralocorticoides (67).

SÍNDROME NEFRÓTICO

El síndrome nefrótico es un padecimiento renal que en su forma clásica se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia e hiperlipidemia. Estas alteraciones son las consecuencias directas o indirectas de un aumento en la permeabilidad glomerular de las proteínas del plasma hacia la orina. Las células endoteliales, la membrana basal glomerular (MBG) y las células epiteliales contribuyen de manera importante en la función de filtración de la pared capilar glomerular. Se pensaba que la MBG era el principal componente de la barrera de filtración; sin embargo, hoy se sabe que las células epiteliales juega un papel clave en la filtración glomerular (78). En este sentido, la proteinuria se ha asociado a la pérdida de los procesos podocíticos lo que sugiere que éstos podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo de este padecimiento (79,80). La figura 8A muestra la imagen de microscopia electrónica de transmisión de la membrana basal glomerular (MBG) y los podocitos (PP) de personas normales, las flechas indican el sitio en el que se localiza la apertura de la membrana. Por el contrario, la imagen de microscopia electrónica de transmisión de la MBG y los podocitos de un paciente con el síndrome nefrótico de enfermedad de cambios mínimos (ECM) (Fig. 8B) muestra fusionados los podocitos y la pérdida de la apertura de la membrana.

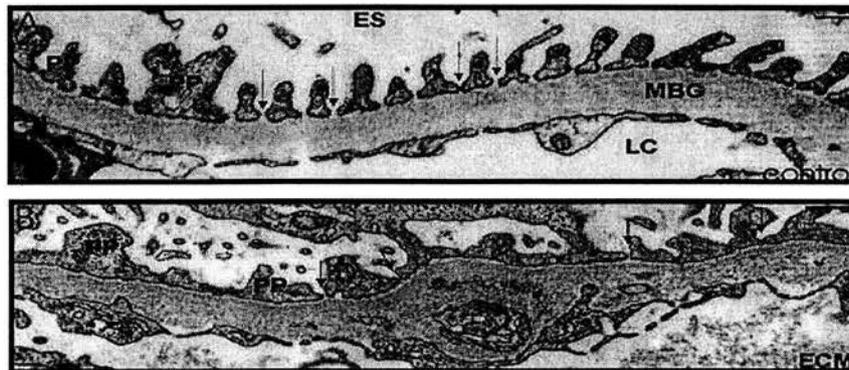


Figura 8. Microscopia electrónica de la pared capilar glomerular. A) se presenta la morfología de la pared capilar normal (control), PP = podocitos, LC = lumen capilar, ES = espacio urinario. B) muestra las alteraciones que sufren los procesos podocíticos en la ECM. Las indican el sitio en el que se encuentra la apertura de la membrana. Imagen tomada de Patrakka J y cols (69).

Los mecanismos que conducen a la proteinuria en la ECM no están bien determinados; sin embargo, existen indicios de que separación de los podocitos de la MBG están relacionados con la proteinuria y particularmente la desaparición de la membrana de la hendidura en la ECM (Fig. 9), hecho que también sucede en el síndrome nefrótico congénito (78).

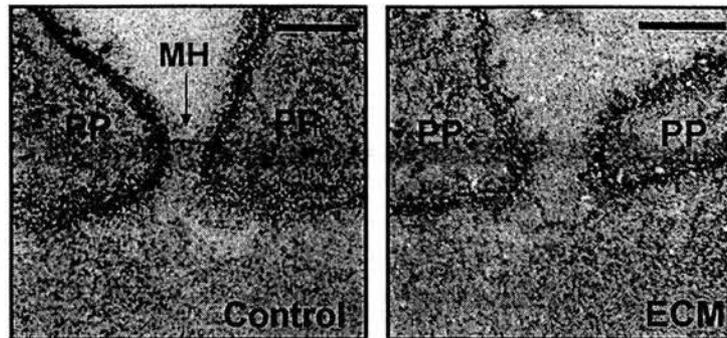


Figura 9. Imagen de alta resolución de los procesos podocíticos. A) procesos podocíticos normales, en los que se puede ver la unión de los podocitos (PP), por la membrana de la hendidura (MH). B) la membrana de la hendidura se pierde en la ECM. Imagen tomada de Patrakka J y cols (69).

Estudios genéticos han demostrado que las mutaciones en el gen *NPHS1* que codifica para la nefrina, proteína específica del podocito, es la responsable del síndrome nefrótico congénito del tipo finlandés (NPHS1) (81,82) y tal vez de la ECM.

De este modo, la alteración de la pared capilar glomerular que permite una filtración excesiva de las proteínas del plasma puede originarse como consecuencias 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 de una variedad de procesos patológicos que dañan las propiedades de filtración de la pared de los capilares glomerulares (83,84). Este padecimiento puede presentarse con fases agudas repetitivas con remisiones y recaídas espontáneas, que pueden progresar a la insuficiencia renal, o al estado crónico del síndrome nefrótico (84). El manejo terapéutico que se les da a estos pacientes es empírico y sintomático, basado fundamentalmente en la administración de glucocorticoides, los cuales aumentan la

tendencia natural de esta enfermedad a presentar remisiones así como recaídas espontáneas (84).

Como consecuencia de la importante pérdida de proteínas por la orina en el estadio nefrótico, una gran variedad de anomalías se asocian con el síndrome nefrótico. La pérdida de la globulina transportadora de la tiroxina en pacientes nefróticos puede producir alteraciones en las pruebas de la función tiroidea que incluyen una tiroxina baja y un aumento de la captación de triyodotironina (85). La pérdida de proteína de unión del colecalciferol puede llevar a un estado de deficiencia de la vitamina D, hiperparatiroidismo secundario y enfermedad ósea (86). El aumento de excreción urinaria de transferrina produce anemia microcítica hipocrómica resistente al hierro (87). La deficiencia de cobre y zinc son el resultado de la pérdida de proteínas de unión a metales por la orina (88). Se ha reportado que el aumento en la tendencia a trombosis en pacientes nefróticos incluye una serie de factores, entre los que se encuentra la deficiencia de antitrombina III la cual se pierde en la orina, así como aumento de la agregación plaquetaria (89). Algunos pacientes desarrollan además una severa deficiencia de IgGs (90).

El síndrome nefrótico puede ser inducido experimentalmente inyectando suero antirriñón, daunomicina o por el aminonucleósido de puromicina (ANP). Este último es el compuesto más empleado, dado que en la rata produce alteraciones típicas de la enfermedad de los cambios mínimos del humano (proteinuria aguda no urémica), después de la aplicación de una sola dosis subcutánea de alrededor de 15 mg/ 100 g de peso (91) y nefrosis crónica (proteinuria persistente no urémica), con la aplicación de dosis subcutáneas repetidas de ANP de alrededor de 1-5 mg/ 100 g de peso (92). 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 horas (93). Otros autores indican que casi el 90% se excreta en orina en 8 horas y de este entre el 60-90% se elimina en la primera hora (94). Se ha visto que el ANP conduce a la pérdida de los procesos podocíticos, los cuales están asociados con una reducción en la carga iónica y a la proteinuria (95,96).

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 peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iones superóxido (O_2^*) e hidroxilo (OH), que son productos del metabolismo del ANP (97).

EL OLFATO, LAS FEROMONAS Y EL ÓRGANO VOMERONASAL

Algunos autores afirman que el sentido del olfato es fenotípicamente conservado, ya que sus precursores pueden ser encontrados en organismos celulares muy primitivos, lo cual refleja la necesidad de todos los organismos para sentir el ambiente químico (98). En los mamíferos, el sistema olfativo puede detectar y distinguir una gran variedad de químicos volátiles con una gran diversidad de estructuras químicas (99,100). Así, este sistema también responde o es sensible a las feromonas, compuestos químicos liberados por los animales y los cuales actúan co-específicamente para regular las poblaciones animales y sus interacciones sociales (100,101). Estudios tanto en insectos como en mamífero sugieren que la forma en la que el sistema olfativo distingue un olor general y el estímulo vía feromonas es a través de diferentes neuronas sensitivas, así como otras rutas neuronales en el cerebro (Fig. 10B) (102-104). El descubrimiento de familias multigénicas que codifican receptores olfativos han provisto de herramientas con las cuales se ha explorado este proceso tanto en vertebrados como en invertebrados (105-110)

Los mamíferos pueden distinguir entre una enorme diversidad de sustancias odorantes que varían en tamaño, forma, grupos funcionales y cargas (99). En contraste, pocas feromonas secretadas por mamíferos se han identificado, aunque se han descrito muchos de los efectos de estos compuestos en la orina u otras secreciones corporales (102,103,111,112). En los roedores, estos efectos incluyen el estereotipo del macho y la conducta de apareamiento de la hembra, el comportamiento agresivo del macho, o bien la de las hembras lactantes hacia machos intrusos, la inhibición del ciclo estral y el retraso de la pubertad en las hembras. Un efecto contrario a los ya mencionados es la terminación del embarazo causado por la exposición de una hembra a un macho que

generalmente es diferente al macho inseminador (el efecto Bruce). En el efecto Bruce, al parecer el estímulo de las feromonas puede estar acoplado con la detección de señales individuales que resultan de variaciones genéticas dentro una especie, incluyendo diferencias en el sitio mayor de histocompatibilidad (113).

En los mamíferos, los olores son detectados en el epitelio olfativo (EO) que conecta la cavidad nasal (100). Las señales generadas en las neuronas sensoriales olfativas en el EO en respuesta a olores son transmitidos a través del bulbo olfativo principal (BOP) a la corteza olfativa (CO) y de ahí a otras regiones del cerebro. Por esta vía, las señales de los olores alcanzan áreas corticales mayores involucradas en la percepción de la conciencia de los olores, así como áreas límbicas, tales como la amígdala y el hipotálamo, que están involucradas en respuestas emocionales y motivacionales (114).

Muchos de los mamíferos tienen un segundo órgano sensorial olfativo llamado el órgano vomeronasal (OVN). El OVN (Fig. 10A), una estructura tubular en el septum nasal que está conectado a la cavidad nasal por un ducto pequeño. La eliminación del OVN o el daño en la conexión al cerebro, interfiere con los efectos de las feromonas pero no con el sentido general hacia los olores (113). Aunque algunas feromonas pueden ser detectadas en el EO (114), estas observaciones sugieren que el OVN podría estar especializado para detectar feromonas (102,103,112). Las neuronas sensoriales en el OVN están conectadas al bulbo accesorio olfativo (BAO). De ahí, las señales son transmitidas a las áreas de la amígdala y el hipotálamo, quienes han sido implicados en ciertos efectos de las feromonas (113).

La detección inicial del estímulo olfativo está mediado por tres familias distintas de receptores olfativos, cada uno codificado por una familia de multigenes . Una familia de 1000 genes codifica los receptores de los olores (ROs) en el EO (106), esto es, aproximadamente el 1% del genoma, lo que significa que por mucho es la más grande identificada en el genoma de cualquier especie. Los ROs son miembros de la superfamilia de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G (RAPG) (113). Son extremadamente diversos en su secuencia de aminoácidos, lo que es

consistente con su capacidad para reconocer una amplia variedad olores con diversas estructuras (105,106,114-116).

Las otras dos familias de receptores olfativos se expresan en el OVN: la familia V1R, con cerca de 35 miembros (112), y la familia V2R, con cerca de 150 miembros (118-120). No se han identificado ligandos para V1Rs o V2Rs; sin embargo, dada su expresión en el OVN, son considerados como receptores candidato para las feromonas. Por otro lado, como los ROs, V1RS y V2Rs forman parte de la superfamilia RAPG y los miembros de las dos familias VR son diversos sugiere que éstos podrían reconocer diferentes ligandos (113).

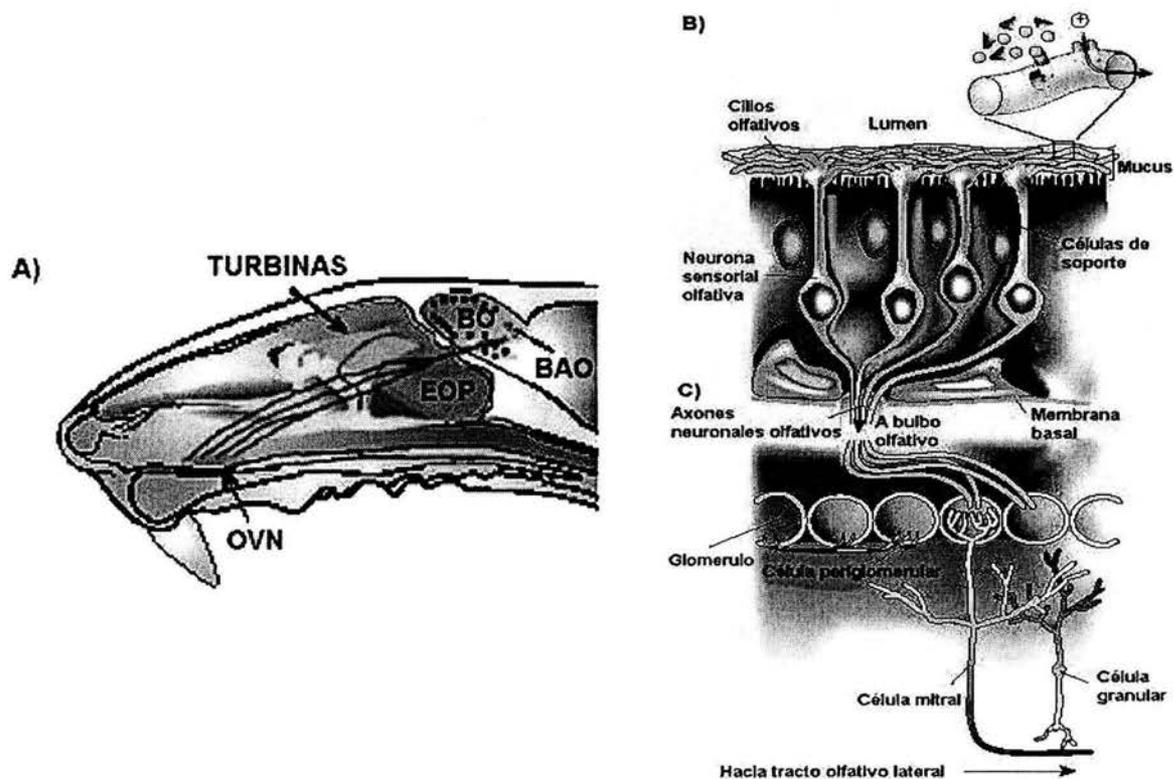


Figura 10. Anatomía y estructura funcional del sistema olfativo. A) se muestra el epitelio olfativo principal de la rata (EOP), así como las turbinas que son un grupo de ondulaciones cartilaginosas. En B las células del EOP envían su señal a través de axones hacia el bulbo olfativo (BO). En el órgano vomeronasal (OVN) se encuentra en el bulbo accesorio olfativo (BAO). Imagen tomada de Firestein S (121).

FUNCIÓN REPRODUCTIVA Y SÍNDROME NEFRÓTICO

Existen numerosos padecimientos que cursan con anomalías endocrino-reproductivas, entre las que se encuentran la diabetes mellitus, el lupus eritematoso, la insuficiencia renal y el síndrome nefrótico. Particularmente, la insuficiencia renal y el síndrome nefrótico se han asociado con infertilidad y disfunción endocrina. En este sentido, hasta 1992 sólo se habían reportado dos trabajos en ratas macho relacionados con la función reproductiva y el síndrome nefrótico y cuyos resultados eran controversiales. Así, por un lado Glass y cols (122) informaron la presencia de hipogonadismo-hipogonadotrópico mientras que Elias y cols (123) encontraron hipogonadismo con niveles elevados de LH (hipogonadismo-hipergonadotrópico).

No fue sino hasta mediados de los 90s que nuestro grupo incursionó en esta línea de investigación explorando en primer instancia los trastornos endocrino-reproductivos en la rata hembra con síndrome nefrótico agudo, encontrando que existe una clara disfunción endocrino-reproductiva que se caracteriza por: pérdida del ciclo estral, atresia folicular, bajos niveles circulantes de LH y valores indetectables de estradiol (124). En este contexto y siguiendo el mismo modelo experimental, se evaluó el efecto del síndrome nefrótico en fase aguda sobre la capacidad reproductiva en animales de ambos sexos encontrando que la fertilidad se pierde totalmente en la rata hembra y disminuye significativamente en la rata macho (125).

Por otra parte, tomando en cuenta que el síndrome nefrótico puede presentarse de forma crónica con las características propias de la glomérulo esclerosis focal y segmentaria (FSGS) en humanos, nuestro grupo determinó las alteraciones endocrinas en el estado crónico del síndrome nefrótico, encontrando que la rata macho con síndrome nefrótico crónico desarrolla disfunción endocrina caracterizada por hipogonadismo, fallas en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo y alteraciones sobre la capacidad reproductiva (126). Del mismo modo, la rata hembra con nefrosis crónica presenta alteraciones en los niveles hormonales, hipogonadismo especialmente niveles indetectables de estradiol y bajas concentraciones de LH, así

como disminución de la fertilidad y del número de crías por camada. Interesantemente, se observó que la fertilidad se recupera parcialmente tras el estímulo de feromonas del macho fértil (127).

Las ratas macho nefróticas muestran fallas en la respuesta hipofisiaria a estímulos con LHRH en términos de secreción de LH y FSH. Por el contrario la respuesta testicular al estímulo con hCG es normal en términos de la síntesis de testosterona y nula en términos de la síntesis de estradiol (128). Siguiendo este mismo modelo experimental para rata hembra, se descubrió que la hipófisis no responde adecuadamente y que persisten los niveles indetectables de estradiol. Además se determinó que la actividad biológica de la FSH es prácticamente nula (129).

En un trabajo posterior y considerando el dimorfismo existente entre hembras y machos, se evaluó la esteroidogénesis testicular en animales nefróticos a través de la expresión génica de la enzima P450scc y de la proteína StAR, encontrándose que no existe expresión del ARNm de la enzima P450scc en testículo al día 10 y que no responde al estímulo con hCG. De la misma manera, se encontró que no hay expresión del gen de la proteína StAR en fase aguda, pero que incrementa su expresión después del estímulo con una dosis de hCG (8 U.I) (130).

Finalmente, nuestro grupo ha iniciado la evaluación de la función endocrina en pacientes nefróticos del sexo masculino. Los resultados preliminares de dichos estudios muestran fallas en la liberación de LH y FSH hipofisarias después del estímulo con LHRH, así como bajos niveles de testosterona y estradiol. Además se determinó que la actividad biológica tanto de LH como de FSH, encontrando que esta disminuida significativamente en los pacientes nefróticos (131, 132).

Los hallazgos de esta línea de investigación a la fecha, así como los esperados de la presente propuesta pretenden ampliar los conocimientos de la función endocrino-reproductiva en el síndrome nefrótico. Con el fin de hacer un planteamiento terapéutico para los pacientes nefróticos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los hallazgos de investigaciones previas, descritos en el capítulo anterior, establecen de manera clara la existencia de disfunción endocrina asociada al síndrome nefrótico de la rata hembra. Entre estos hallazgos se encuentran: disminución de las concentraciones de esteroides sexuales, falla del ciclo estral, atresia folicular, infertilidad y disminución del número de crías por camada, los cuales señalan la existencia de falla ovárica en el síndrome nefrótico. Adicionalmente, los resultados que muestran que en la rata hembra con síndrome nefrótico en estado crónico, la presencia del macho o su orina ejercen un efecto positivo sobre la síntesis de estradiol, brindan el soporte necesario para plantear la importancia de evaluar la función del ovario en el síndrome nefrótico experimental. Así, para avanzar en el conocimiento de las anomalías endocrino-reproductivas presentes en el síndrome nefrótico y particularmente en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la patogénesis de las alteraciones gonadales asociadas al síndrome nefrótico, se plantea evaluar la expresión de los dos componentes esteroideogénicos básicos, la enzima P450_{scc} y la proteína StAR en tres condiciones: A) en fase aguda, B) después de una prueba dinámica con hCG y C) posterior al estímulo con de feromonas. Los resultados de este estudio darán cuenta del estado de la función ovárica en el síndrome nefrótico así como de la existencia de un eje órgano-vomeronasal-hipotálamo-hipófisis-ovario activo en la rata nefrótica.

3

HIPÓTESIS

La existencia de un daño específico en la función del ovario durante el síndrome nefrótico, principalmente se asocia al nivel de la expresión de las enzimas esteroidogénicas P450scc y la proteína StAR, lo que consecuentemente provoca una alteración en la síntesis de esteroides sexuales.

4

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la función ovárica en base a la expresión del ARNm de la enzima P450scc, así como la expresión del ARNm de la proteína StAR en la rata con síndrome nefrótico agudo.

Objetivos particulares

Previa confirmación de la presencia de hipogonadismo en la rata con síndrome nefrótico agudo, la función ovárica se evaluará en base a expresión de los ARNm de la enzima P450scc y de la proteína StAR

1. En la rata hembra con síndrome nefrótico experimental en etapa aguda (día 10).
2. En la rata hembra con síndrome nefrótico experimental bajo estímulo con hCG.
3. En la rata hembra con síndrome nefrótico experimental bajo el estímulo de las feromonas (presencia del macho fértil o su orina).

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El síndrome nefrótico se indujo en la rata hembra mediante la administración de una dosis de 15 mg/ 100 g de peso de aminonucleósido de puromicina [6-dimetilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi- β -D-ribofuronil) purina] (ANP), vía subcutánea. Las ratas controles recibieron una dosis de vehículo (solución salina al 85%). A cada rata se le monitoreo diariamente el ciclo estral. El día previo a cada fecha de estudio las ratas se mantuvieron en cajas metabólicas para recolectar la orina de 24 h. Los animales se decapitaron al día 10 del síndrome nefrótico. Se recolectaron muestras de sangre para obtener sueros, los cuales se mantuvieron a -20 °C hasta la realización de las determinaciones bioquímicas y hormonales. Los ovarios de cada animal se retiraron, se limpiaron y se congelaron a -70 °C hasta su uso en la valoración del ARNm.

Tal como se mencionó anteriormente, el estudio de la función ovárica en el síndrome nefrótico se realizó con base a las siguientes mediciones: determinaciones bioquímicas, monitoreo del ciclo estral, determinaciones hormonales, expresión del ARNm de la P450scc y la proteína StAR. Estas determinaciones se realizaron en 3 etapas:

Etapa 1. Función ovárica durante la fase aguda del síndrome nefrótico. Considerando que el síndrome nefrótico experimental se instala entre el día 7 al 10 postratamiento con ANP (133), se evaluó la función ovárica empleando 6 grupos de animales (n=4) nefróticos y controles, en tres diferentes experimentos, los cuales se sacrificaron al día 10.

Etapa 2. En esta etapa se tomó ventaja de la aplicación de una prueba dinámica con hCG con la cual se determinó adicionalmente la funcionalidad del receptor para gonadotropinas en el ovario nefrótico. Se evaluó la función ovárica al día 10 después del tratamiento con ANP. El estímulo con hCG se aplicó en dosis diarias de 8 U.I vía

subcutánea (sc) entre los días 7 y 10. Se solicitaron 6 grupos de animales (n=4), nefróticos y controles, en tres diferentes experimentos, los cuales se sacrificaron al día 10.

Etapa 3. Esta etapa permitió determinar el efecto específico de moléculas volátiles como las feromonas presentes en el macho y excretadas vía urinaria sobre la función del ovario.

- A. Presencia del macho fértil. Se evaluó la función ovárica al día 10 después de la administración de ANP. A cada rata hembra se le colocó en una caja en presencia de un macho fértil, el cual permaneció ahí desde el inicio del estudio (día 0) hasta la fecha de sacrificio de la rata hembra.
- B. Orina del macho fértil. Se evaluó la función ovárica al día 10 después de la administración de ANP. La orina de 24 h de un macho fértil se aplicó diariamente a cada una de las cajas de las hembras nefróticas o controles desde el inicio del estudio (día 0) y se aplicó hasta las fechas de sacrificio.

Reactivos

El ANP se compró de la compañía Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La gonadotropina coriónica en la presentación de gonadotrotyl-c (hCG, 2000 U/mL), se adquirió de la compañía Hoechst Marion Roussel (México, D.F.).

Animales

Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar adultas de 230-280 g de peso, mantenidas en ciclos de 14 h luz y 10 h oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Solo se utilizaron en el estudio hembras que mostraron al menos dos ciclos estrales normales previos a la inducción del síndrome nefrótico.

Monitoreo del ciclo estral

El ciclo ovulatorio se registró de la misma manera como se ha reportado anteriormente (119), mediante el examen del frotis vaginal de cada rata nefrótica o control,

diariamente durante por lo menos dos ciclos previos a la administración del ANP y durante los 10 días del estudio. Se considera que el ciclo estral normal consta de cuatro etapas, diestro 1, diestro 2, proestro y estro (125).

Determinaciones bioquímicas

Para constatar la presencia del síndrome nefrótico y evaluar la función renal en las ratas seleccionadas, se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas: colesterol, proteínas totales, así como proteínas totales en orina. Todas las determinaciones se realizaron por métodos espectrofotométricos convencionales (135) (ver anexos).

Determinación del estrés oxidativo

Para determinar que el ANP daña específicamente al riñón y no tiene efecto sobre la gónada. Se evaluó el estrés oxidativo en riñón y ovario en base a la determinación de proteínas oxidadas (ver anexos). Adicionalmente se valoró el daño oxidativo en hígado y la glándula suprarrenal.

Determinaciones hormonales

Las hormonas esteroides progesterona, testosterona y estradiol, se determinaron por RIA en fase sólida (ver anexos), usando estuches comerciales adquiridos de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA). Se emplearon también controles de calidad internos preparados en el laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, unidad de investigación, en base a sueros de ratas castradas, así como de hembras en las diferentes fases del ciclo estral.

Preparación de las sondas de la P450scc y la proteína StAR

La sonda de la P450scc fue preparada y probada en base a un juego de oligonucleótidos diseñados por nuestro grupo tomando la secuencia publicada por OonK y cols (137). La sonda para el ARNm StAR (631 pb) fue preparada por medio de

RT-PCR (ver anexo) con base a un juego de oligonucleótidos diseñados por nuestro grupo de trabajo tomando la secuencia obtenida del Genbank número de adquisición NM0315581 (rat StAR mRNA). La sonda de la ciclofilina fue amablemente donada por el Dr. Felipe Vilchis del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”.

Expresión del ARNm de P450scc y proteína StAR.

La evaluación del ARNm de la P450scc se realizó por medio de ensayos de hibridación tipo “Northern-blot”. La obtención de RNA total se efectuó por el método de isotiocianato de guanidina (135) (ver anexos). El ARN se separó en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, el cual permitió el monitorear la separación del ARN (ver anexos) y se transfirieron a membranas de nylon embebidas con nitrocelulosa por fuerza capilar (136). Posteriormente, se emplearon las sondas, arriba descritas, de la P450scc y la proteína StAR (ver anexos), para su hibridación posterior habiendo sido marcadas con [α - 32 P]-dCTP mediante estuches de Invitrogen Life Technologies (RadPrime DNA Labeling System) (ver anexos). Después de la hibridación las membranas fueron expuestas a placas de rayos X para su lectura y procesamiento de imagen.

Diseño de Oligonucleótidos:

rP450scc : nucleótido sentido	5' ATG CTG GCA AAA GGT CTT TGC 3'
nucleótido antisentido	5' CCT GTA AAT GGG GCC ATA CTT 3'
rStAR. nucleótido sentido	5' GGG CAT ACT CAA CAA CCA GGA AGG C 3'
nucleótido antisentido	5' CCA ATG GCG TGC AGG TAG ATG GG 3'

Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones bioquímicas, proteínas oxidadas y hormonales de los diferentes grupos de ratas con síndrome nefrótico y controles, se compararon empleando la prueba de “t” de Student no pareada o mediante ANOVA de una vía usando el programa estadístico Graph Pad Prism (versión 3; Graph Pad Software Inc, San Diego, CA).

RESULTADOS

Determinación de proteínas oxidadas

Se elaboraron 2 pruebas independientes de la determinación de proteínas oxidadas, con una n total de 4 ratas por grupo en cada ensayo, mostrando reproducibilidad ambos experimentos. En la figura 11 solo se observa un incremento significativo de 1.2 veces de proteínas oxidadas en el riñón de las ratas nefróticas comparado con su control, mientras que en el resto de los órganos evaluados tanto en el grupo control como el nefrótico, tienen cantidades similares de proteínas oxidadas.

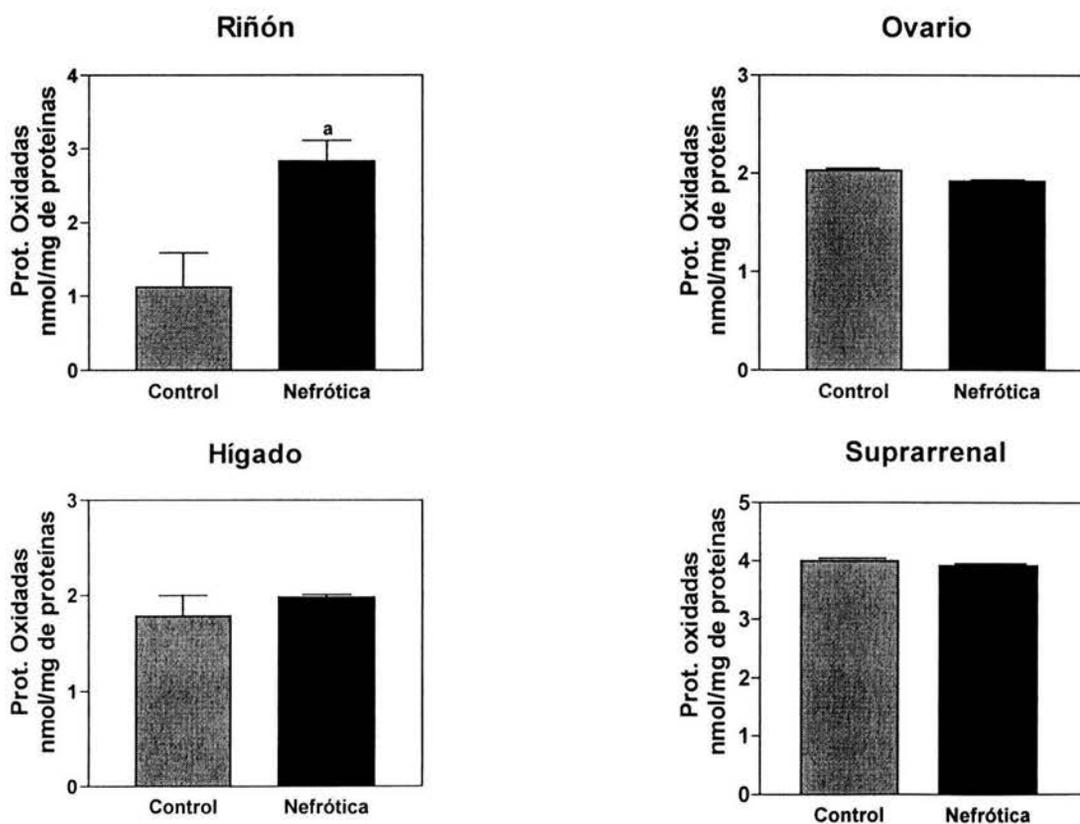


Figura 11. Proteínas oxidadas en riñón, ovario, hígado y glándula suprarrenal de ratas nefróticas y ratas control. Valores expresados como valor promedio \pm EE, $n = 4$, ^a $P < 0.05$ vs. control.

EVALUACIÓN DE LA ETAPA 1 Y ETAPA 2

Los resultados que se presentan a continuación son producto de tres experimentos con una n total de 4 ratas hembra por grupo y los cuales corresponde a la evaluación de las etapas 1 y 2 de este trabajo.

Determinaciones bioquímicas de la etapa 1 y etapa 2

En la figura 12 se muestra la concentración de proteínas en orina al día 10 en las ratas control y con síndrome nefrótico estimuladas con una y cuatro dosis de hCG, en la que hay una tendencia a la mejoría en la proteinuria en las ratas nefróticas después de los estímulos con hCG. Sin embargo, no hay una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo nefrótico al día 10 después de la administración de ANP. Así, el incremento en la excreción de proteínas con respecto al grupo control en los animales con síndrome nefrótico al día 10 después de la administración de ANP y en las ratas nefróticas estimuladas con una o cuatro dosis de hCG fue de 167, 137 y 110 respectivamente.

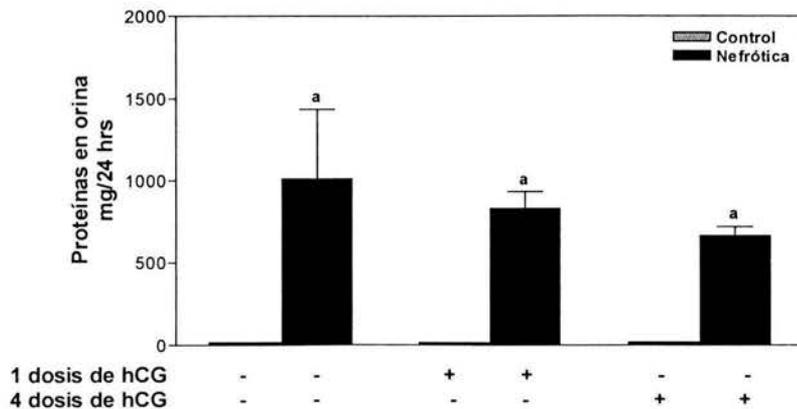


Figura 12. Proteínas en orina al día 10 después de la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, basal y con estímulo una y cuatro dosis de hCG. Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control.

Por otro lado, los niveles de colesterol en las ratas con síndrome nefrótico están significativamente elevados (Fig. 13); sin embargo, se observó una tendencia a la disminución con el tratamiento con una y cuatro dosis de hCG en los animales nefróticos, no obstante el decremento no es estadísticamente significativo con respecto a la concentración de colesterol de los animales nefróticos al día 10 después de la administración de ANP. El incremento en los niveles de colesterol en los animales nefróticos al día 10 después de la administración de ANP y posterior al estímulo con una o cuatro dosis de hCG fue de 8, 7 y 6 veces con respecto al grupo control.

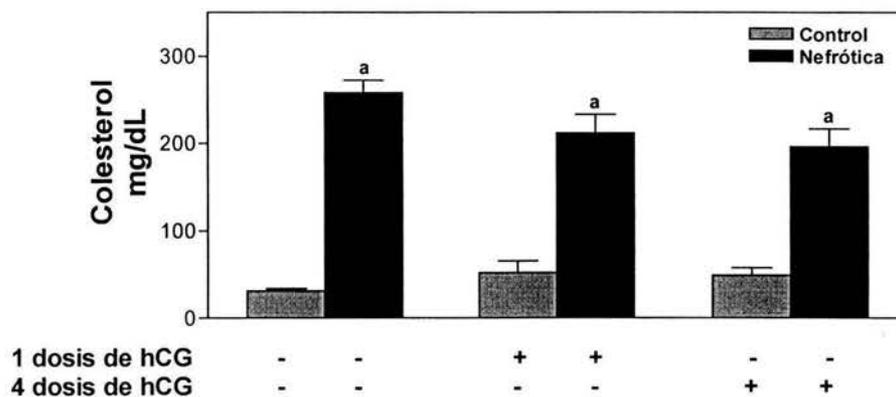


Figura 13. Concentración de colesterol en suero al día 10 posterior a la administración del ANP en ratas hembra control y nefróticas, basal o con una o cuatro dosis de hCG. Valores expresados como promedio \pm EE. * $P < 0.05$ vs. control.

En la figura 14A se puede observar que las concentraciones de proteínas en suero en las ratas nefróticas se mantienen significativamente bajas, 0.3 veces en comparación con el grupo control, de igual manera, en los animales con síndrome nefrótico que recibieron una o cuatro dosis de hCG también existió una baja estadísticamente significativa de 0.2 y 0.4 veces con respecto a su grupo control. La relación de proteínas en suero/proteínas en orina (Fig 14B), que indica la existencia de mejoría en los niveles de proteínas en suero como consecuencia de la disminución en la proteinuria, muestra no hay un cambio en dicha relación en los animales nefróticos al día 10 después de la administración del ANP, así como en las ratas nefróticas estimuladas con una o cuatro dosis de hCG comparado con sus respectivos grupo control.

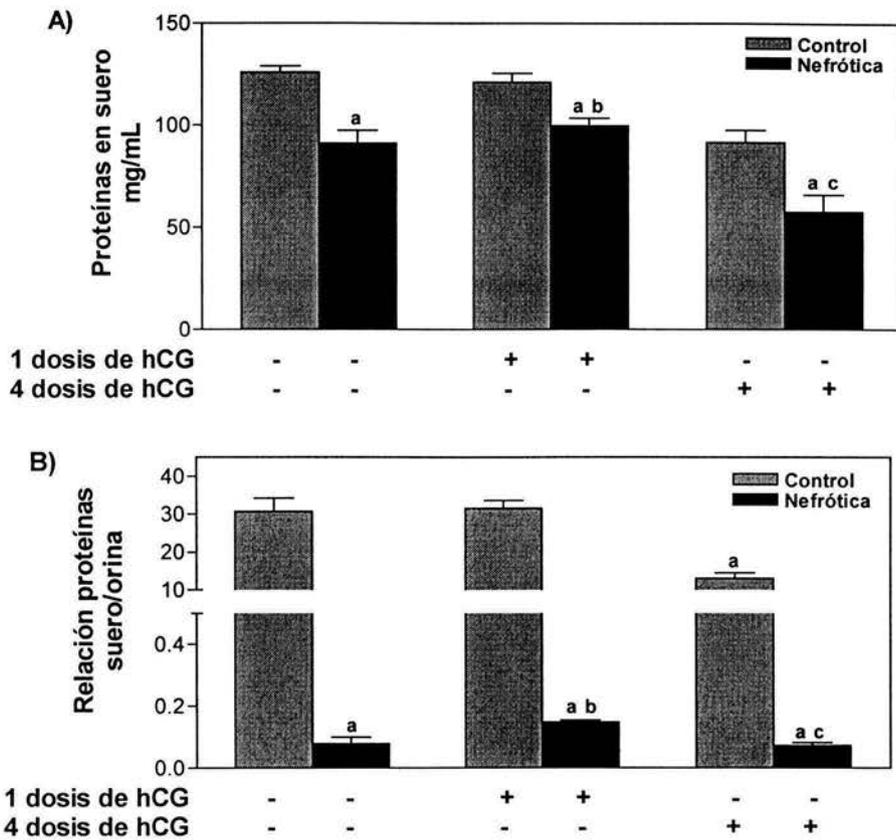


Figura 14. A) Concentración de proteínas en suero al día 10 después de la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, basal o una o cuatro dosis de hCG. B) Relación proteínas en suero/proteínas en orina. Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. control + 1hCG, ^c $P < 0.05$ vs. control + 4hCG.

Ciclo estral de la etapa 1 y etapa 2

El ciclo estral de la rata se evaluó por frotis vaginales diariamente antes y después de la inducción del síndrome nefrótico con ANP y tras los estímulos de una y cuatro dosis de hCG. El análisis muestra que las ratas hembra con síndrome nefrótico pierden el ciclo estral estableciéndose en la fase de diestro y no se restablece después de los estímulos con hCG (ver figura 15 A, B y C), en tanto que las ratas control se mantuvieron ciclando de manera normal durante toda la fase experimental.

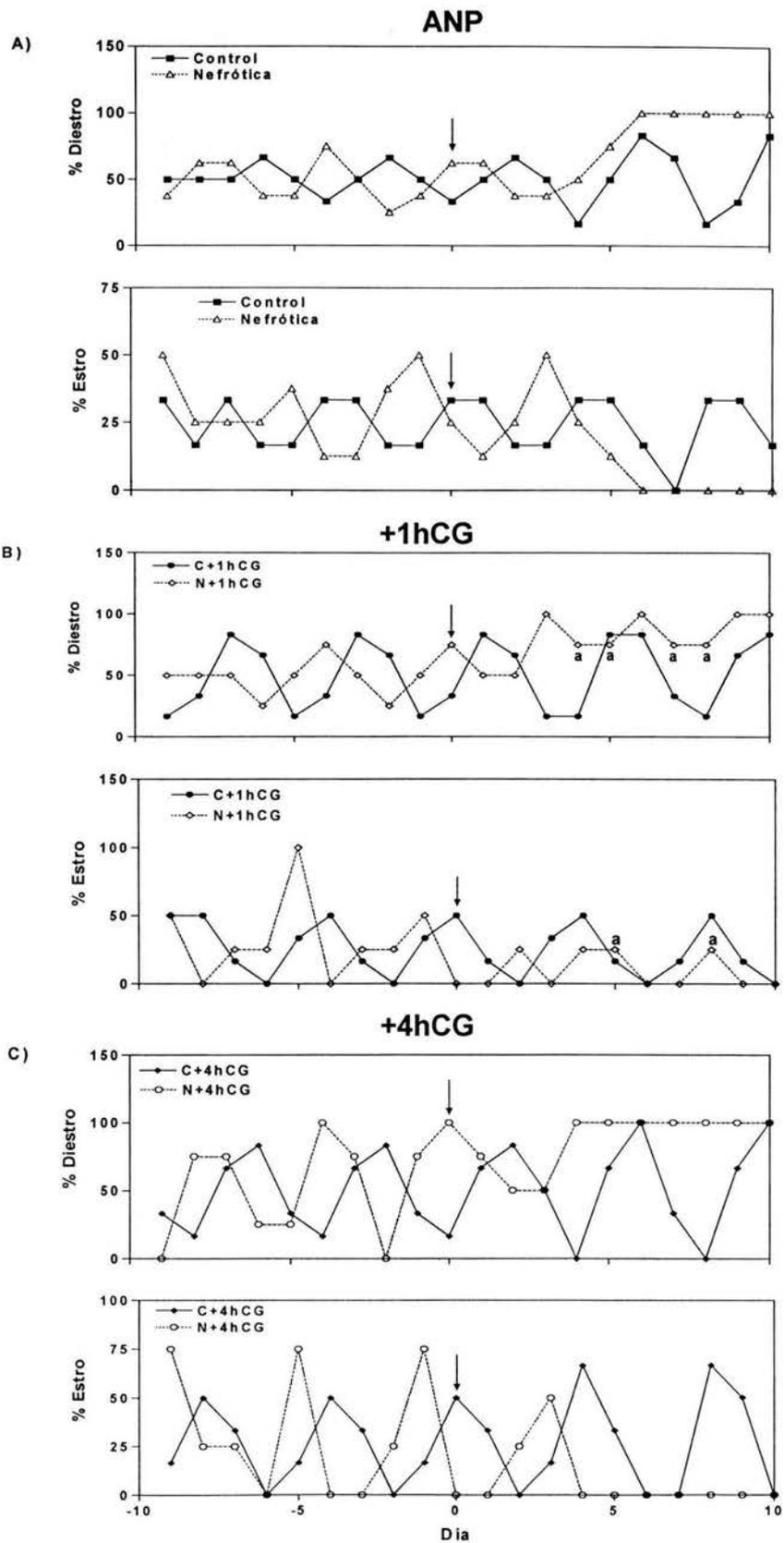


Figura 15. Ciclo estral de la rata hembra: (A) antes y después de la administración de ANP; (B) después del estímulo con una dosis de hCG; (C) después del estímulo con cuatro dosis de hCG. La flecha indica el día de la administración del ANP (día 0). a = frotis vaginal atípico.

Perfil hormonal de la etapa 1 y etapa 2

Los niveles de progesterona en suero al día 10 se presentan en la Fig. 16. En los animales con síndrome nefrótico la concentración de esta hormona disminuye significativamente (3.7 veces) con respecto al grupo control, del mismo modo las ratas con síndrome nefrótico estimulados con una o cuatro dosis de hCG mostraron un decremento en los niveles de progesterona de 6.4 y 4.0 veces en relación al grupo control. Sin embargo, hay una tendencia a incrementarse después del estímulo con una y cuatro dosis de hCG, pero el aumento no es estadísticamente significativo comparado con el grupo nefrótico al día 10 posterior a la administración de ANP. Por el contrario, el grupo control administrado con una dosis de hCG si responde al estímulo, incrementando sus niveles de progesterona significativamente con respecto al grupo control.

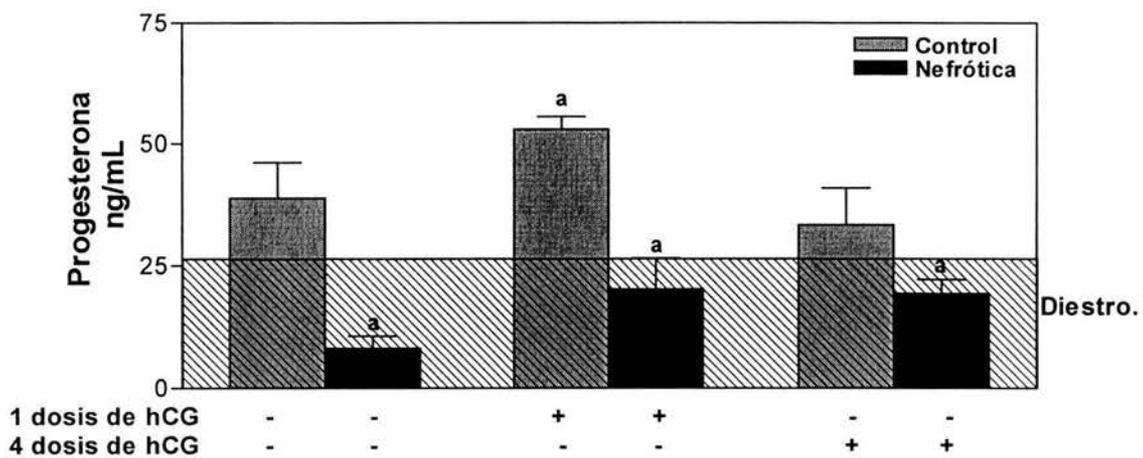


Figura 16. Concentraciones de progesterona en el suero al día 10 después de la administración de ANP en ratas control o nefróticas, sin o con estímulo con uno o cuatro dosis de hCG. Los valores normales de progesterona en la fase de diestro: 10 – 26 ng/mL. Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control.

En la figura 17 se muestra el efecto que tiene el síndrome nefrótico sobre los niveles circulantes de testosterona en suero de la rata. Aquí que las concentraciones del esteroide disminuyen significativamente en el grupo nefrótico (2.0 veces), aunque tienden a incrementarse después del estímulo con una o cuatro dosis de hCG.

Particularmente, cuando se administraron a las ratas con síndrome nefrótico con cuatro dosis de hCG los niveles de testosterona se elevaron de manera significativa unas 8 veces con respecto a las ratas nefróticas y al grupo control al día 10 después de la administración de ANP. De la misma manera, el grupo control estimulado con cuatro dosis de hCG los niveles de este andrógeno también se incrementaron significativamente unas 8 veces comparado con el control al día 10 posterior al estímulo con ANP.

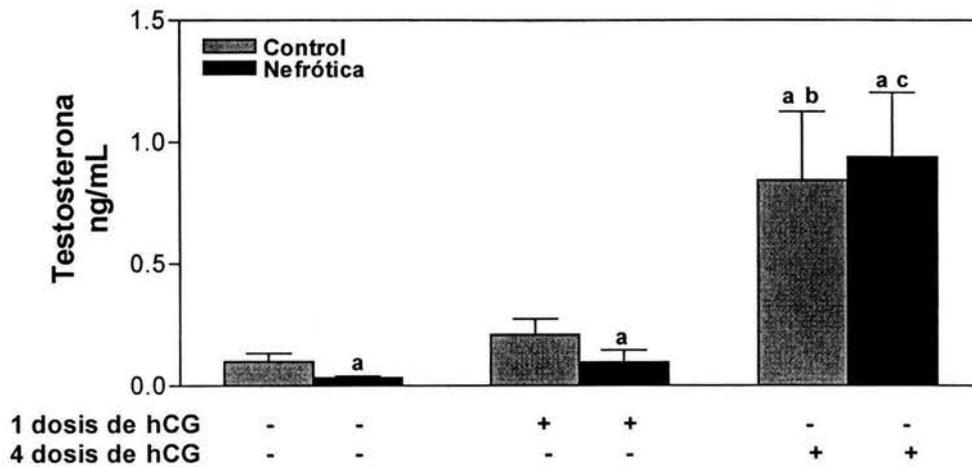


Figura 17. Concentraciones de testosterona en suero al día 10 después de la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, sin o con estímulo una o cuatro dosis de hCG. Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. control + 1hCG, ^c $P < 0.05$ vs. nefrótica.

En cuanto a los niveles circulantes de estradiol al día 10 después de la administración de ANP (Fig. 18) en las ratas control que recibieron los estímulos con la hCG (una o cuatro dosis), hubo un aumento significativo en los niveles de estradiol. Por el contrario, en el grupo nefrótico los niveles del estradiol son indetectables aún después del estímulo con la hCG.

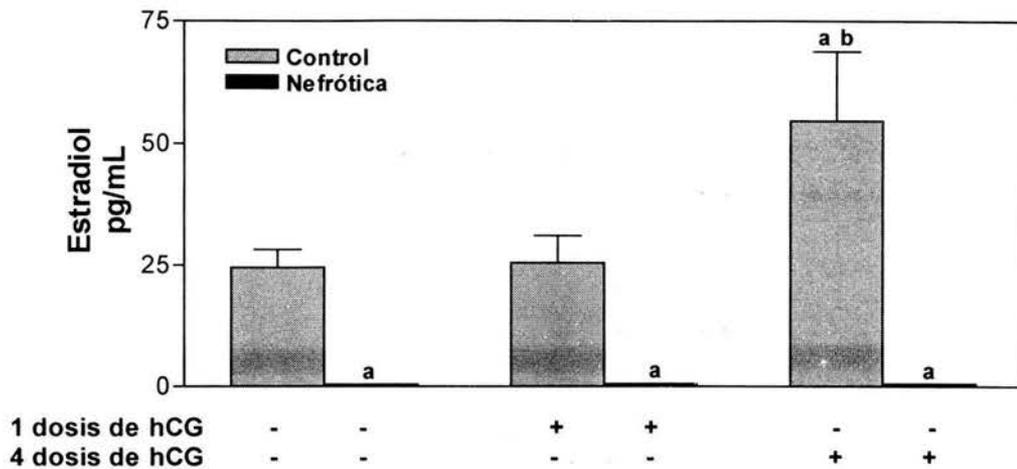


Figura 18. Concentraciones de estradiol circulante en suero al día 10 posterior a la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, sin o con estímulo una o cuatro dosis de hCG. Valores normales de estradiol en la fase de diestro: 10 – 20 pg/mL. Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. control + 1hCG.

Expresión del gen de la enzima P450scc en la etapa 1 y etapa 2

La figura 19 presenta el análisis por “Northern blot” y el análisis densitométrico de la expresión del ARNm de la enzima P450scc en los ovarios de ratas hembra control y con síndrome nefrótico tratadas con hCG, en la que se observa que la expresión del gen está significativamente disminuida en el estado nefrótico; sin embargo, cuando se dio el estímulo con la hCG la expresión del gen se incrementa de manera significativa. El análisis densitométrico (Fig. 19) indica que la expresión del gen de la enzima P450scc en los animales con síndrome nefrótico (sin estimular) disminuyó un 3.4 veces comparada con su grupo control, mientras que los ratas con síndrome nefrótico administradas con una sola dosis de hCG, su expresión se incrementa 3.0 veces comparada con los nefróticos al día 10 después de la administración de ANP, en tanto que aquellas nefróticas que recibieron cuatro dosis de hCG la expresión génica de la enzima P450scc se incrementó 4.2 veces más que los animales con síndrome nefrótico sin estimular.

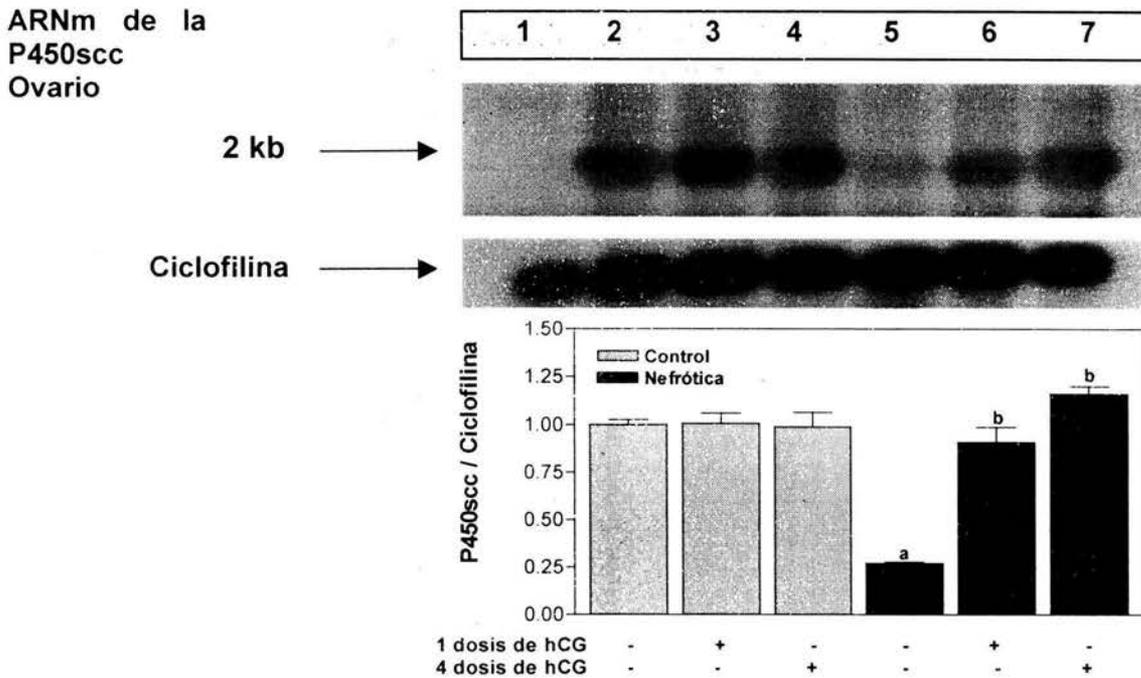


Figura 19. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la enzima esteroideogénica P450scc en el ovario de la rata. Carril (1) hígado (control negativo), carril (2) rata control, carril (3) rata control + 1hCG, carril (4) rata control + 4hCG, carril (5) rata nefrótica, carril (6) rata nefrótica + 1hCG, carril (7) rata nefrótica + 4hCG. La cantidad de ARN total utilizada fue de 10 μ g en cada carril, hibridando con la sonda de ADNc marcada con P^{32} de dicha enzima. Las membranas fueron rehibridadas con la sonda de ciclofilina para utilizarla como control de carga de los ARN. Los niveles de los transcritos de la P450scc en cada condición fueron normalizados con los niveles de los transcritos correspondiente de la ciclofilina. Las muestras utilizadas para el análisis provienen de ratas que fueron sacrificadas en la fase de diestro. Las muestras utilizadas para el análisis provienen de ratas que fueron sacrificadas en la fase de diestro. ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. nefrótico.

Por otro lado, en la figura 20 se muestra el análisis por "Northern blot" y el análisis densitométrico de la expresión del gen de la enzima P450scc en la glándula suprarrenal en las ratas control y nefróticas al día 10 después de la administración de ANP, así como después de una prueba dinámica con hCG. La densitometría indica que la expresión génica de esta enzima esteroideogénica en los animales estimulados con una o cuatro dosis de hCG no cambia comparado con el grupo control. En tanto, los animales nefróticos al día 10 después de la administración de ANP hay un incremento estadísticamente significativo de 0.4 veces comparado con las ratas control. Por lo que

se refiere a las ratas con síndrome nefrótico estimuladas con una o cuatro dosis de hCG, hay incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo control al día 10 después de la administración de ANP de 0.3 veces en ambos casos

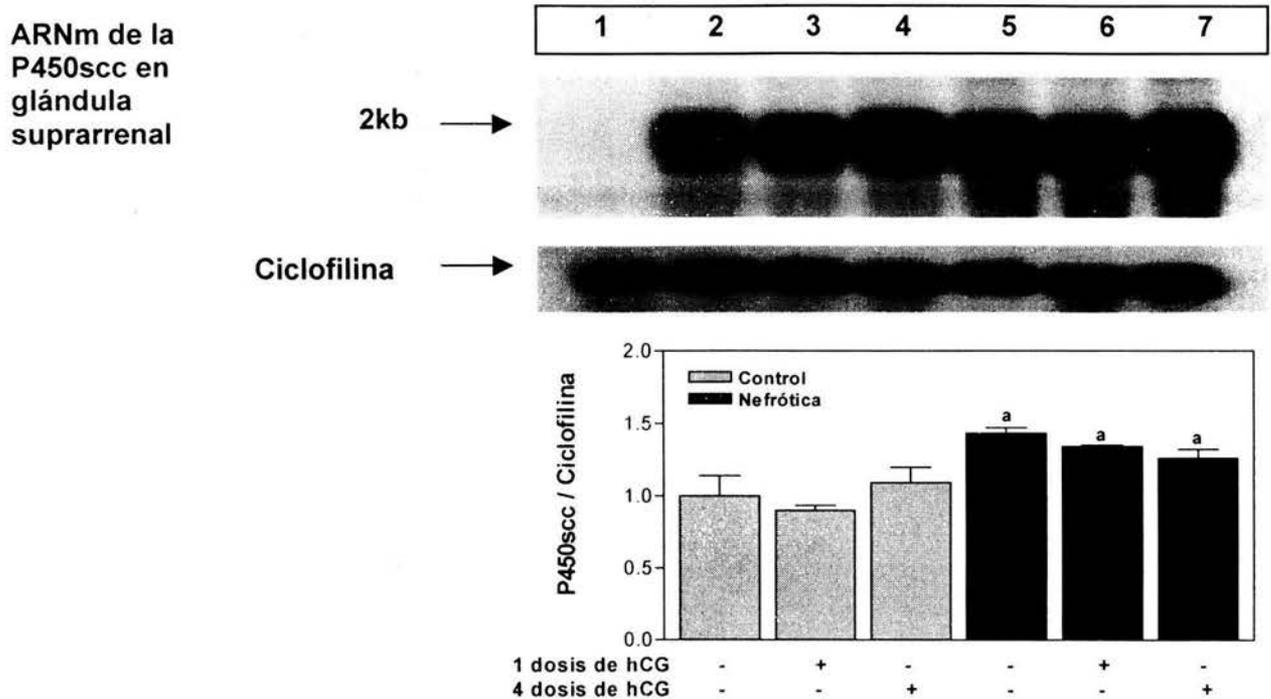


Figura 20. Análisis por “Northern blot” de la expresión del ARNm de la enzima esteroideogénica P450scc en la glándula suprarrenal de la rata. Carril (1) hígado (control negativo), carril (2) rata control, carril (3) rata control + 1hCG, carril (4) rata control + 4hCG, carril (5) rata nefrótica, carril (6) rata nefrótica + 1hCG, carril (7) rata nefrótica + 4hCG. La cantidad de ARN total utilizada fue de 10 µg en cada carril, hibridando con la sonda de ADNc marcada con ³²P de dicha enzima. Las membranas fueron rehibridadas con la sonda de ciclofilina para utilizarla como control de carga de los ARN. Los niveles de los transcritos de la P450scc en cada condición fueron normalizados con los niveles de los transcritos correspondiente de la ciclofilina. Las muestras utilizadas para el análisis provienen de ratas que fueron sacrificadas en la fase de diestro. ^aP < 0.05 vs. control.

Expresión génica de la proteína StAR en la etapa 1 y etapa 2

La figura 21 presenta el análisis por “Northern blot” y el análisis densitométrico de la expresión génica de StAR, transcritos con tamaños de 3.4 y 1.6 kb, en el ovario de las ratas control y con síndrome nefrótico, al día 10 posterior a la administración de ANP y estimuladas con una o cuatro dosis de hCG. El análisis densitométrico muestra que la

expresión del gen la proteína StAR disminuye significativamente (1.2 veces) en las ratas nefróticas al día 10 después de la administración de ANP con respecto al grupo control, en tanto que en las ratas con síndrome nefrótico administradas con una o cuatro dosis de hCG la expresión del gen de la proteína StAR se reduce significativamente 0.7 y 0.8 veces respectivamente comparada con el grupo control al día 10 después de la administración de ANP. Por el contrario, las ratas control estimuladas con una o cuatro dosis de hCG, la expresión del ARNm de la proteína StAR aumenta 0.2 con respecto al grupo control.

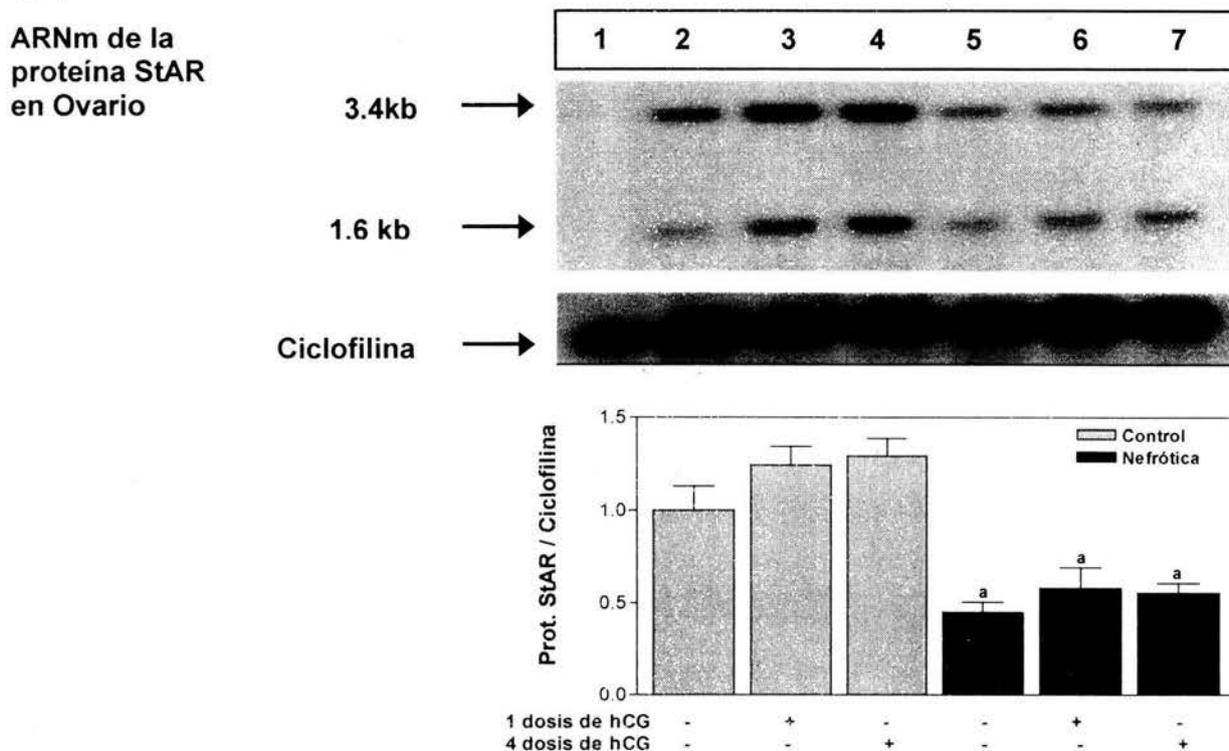


Figura 21. Análisis por "Northern blot" de la expresión del gen de StAR en el ovario de la rata. Carril (1) hígado (control negativo), carril (2) rata control, carril (3) rata control + 1hCG, carril (4) rata control + 4hCG, carril (5) rata nefrótica, carril (6) rata nefrótica + 1hCG, carril (7) rata nefrótica + 4hCG. La cantidad de ARN total utilizada fue de 10 µg en cada carril, hibridando con la sonda de ADNc marcada con ³²P de dicha proteína. Las membranas fueron rehibridadas con la sonda de ciclofilina para utilizarla como control de carga de los ARN. Los niveles de los transcritos de la P450scc en cada condición fueron normalizados con los niveles de los transcritos correspondiente de la ciclofilina. Las muestras utilizadas para el análisis provienen de ratas que fueron sacrificadas en la fase de diestro. Las muestras utilizadas para el análisis provienen de ratas que fueron sacrificadas en la fase de diestro, al día 10 después de la administración de ANP. ^aP < 0.05 vs. control.

En la figura 22 se muestra la determinación de la expresión del gen de la proteína StAR en la glándula suprarrenal por "Northern blot", así como el análisis densitométrico de esta. En ella se observa que la expresión de los ARN mensajeros no cambia en referencia a la expresión génica en el grupo control en los animales que recibieron una o cuatro dosis de hCG. En tanto que en las ratas nefróticas al día 10 hay una elevación significativa de 0.8 veces en la expresión del gen de la proteína StAR, comparada con el grupo control. Sin embargo, las ratas nefróticas estimuladas con una o cuatro dosis de hCG la expresión de los mensajeros de la P450scc no cambian significativamente con respecto al grupo control.

ARNm de la proteína StAR en glándula suprarrenal

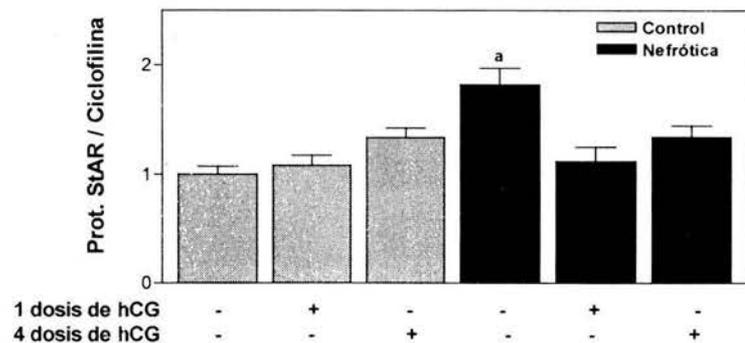
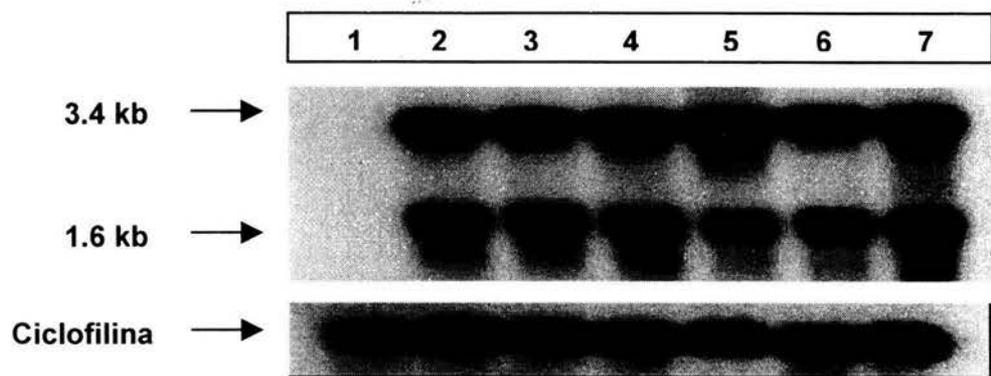


Figura 22. Análisis por "Northern blot" de la expresión del ARNm de la proteína StAR en glándula suprarrenal de la rata. Carril (1) hígado (control negativo), carril (2) rata control, carril (3) rata control + 1hCG, carril (4) rata control + 4hCG, carril (5) rata nefrótica, carril (6) rata nefrótica + 1hCG, carril (7) rata nefrótica + 4hCG. La cantidad de ARN total utilizada fue de 10 µg en cada carril, hibridando con la sonda de ADNc marcada con ³²P de dicha proteína. Las membranas fueron rehibridadas con la sonda de ciclofilina para utilizarla como control de carga de los ARN. Los niveles de los transcritos de la P450scc en cada condición fueron normalizados con los niveles de los transcritos correspondiente de la ciclofilina. Las muestras utilizadas para el análisis provienen de ratas que fueron sacrificadas en la fase de diestro. ^aP < 0.05 vs. control.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS FEROMONAS: ETAPAS 3A Y 3B

Los resultados que se presentan a continuación son producto de tres experimentos con una n total de 4 ratas hembra por grupo, los cuales permitieron evaluar las etapas 3 de este trabajo.

Determinaciones bioquímicas de la etapa 3: A) presencia del macho fértil y B) presencia de la orina del macho fértil

En la figura 23 se muestran las concentraciones de proteínas en orina al día 10 en las ratas control y con síndrome nefrótico, aquellas que fueron estimuladas por la presencia del macho fértil (MF) o la orina del macho fértil (OMF). Se observa un incremento significativo de 80 veces la excreción de proteínas urinarias en los animales nefróticos al día 10 posterior a la administración de ANP, así como en las hembras nefróticas que fueron estimuladas con el MF y la OMF las cuales presentaron un aumento de 50 y 88 veces los niveles de proteína eliminadas por orina comparados con el grupo control.

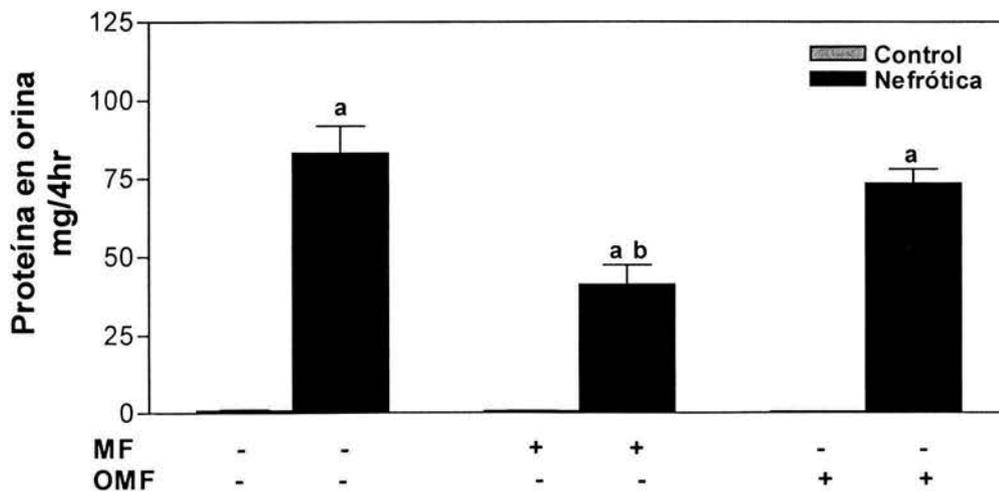


Figura 23. Proteínas en orina al día 10 después de la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, en ausencia o presencia del macho fértil (MF) o de la orina del macho fértil (OMF). Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. Nefrótica.

En tanto que la figura 24 indica que los niveles de colesterol al día 10 después de la administración de ANP, tanto en las ratas nefróticas como en las nefróticas que fueron estimuladas con la presencia del macho fértil o la orina del macho fértil, están significativamente elevados, 5, 4 y 5 veces con respecto al grupo control.

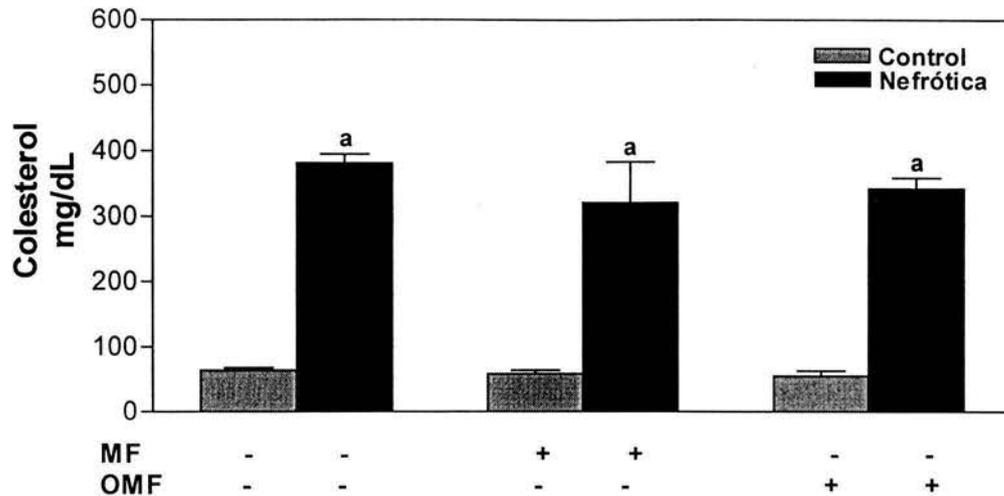


Figura 24. Concentración de colesterol en suero al día 10 después de la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, en ausencia o presencia del macho fértil (MF) o de la orina del macho fértil (OMF). Valores expresados como promedio \pm EE ^aP < 0.05 vs. control.

Por otro lado, en la figura 25A muestra que las concentraciones de proteínas en suero en las ratas nefróticas, nefróticas más el macho fértil y nefróticas más la orina del macho fértil se mantienen significativamente bajas, disminuyendo 0.3, 0.6 y 0.2 veces con respecto a las ratas control.

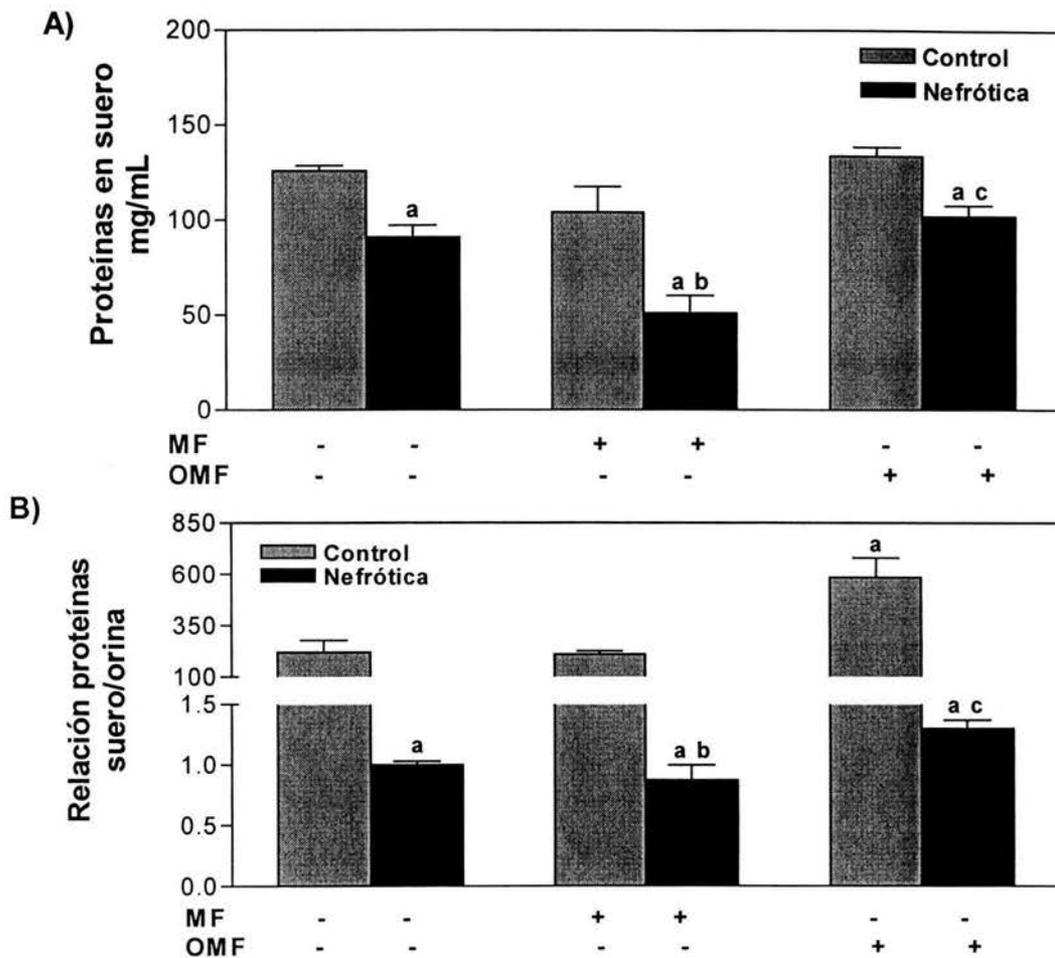


Figura 25. Concentración de proteínas en suero al día 10 posterior a la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, en ausencia o presencia del macho fértil (MF) o de la orina del macho fértil (OMF). Valores expresados como promedio \pm EE ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. control + MF, ^c $P < 0.05$ vs. control + OMF.

Ciclo estral de la etapa 3: A) presencia del macho fértil y B) presencia de la orina del macho fértil

Al igual que en las evaluaciones de la etapas 1 y 2, en las etapas 3A y 3B el ciclo estral de la rata se evaluó a través de frotis vaginales diariamente antes y después de la inducción del síndrome nefrótico con ANP así como tras los estímulos con las feromonas. El análisis muestra que las ratas hembra nefróticas pierden el ciclo estral estableciéndose en la fase de diestro y solo en algunos casos las ratas mostraron fases atípicas (ver figura 26A, B y C), en tanto que las ratas control se mantuvieron ciclando de manera normal durante toda la fase experimental.

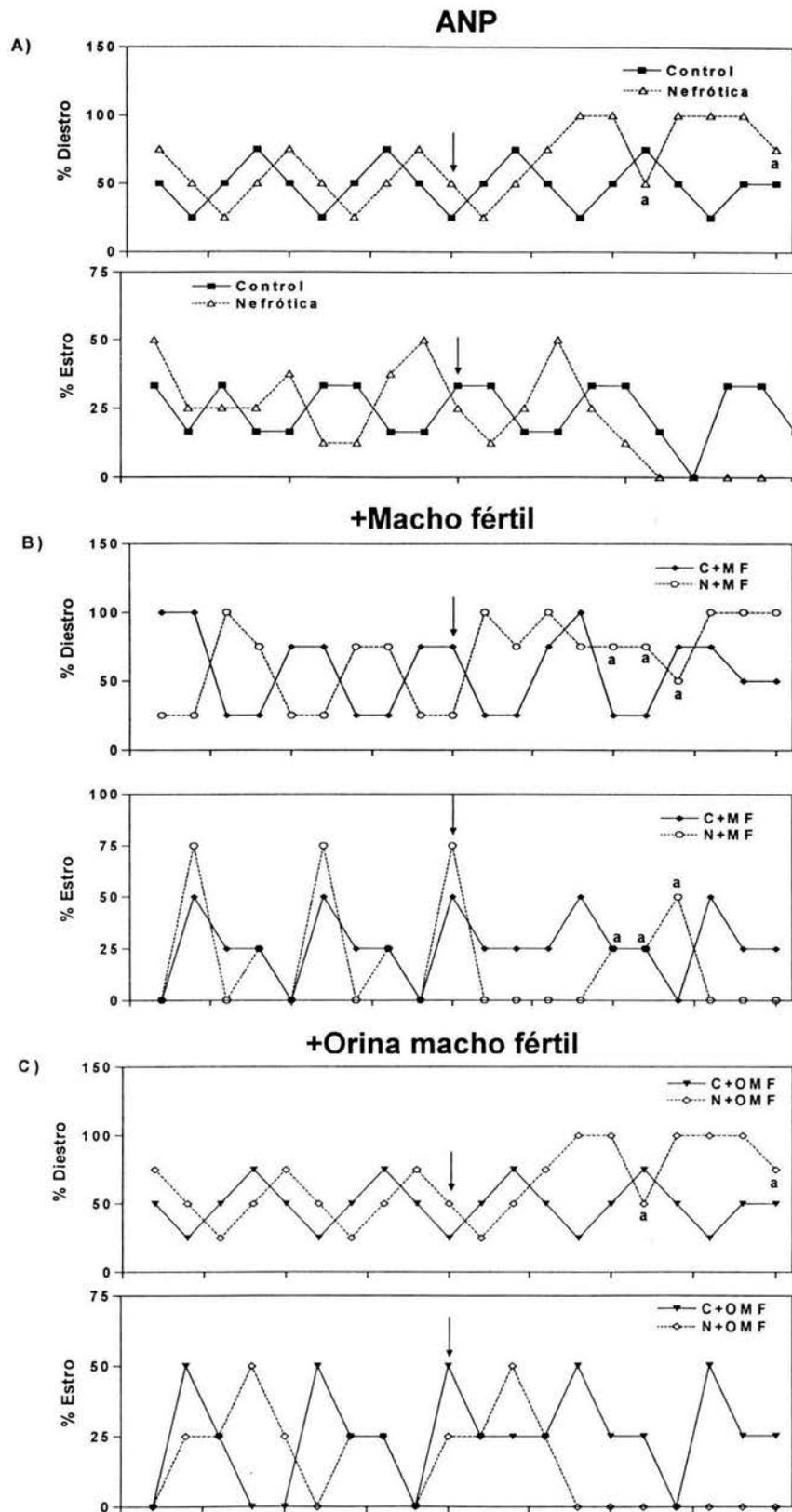


Figura 26. Ciclo estral. (A) Antes y después de la administración de ANP; (B) después de estímulo con la presencia del macho fértil (MF); (C) después del estímulo con la orina del macho fértil (OMF). La flecha indica el día de la administración del ANP (día 0). a= Fase atípica.

Perfil hormonal de la etapa 3A) presencia del macho fértil y 3B) presencia de la orina del macho fértil

En la figura 27 se presenta los niveles circulantes de progesterona en las ratas control y con síndrome nefrótico, al día 10 después de la administración de ANP y aquellas que fueron sometidas al estímulo del macho fértil y la orina del macho fértil. En esta se observa que los niveles de progesterona están significativamente disminuidos tanto en las ratas nefróticas, como en las ratas nefróticas con la presencia del macho fértil y las ratas nefróticas con estímulo de la orina del macho fértil (2.7, 1.3 y 1.8 veces respectivamente) con respecto al grupo control. Cabe señalar que las concentraciones de progesterona encontradas en los animales nefróticos caen dentro de los valores normales de la fase de diestro (10 – 26 ng/mL). Así mismo, se observó que las ratas control estimuladas con la orina del macho fértil hay una disminución estadísticamente significativa de 0.6 veces con respecto al grupo control estimulado con el macho fértil.

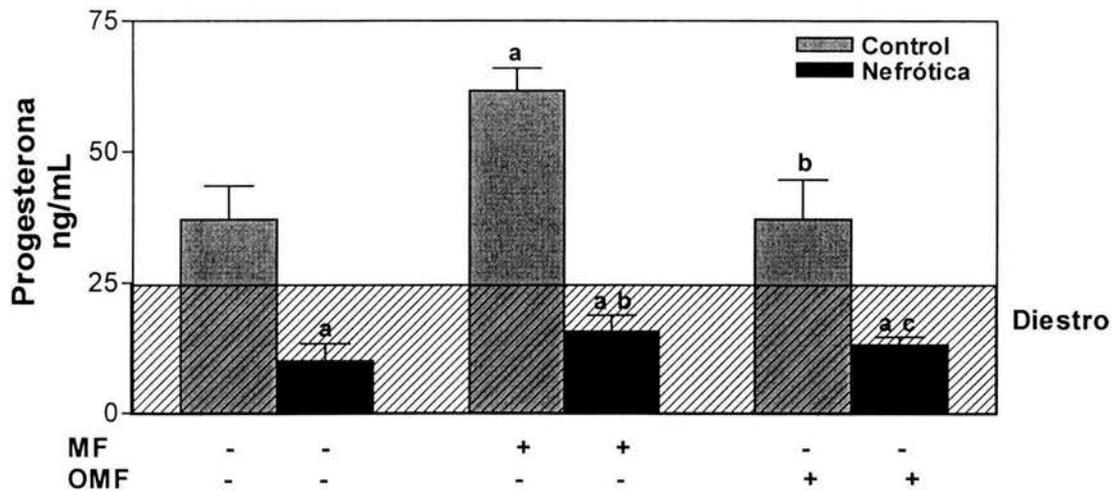


Figura 27. Niveles circulantes de progesterona al día 10 posterior a la administración de ANP en ratas hembra control y nefrótica, en ausencia o presencia del macho fértil (MF) o de la orina del macho fértil (OMF). Valores normales de progesterona en la fase de diestro: 10 – 26 ng/mL. Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control, ^b $P < 0.05$ vs. control + MF, ^c $P < 0.05$ vs. control + OMF.

Por lo que se refiere los niveles circulantes de testosterona en las ratas control y con síndrome nefrótico, al día 10 después de la administración de ANP o en presencia del

macho fértil o la orina del macho fértil (Fig. 28), las concentraciones de esta hormona se encuentran significativamente disminuidas (4 veces) en las ratas nefróticas al día 10 posterior a la administración de ANP así como las nefróticas que estuvieron sometidas al efecto de las feromonas (presencia del macho fértil o su orina) con respecto al grupo control, dicha disminución fue de 3.2 en ambos casos. De la misma manera, los grupos control estimulados con la presencia del macho fértil o su orina mostraron una disminución estadísticamente significativa de 3.3 veces con respecto al grupo control

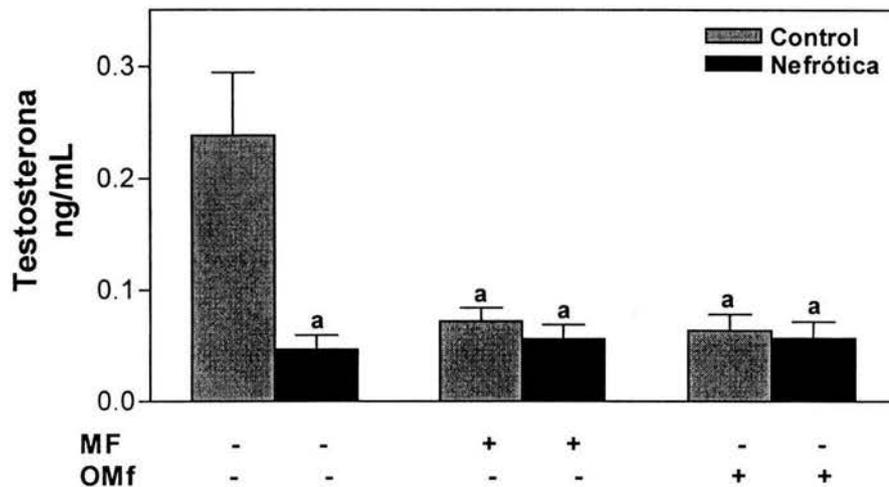


Figura 28. Niveles circulantes de testosterona al día 10 después de la administración de ANP en ratas hembra control y nefróticas, en ausencia o presencia del macho fértil (MF) o de la orina del macho fértil (OMF). Valores expresados como promedio \pm EE. ^aP<0.05 vs. control.

La figura 29 presenta las concentraciones circulantes de estradiol en las ratas control y nefróticas, al día 10 después de la administración de ANP y tras el estímulo con macho fértil o su orina, indicando que los animales con síndrome nefrótico al día 10 así como las ratas nefróticas más el estímulo del macho fértil y las ratas nefróticas más la orina del macho fértil presentan niveles indetectables de estradiol. Por el contrario, las ratas control al día 10 después de la administración de ANP en la presencia macho fértil y más la orina del macho fértil el estradiol está por arriba de los valores normales de la fase de diestro (10-20 pg/mL).

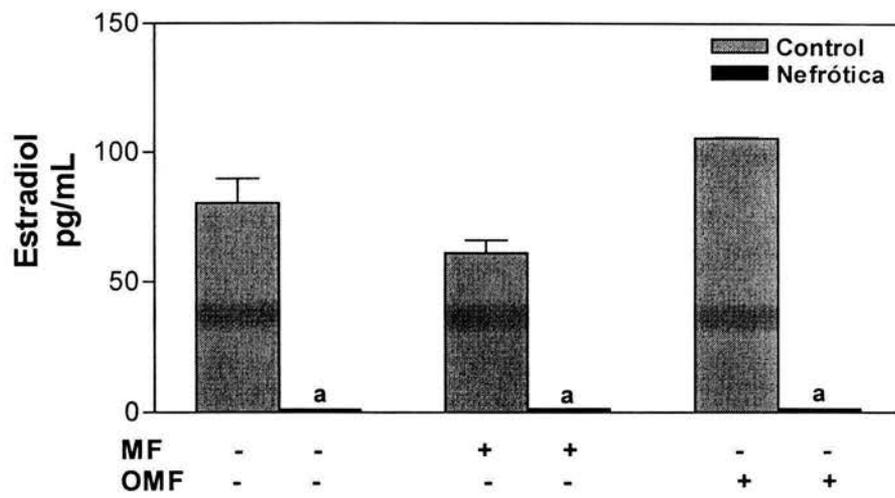


Figura 29. Niveles circulantes de estradiol al día 10 en ratas hembra control y nefróticas, basal y bajo el estímulo del macho fértil (MF) y la orina de macho fértil (OMF). Valores expresados como promedio \pm EE. ^a $P < 0.05$ vs. control.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. El análisis del estrés oxidativo indica que el daño inducido por el ANP es específico sobre riñón y no sobre ovario.
2. La expresión del gen de la P450scc en el síndrome nefrótico se encuentra significativamente disminuida, restableciéndose tras los estímulos con hCG.
3. La expresión del gen de la proteína StAR en el síndrome nefrótico agudo se encuentra significativamente disminuida y no responde a los estímulos exógenos con hCG.
4. En las condiciones evaluadas las feromonas son incapaces de restablecer la expresión de los genes de la enzima P450scc y de la proteína StAR

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la función ovárica durante el síndrome nefrótico en base a la expresión del ARNm de la enzima P450scc (side cholesterol chain cleavage) y de la proteína StAR (Steroidogenesis Acute Regulatory Protein) en fase aguda y bajo una prueba dinámica con hCG y posterior al estímulo con feromonas. Los resultados muestran una disminución significativa de la expresión del gen de la enzima P450scc y del gen de la proteína StAR en la fase aguda del síndrome nefrótico, así como fallas en la respuesta gonadal a la prueba dinámica con hCG, lo que demuestra claramente que la esteroidogénesis se encuentra afectada en este padecimiento renal.

Dado que el ANP produce daño vía la activación de especies reactivas de oxígeno (138), inicialmente, se evaluó la especificidad del daño causado por este compuesto sobre el riñón y la no afectación al ovario, mediante la determinación de proteínas oxidadas. Los resultados mostrados en la figura 11 indican un incremento significativo de 1.2 veces en los niveles de proteínas oxidadas en el riñón de las ratas nefróticas en comparación con los grupos control. Por el contrario, la cantidad de proteínas oxidadas en los ovarios de los animales nefróticos no cambió con respecto a su grupo control, lo que demuestra claramente que el ANP daña exclusivamente al riñón y no al ovario. De tal forma, que podemos señalar que las alteraciones endocrino-reproductivas observadas en el síndrome nefrótico son consecuencia de este padecimiento renal. Adicionalmente, se midió el daño oxidativo en hígado, órgano encargado de metabolizar la mayoría de los compuestos endógenos y exógenos, así como en la glándula suprarrenal, el otro tejido esteroidogénico; observándose que ninguno de estos dos tejidos presentan cambios significativos en la cantidad de proteínas oxidadas en los animales con síndrome nefrótico comparados con su grupo control, lo cual demuestra el carácter nefrotóxico del ANP.

Por otro lado, las determinaciones bioquímicas de proteínas en orina, colesterol y proteínas en suero (ver figuras 12-14) confirmaron la presencia del síndrome nefrótico

en la rata hembra administrada con ANP; de este modo, la proteinuria, hipercolesterolemia e hipoproteinemia fueron las características observadas en estos animales. Adicionalmente, se encontró que la excreción de proteínas urinarias en los animales nefróticos tratados con hCG, una o con cuatro dosis disminuyen (ver figura 12), aunque no significativamente. Este decremento podría ser una consecuencia de la elevación de los niveles circulantes de testosterona, particularmente en el caso de las ratas nefróticas que recibieron cuatro dosis de hCG. Esta tendencia también ha sido observada en ratas macho nefróticas estimuladas con esta misma gonadotropina (131,139). El mecanismo por el cual la hCG mejora el funcionamiento renal no se conoce, sin embargo, especulamos que al aumentar los niveles de testosterona, tras la estimulación con la hCG, y siendo este andrógeno un esteroide anabólico, podría estar activando un mecanismo de síntesis proteica y de división celular, vía receptores específicos ubicados en riñón (130), conduciendo al mejoramiento en la condición renal. Por otro lado, los niveles de colesterol no parecen tener cambios, aunque presentan tendencia a disminuir lo cual pudiera ser una respuesta secundaria al decremento en la proteinuria en los animales nefróticos estimulados con una y cuatro dosis de hCG (ver figura 13). Por lo que se refiere a las proteínas en suero (ver figura 14A), estas se mantienen disminuidas, tanto en las ratas nefróticas al día 10 como en las tratadas con cuatro dosis de hCG. Este dato resulta paradójico hasta cierto punto, puesto que al existir una disminución de la proteinuria en los animales nefróticos tratados con la hCG, se esperaría que el nivel de proteínas en suero en estos animales tendieran a incrementarse como consecuencia del aparente mejoramiento renal, sin embargo, no fue así, posiblemente esto se deba a que la velocidad de síntesis de proteínas es insuficiente como para recuperar los niveles normales de las proteínas en suero, aunado a ello está el hecho de que las proteínas siguen eliminándose en grandes cantidades (Fig. 14B). Un ejemplo que apoya lo antes mencionado es el empleo de ACTH como terapia para el síndrome nefrótico, con el cual se observa un marcado mejoramiento en los niveles de lipoproteína y la reducción de la excreción de proteína urinarias (140).

Por lo que se refiere al perfil hormonal este, mostró que los niveles de progesterona y testosterona están significativamente disminuidos al día 10, en tanto que el estradiol es

prácticamente indetectable en las ratas con síndrome nefrótico en el mismo día, lo que da cuenta del hipogonadismo severo en el síndrome nefrótico agudo. No obstante, y teniendo el conocimiento de la presencia de hipogonadotropismo en este padecimiento (125), las ratas nefróticas fueron sometidas al estímulo con una y cuatro dosis de hCG, en sustitución de la hormona luteinizante (LH), la cual se encuentra disminuida durante este padecimiento (125). Así, se encontró que los niveles de progesterona (Fig. 15), tienden a incrementarse en las ratas sometidas a los estímulos con hCG (una y cuatro dosis), pero el aumento no es significativo, permaneciendo dentro de niveles normales reportados para la fase diestro (124), etapa del ciclo estral en la que las ratas nefróticas se estacionan, lo que apunta a que el primer paso en la esteroidogénesis se encuentra alterado en el síndrome nefrótico agudo. Dado que en dicho primer paso se produce la progesterona y es catalizado por la enzima la enzima P450_{scc}, se midió la expresión génica de esta enzima. Los resultados muestran que la expresión del gen de la enzima P450_{scc} esta significativamente disminuida al día 10, pero responde a los estímulos con hCG, incrementando la expresión del gen de esta enzima esteroidogénica en los animales nefróticos tras la administración de una y cuatro dosis, 3.0 y 4.2 veces más respectivamente con relación al grupo nefrótico al día 10. Sin embargo, el aumento en la expresión génica de esta enzima, no se refleja en los niveles circulantes de progesterona, los cuales se mantienen bajos, lo que sugiere que no únicamente este paso de la esteroidogénesis se encuentra alterado sino que posiblemente existan otros factores involucrados, dentro de los cuales un primer candidato es la proteína StAR. Se ha publicado que la translocación del colesterol al interior de la membrana mitocondrial es el verdadero paso limitante de la esteroidogénesis y este es efectuado principalmente por la acción de la proteína StAR (28). Por tal motivo, se determinó la expresión del ARNm de la proteína StAR en este padecimiento renal. Así, la determinación de la expresión del gen de la proteína StAR en el ovario de los animales nefrótico disminuyó significativamente y no responde a los estímulos con hCG (Fig. 22), lo cual sugiere que el transporte de colesterol al interior de la membrana interna mitocondrial esta afectado en el síndrome nefrótico agudo. No obstante, el hecho de que por un lado hay expresión del gen de la enzima P450_{scc} (tras los estímulos de hCG) y por el otro que exista la expresión génica de la proteína StAR, aunque

disminuida significativamente (pero está presente) podría indicar la posibilidad de que otro componente o mecanismo importante en la esteroidogénesis, además de la enzima P450_{scc} y la proteína StAR se encuentre alterado impidiendo llevar adecuadamente la síntesis de esteroides sexuales. Por otro lado, un cambio en el micro ambiente celular como consecuencia del exceso de colesterol extracelular tal vez pudieran estar afectando la funcionalidad de la proteína por falta de colesterol intracelular. Esta posibilidad podría tener sustento en el hecho de que el estradiol, factor activador de la endocitosis de LDL, es no detectable durante el síndrome nefrótico. La falta de disponibilidad de colesterol podría dificultar el contacto entre la proteína StAR y la membrana mitocondrial, proceso que es relevante para que esta proteína efectúe su función. En este sentido, estudios en mitocondrias aisladas sugieren que solo se requieren de interacciones al azar entre la proteína StAR y la superficie mitocondrial para promover la esteroidogénesis (141). También es importante mencionar que dada la existencia de bajos niveles de LH y la nula actividad biológica de la FSH en el síndrome nefrótico (129), es posible especular que la presencia de las dos gonadotropinas sean indispensables en la regulación esteroidogénica.

Por otro lado, los niveles de testosterona (Fig. 16) disminuyen al día 10 después de la administración de ANP y se incrementan significativamente después de los estímulos con cuatro dosis de hCG, dado que la progesterona está disminuida, probablemente este incremento sea producto de la contribución de la suprarrenal. Se ha reportado que la glándula suprarrenal puede generar receptores para LH/hCG tras estímulo crónico con LH/hCG y llevar a cabo la formación de testosterona (142). Interesantemente, a pesar de este incremento de testosterona encontrado los niveles de estradiol permanecieron prácticamente indetectables antes y después del tratamiento con hCG (Fig 18). Tomando en cuenta que la síntesis de estradiol es catalizada por el complejo enzimático citocromo P450 aromatasa, tanto en tejido gonadal como periférico, este resultado sugiere que el mecanismo de aromatización está alterado en este padecimiento renal (130).

En cuanto a la evaluación del efecto de las feromonas, particularmente sobre el ciclo estral de la rata, la presencia del macho fértil (MF) o la orina del macho fértil (OMF), mostró que los animales con síndrome nefrótico se estacionan en la fase de diestro, aunque algunos animales presentaron proestros atípicos. Esta evaluación concuerda con el perfil hormonal en el que los niveles de progesterona, testosterona y estradiol se mantuvieron disminuidos (fase de diestro) en las ratas nefróticas. Estos resultados indican que en el síndrome nefrótico agudo no existe efecto positivo de las feromonas sobre los niveles circulantes de hormonas esteroideas sexuales, principalmente sobre estradiol, a diferencia de la nefrosis crónica en la cual se observa un incremento en los niveles circulantes de estradiol (127). Sin embargo, es importante señalar que la aplicación de estímulos con las feromonas en el síndrome nefrótico crónico fue de ocho días en total (127), probablemente en el caso del estado agudo se requiera incrementar el número de estímulos con las feromonas, ya que en este trabajo solo se dieron durante cuatro días (por la duración del ciclo estral en la rata), los cuales quizás sean insuficientes para ver algún efecto sobre la esteroidogénesis.

En conjunto los resultados de la presente tesis demuestran la existencia de un daño severo en la esteroidogénesis ovárica en la fase aguda síndrome nefrótico, particularmente la disminución de la expresión de la enzima P450scc y de la proteína StAR, lo cual explica el hipogonadismo asociado al síndrome nefrótico.

CONCLUSIÓN

En conjunto, los datos presentados revelan la existencia de alteración de la función ovárica durante el síndrome nefrótico, específicamente en la expresión de la enzima P450scc y la proteína StAR.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo y los que lo anteceden, dan un amplio panorama de las alteraciones endocrino-reproductivas en el síndrome nefrótico. Sin embargo, aun se desconocen muchos factores implicados en dichas anomalías, así la utilización del cultivo de células gonadales y la administración de compuestos tales como FSH, hCG, 8-bromo AMPc, antioxidantes o la combinación de estos, aportarán un conocimiento más amplio de los factores implicados en la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en el síndrome nefrótico.

REFERENCIAS

1. Yeh J, Adashi EY. The ovarian life cycle. En: Reproductive endocrinology. Yen SC, Jeffe R, Barbieri RL (eds), 1999, WB Saunders, Philadelphia, p 153-190.
2. Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51-89, 1980.
3. Terranova PF. Regulation of the granulosa cell: growth factor interactions. *Semin Reprod Endocrinol* 9:313-320, 1991.
4. Roberts AJ, Skinner MK. Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: theca cell-granulosa cell interactions. *Endocrinol* 127:2918-2929, 1990.
5. Hillier SG. Ovarian manipulation with pure gonadotrophins. *J Endocrinol* 127:1-4, 1990.
6. Turner IM, Saunders PTK, Shimasaki S, Hillier SG. Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in culture rat granulosa cells. *Endocrinol* 125:2790-2792, 1989.
7. Michael U., McMaster JW, Findlay JK. Regulation of steady state of follistatin messenger RNA levels in rat granulosa cells *in vitro*. *J Mol Endocrinol* 9:147-156, 1992.
8. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PBC, Welsh Jr TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5:76-127, 1984.
9. Ferenczy A, Bergeron C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Ann NY Acad Sci* 622:6-27, 1991.
10. de Ziegler D, Bergeron C, Cornel C, Nedalie DA, Massai MR, Nicgrom E, Frydman R, Bouchard P. Effects of luteal estradiol on the secretory transformation of human endometrium and plasma gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab.* 74:322-331, 1992
11. Hum DW, Miller WL. Transcriptional regulation of human genes for steroidogenic enzymes. *Clin Chem* 39:333-340, 1993.
12. Krasnow JS. Advances in understanding ovarian physiology: regulation of steroidogenic enzymes in ovarian follicular differentiation. *Semin Reprod Endocrinol* 9:283-302, 1991.
13. Labrie F, Simard J, Luu-The V, Bélanger A, Pelletier G. Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:805-826, 1992.
14. Durham CR, Zhu H, Masters BSS, Simpson ER, Mendelson CR. Regulation of aromatase activity of rat granulosa cells: induction of synthesis of NADPH-cytochrome P-450 reductase by FSH and dibutyryl cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol* 40:211-219, 1985.
15. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9:295-318, 1988.
16. Hanukoglu Y. Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43:779-804, 1992
17. Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF, Richards JS. Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinol* 125:1673-1682, 1989.
18. Keeney DS, Ikeda Y, Waterman MR, Parker KL. 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
19. Moore CCD, Hum DW, Miller WL. Identification of positive and negative placenta-specific basal elements and a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human gene P450scc. *Mol Endocrinol* 6:2045-2058, 1992.

20. Babischkin JS, Pepe GJ, Albrecht DE. Estrogen regulation of placental P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid levels and activity during baboon pregnancy. *Endocrinol* 138:452-459, 1997.
21. Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63:193-213, 2001.
22. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164:247-253, 2000.
23. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269:28314-28322, 1994.
24. Strauss III JF, Kishida T, Christenson LK, Fujimoto T, Hiroi H. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Mol Cell Endocrinol* 202:59-65, 2003.
25. Christensen K, Bose HS, Harris FM, Miller WL, Bell JD. Binding of steroidogenic acute regulatory protein to synthetic membranes suggests an active molten globule. *J Biol Chem* 276:17044-17051, 2001.
26. Bose H, Lingappa VR, Miller WL. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 417:87-91, 2002.
27. Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss III JF. Phosphorylation of steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272:32656-32662, 1997.
28. Lin D, Sugawara T, Strauss JF III, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267:1828-1831, 1995.
29. Caron KM, Soo, Wetsel WC St, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11540-11545, 1997.
30. Pollack SE, Furth EE, Kallen CB, Arakane F, Kiriakidou M. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4243-4251, 1997.
31. Kiriakidou M, McAllister JM, Sugawara T, Strauss JF III. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4122-4128, 1996.
32. Bosmann HB, Hales KH, Li X, Liu Z, Stocco DM. Acute in vivo inhibition of testosterone by endotoxin parallels loss of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein Leydig cells. *Endocrinol* 137:4522-4525, 1996.
33. Gregory CW, Dephiliip RM. Detection of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in mitochondria of cultured rat Sertoli cells incubated with follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 58:470-474, 1998.
34. Ford SL, Reinhart AJ, Lukyanenko Y, Hutson JC, Stocco DM. Pregnenolone synthesis in immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 157:87-94, 1999.
35. Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450_{scc} (CYP11A1), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem* 71:2231-2238, 1998.
36. Gradi A, Tang-Wai R, McBride HM, Chu LL, Shore GC. The human steroidogenic acute regulatory (StAR) gene is expressed in the urogenital system and encodes a mitochondrial polypeptide. *Biochim Biophys Acta* 1258:228-233, 1995.
37. Clark BJ, Combs R, Hales KH, Hales DB, Stocco DM. Inhibition of transcription affects synthesis of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinol* 138:4893-4901, 1997.

38. Christenson LK, McAllister JM, Martin K, Javitt NB, Osborne TF, Strauss JF. Oxysterol regulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression: structural specificity, transcriptional and post-transcriptional actions. *J Biol Cell* 273:30729-30735, 1998.
39. Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *Mol Endocrinol* 11:136-147, 1997.
40. Luo L, Chen H, Stocco DM, Zirkin BR. Leydig cell protein synthesis and steroidogenesis in response to acute stimulation by luteinizing hormone in rats. *Biol Reprod*. 59:263-270, 1998.
41. Lin T, Wang D, Hu J, Stocco DM. Upregulation of human chorionic gonadotrophins-induced steroidogenic acute regulatory protein by insulin-like growth factor-I in rat leydig cells. *Endocrine* 8:73-78, 1998.
42. Lehoux JG, Fleury A, Ducharme L. The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. *Endocrinol* 139:3913-3922, 1998.
43. Pescador N, Houde A, Stocco DM, Muphy BD. Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 57:660-668, 1997.
44. Mamluk R, Greber Y, Meidan R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine lutea cells. *Biol Reprod* 60:628-634, 1999.
45. Townson DH, Wang XJ, Keyes PL, Kostyo JL, Stocco DM. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotropic hormone, estradiol-17 β . *Biol Reprod* 55:868-874, 1996.
46. Lorence MC, Murry BA, Trant JM, Mason JL. Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyses the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroid. *Endocrinol* 126:2493-2498, 1990.
47. Zhao HF, Labrie C, Simard J, Launoit Y, Trudel C, Martel C, Rhéaume E, Dupont E, Luu-The V, Pelletier G, Labrie F. Characterization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase cDNA and differential tissue-specific expression of the corresponding mRNAs in steroidogenic and peripheral tissues. *J Biol Chem* 266:583-593, 1991.
48. Martel C, Gagné D, Coûte J, Labrie Y, Simard J, Labrie F. Rapid modulation of ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene expression by prolactin and human chorionic gonadotropin in the hypophysectomized rat. *Mol Cel Endocrinol* 99:63-71, 1994.
49. 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.
50. Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JLR, Mellon SH. Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinol* 136:5212-5223, 1995.
51. Williamson DG. The biochemistry of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem* 1:83-110, 1979.

52. Milewich L, Garcia RL, Gerrity LW. 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase: a ubiquitous enzyme, interconversion of estrone and estradiol-17 β in BALB/c mouse tissues. *Metabolism* 34:938-944, 1985.
53. Pittaway DE, Andersen RN. Characterization of human ovarian oestradiol-17 β oxidoreductase activity. *Acta Endocrinol (Kbh)* 85:624-635, 1977.
54. Wu L, Eistein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S. Expression cloning and characterization of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268:12964-12969, 1993.
55. Peltoketo H, Vihko P, Vihko R. Regulation of estrogen action: role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Vitam Horm* 55:353-398, 1999.
56. Mäentausta O, Peltoketo H, Isomaa V, Jouppila P, Vihko R. Immunological measurement of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem* 36:673-680, 1990.
57. Ritvos O, Voutilainen R. Regulation of aromatase cytochrome P-450 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acids levels in choriocarcinoma cells. *Endocrinol* 130:61-67, 1992.
58. Tremblay Y, Ringler GE, Morel Y, Monadas TK, Labrie F, Straus II JF, Miller WL. Regulation of the gene for estrogenic 17-ketosteroid reductase lying on chromosome 17cen->q25. *J Biol Chem* 264:20458-20462, 1989.
59. Peltoketo H, Isomaa V, Vihko R. Complete amino acid sequences of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett* 239:73-77, 1988.
60. Luu-The V, Labrie C, Fen Zhao H, Coüte J, Lachance Y, Simard J, Leblanc G, Côté J, Bérubé D, Gagné R, Labrie F. Characterization of cDNA for human estradiol 17 β -dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta. *Mol Endocrinol* 3:1301-1309, 1989.
61. Peltoketo H, Isomaa V, Vihko R. Genomic organization and DNA sequences of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase genes and flanking regions. Localization of multiple Alu sequences and putative *cis*-acting elements. *Eur J Biochem* 209:459-466, 1992.
62. Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER. Isolation of full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in non-steroidogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8948-8952, 1988.
63. Lewis DFV, Lee-Robichaud P. Molecular modeling of steroidogenic cytochrome P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J Steroid Biochem Molec Biol* 66:217-233, 1998.
64. Hickey GJ, Chen S, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Richards JS. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinol* 122:1426-1436, 1988.
65. Simpson E, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Corbin C, Mendelson CR. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression. *J Steroid Biochem Molec Biol* 44:321-330, 1993.
66. Omura T, Morohashi KI. Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53:19-25, 1995.
67. Brenner, B. M and Rector FC. The kidney. Vol 1, Capitulo 1 Elements of normal renal structure and function: *Anatomy of the Kidney* 5a ed. Barry M. Brenner (eds), 1997. Boston Massachusetts, EUA.
68. Vander, A. J. *Fisiología renal*. 3^a. ed. Edit. McGraw Hill. México, 1990.
69. Patrakka J, Lahdenkari, AT, Koskimies O, Holmberg C, Wartiovaara J and Jalanko H. The number of podocyte slit diaphragms is decreased in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatric Res* 52:349-355, 2002.

70. Raats CJ, van den Born J, Berden JH. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance to proteinuria. *Kidney Int* 57:385-400, 2000.
71. Huang TW and Langlois JC. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J Exp Med* 162:245-267, 1985.
72. Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D and Farquhar MG. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol* 125:309-318, 1986.
73. Orci L, Brown D, Amherdt M and Perrelet A. Distribution of intramembrane particles and filipin-sterol complexes in plasma membranes of kidney. I. Corpuscle of Malpighi. *Lab Invest* 46:545-553, 1982.
74. Sakai T, Sabanovic S, Hosser H. and Kriz W. Heterogeneity of the podocyte membrane in rat kidney as revealed by ethanol dehydration of unosmicated specimens. *Cell Tissue Res* 246:145-151, 1986.
75. Rouillier C: General anatomy and histology of the kidney. In Rouillier C, Muller, AF (eds): *The Kidney: Morphology, Biochemistry, Physiology*, Vol 1. Academic Press, New York, 1969, p 61.
76. Knepper MA, Rector FC Jr: Urinary concentration and dilution. In Brenner BM, Rector FC Jr (eds): *The Kidney*, 4th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1991, p 445.
77. Burg MB: Renal handling of sodium, chloride, water, amino acids, and glucose. In Brenner BM, Rector FC Jr (eds): *The Kidney*, Vol I, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1986, p 145.
78. Fogo A. Nephrotic syndrome: Molecular and genetic basis. *Nephron*. 85:8-13, 2000.
79. Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephritic syndrome. *Nat Genet* 24:333-335, 2000.
80. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10:2440-2445, 1999.
81. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Routsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenital nephritic syndrome. *Mol Cell* 1:575-582, 1998.
82. Lenkkeri U, Männikkö M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet P, Antignac C, Kashtan CE, Holmberg C, Olsen A, Kestilä M, Tryggvason K. Structure of the gene for congenital nephritic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 64:51-61, 1999.
83. Brenner B, Coe F, Rector FC. Structures and function of the renal circulations. En: *Renal Physiology in Health and Disease*. Brenner B, Coe F, Rector F (eds.), 1987, WB Saunders, Philadelphia, EUA.
84. Glassock RJ, Brenner BM. The major glomerulopathies. En: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Iselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci SA, Kasper DL (eds.), 1994, McGraw-Hill, New York, p.1295-1306.
85. Afrasiabi MA, Dabir N, Vaziri ND, Gwinup G, Mays M, Barton C, Ness R, Valenta L. Thyroid function studies in the nephrotic syndrome. *Ann Int Med* 90:335-338, 1992.
86. Goldstein DA, Haldimann B, Sherman D, Norman AW, Massry SG. Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J Clin Endoc Metab* 52:116-121, 1981.
87. Alfrey AC, Hammond WS. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 37:1409-1413, 1990.
88. Cartwright GE, Gubler CJ, Wintrobe MM. Studies on copper metabolism. XI. Copper and iron metabolism in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 33:685-692, 1954.
89. Cameron JS. Coagulation and thromboembolic complications in the nephrotic syndrome. *Adv Nephrol* 13:75-114, 1984.

90. Giacomo J, Clearly TG, Cole BR, Hoffsten P, Robson AM. Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal change nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 293:8-12, 1975.
91. 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.
92. Diamond JR, Anderson S. Irreversible tubulointerstitial damage associated with chronic aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 137:323-332, 1990.
93. Alexander CS, Nagasawa HT, Filbin D. Distribution and excretion of aminonucleoside-8-¹⁴C in normal and nephritic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:521-526, 1967.
94. Derr RF, Alexander CS, Nagasawa HT. Metabolism of puromycin aminonucleoside in the normal, "pre-nephrotic" and nephritic rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 125:248-252, 1967.
95. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 8:219-232, 1975.
96. Venkatachalam MA, Karnovsky MJ, Cotran RS. Glomerular permeability. Ultrastructural studies in experimental nephrosis using horseradish peroxidase as a tracer. *J Exp Med* 130:381-399, 1969.
97. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky DA. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 29:478-483, 1986.
98. Buck LB. The molecular Architecture of Odor and Pheromone Sensing in Mammals. *Cell* 100: 611-618, 2000.
99. Beets M. The molecular parameters of olfactory response. *Pharm Rev.* 22:1-34, 1970
100. Shepherd GM. *Neurobiology*. New York, Oxford University Press. 1988
101. Wilson EO. Pheromones. *Sci Am* 208:100-114, 1963.
102. Halpern, M The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* 10:325-362, 1987.
103. Wysocki CJ, Meredith M. The vomeronasal system. In *The Neurobiology of Taste and Smell* TE, Finger, WL Silver, eds. (New York: Wiley), pp. 125-150. 1987.
104. Hildebrand J, Shepherd G. Mechanism of olfactory discrimination. *Annu Rev Neurosci* 20:595-631, 1997.
105. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: molecular basis for odor recognition. *Cell* 78:823-834, 1991.
106. Ngai J, Dowling MM, Buck L, Axel R, Chess A. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* 72:657-666, 1993
107. Troemel ER, Chou JH, Dwyer ND, Colbert HA Bargmann CI. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83:207-218, 1995.
108. Sengupta P, Chou J H, Bargmann CI. odr 10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* 84:899-909, 1996.
109. Clyne P J, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* 22:327-338, 1999.
110. Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96:725-736, 1999.
111. Novotny M, Jemiolo B, Harvey S. Chemistry of rodent pheromones: molecular insights into chemical signaling in mammals. Volume 5, D. W. Macdonald, ed. (Oxford University Press). 1990.
112. Keverne EB. The vomeronasal organ. *Science* 286:129-132, 1999.

113. Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP. Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav Evol* 49:53-62, 1997.
114. Levy NS, Bakalyar HA, Red RR. Signal transduction in olfactory neurons. *J. Steroid. Biochem Mol Biol* 39:633-637, 1991.
115. Lancet, D., and Ben-Arie, N. Olfactory receptors. *Curr. Biol.* 3:668-674, 1993.
116. Mombaerts P. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 22:487-509, 1999.
117. Dulac C, Axel R. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206, 1995.
118. Herrada G, Dulac C. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90:763-773, 1997.
119. Matsunami H, Buck LB. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90:775-784, 1997.
120. Ryba NJ, Tirindelli R. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19: 371-379, 1997.
121. Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211-218, 2001.
122. Glass AR, Bech J, Vigersky RA. Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increased sensitivity to negative feedback effects of testosterone. *Metabolism* 34:574-579, 1985.
123. Elias AN, Carreon G, Vaziri ND, Pandian MR, Oveisi F. The pituitary-gonadal axis in experimental nephrotic syndrome in male rats. *J Lab Clin Med* 120:949-954, 1992.
124. Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Merchant H, Pérez-Palacio G, Pedraza-Chaverrí J. Pituitary-ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome. *Eur J Endocrinol* 132:502-506, 1995.
125. Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pérez-Palacios J, Pedraza-Chaverrí J. Transient alteration of the reproductive function in nephrotic rats. *Life Scien* 61:1159-1167, 1997.
126. Ortiz G, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverrí J, Menjivar M. Reproductive function in male rats with chronic nephrosis. *J Reprod Fertil* 117:223-228, 1999.
127. Menjivar M, Cárdenas M, Ortiz G, Pedraza-Chaverrí J. Fertility diminution in rats with experimental chronic nephrosis. *Biol Rep* 63:1559-1564, 2000.
128. Menjivar M, Ortiz-López MG, Vilchis F, Díaz-Bonilla L, Pedraza-Chaverrí J. Evaluation of the pituitary-testicular function during experimental nephrosis. *Life Sciences* 70:1-14, 2002.
129. Ortiz-López MG, Cárdenas M, Zariñan T, Díaz-Bonilla L, Zambrano E, Pedraza-Chaverrí J, Menjivar M. Dynamic tests and FSH biological activity in female rats with induced nephrotic syndrome. *Mol Cel Biochem* 245:167-172, 2003.
130. Menjivar M, Castillo N, Vilchis F, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverrí J, Ortiz-López MG. Impaired testicular cytochrome P450 side-chain-cleavage (P450scc) and steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression in rats with nephrotic syndrome. *Mol Cel Endocrinol* 209:1-7, 2003.
131. Menjivar M, Ortiz-López MG, Vilchis F, Pedraza-Chaverrí J, Larrea F, Correa R. Pituitary-testicular axis alterations in men with nephrotic syndrome. En: Program of the 81 st annual meeting of the Endocrine Society, 1999; San Diego, CA. Abstract P2-435.
132. Menjivar M, Zambrano E, Montúfar I, Vital S, Chew A, Pedraza-Chaverrí J, Correa-Rotter R, Veldhuis JD, Ortiz-López MG. Reproductive-endocrine dysfunction in

- nephrotic patients: hormonal secretion and gonadotropin bioactivity. 12TH International congress of endocrinology, 2004, Lisboa. Abstract Reference No.: ABS-4852-01330.
133. Pedraza-Chaverrí J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 42:29-38, 1990.
 134. Pedraza-Chaverrí J, Calderón P, Cruz C, Peña JC. Electroforetic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Ren Fail* 15:149-155, 1993.
 135. Davis LG, Dibuer MD, Battley JF. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, p.130-142, 1986.
 136. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1989.
 137. 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.
 138. Diamod JR, Bonvertre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 29:478-483, 1986.
 139. Castillo-Ocampo NT. Evaluación de la P450scc testicular en el síndrome nefrótico experimental. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Pp 25-26, 2002.
 140. Berg A, Nilsson-Ehle P, Arnadottir M. Beneficial effect of ACTH on the serum lipoprotein profile and glomerular function in patients with membranous nephropathy. *Kidney Int* 56:1534-1543, 1999.
 141. Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NBV, Panis D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss JF III. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 273:16339-16345, 1998.
 142. Kero J, Potanen M, Zhang FP, Rahman N, McNicol AM, Nilson JH, Keri RA, Huhtaniemi IT. Elevated luteinizing hormone induce expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J Clin Invest* 105:633-641. 2000.
 143. Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
 144. Vera JC. Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure. *Anal Biochem* 174:187-196, 1998.
 145. Ebina S, Nagai Y. Re-evaluation of turbidimetry of proteins by use of aromatic sulfonic acids and chloroacetic acids. *Clin Chem* 25:247-251, 1979.
 146. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220-1224.
 147. Garibaldi S, Aragno I, Odetti P, Marinari UM. Relationships between protein carbonyls, retinol, and tocopherols level in human plasma. *Biochem Molec Biol Int* 34:729-736, 1994.
 148. Dean RT, FU S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324:1-18, 1997.
 149. Refsgaard H, Tsai L, Stadtman ER. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 611-616, 2000.
 150. Schuenstein E, H. Esterbauer. Formation and properties of reactive aldehydes. *In* Submolecular Biology of Cancer, CIBA Foundation Series 67, Excerpta Medica: 225-244. Elsevier. Amsterdam, the Netherlands, 1979.
 151. Uchida K, Stadtman ER. Covalent modification of 4-hydroxynonanal to glyceraldehyde-3-phosphate. *J Biol Chem* 268: 6388-6393, 1993.
 152. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E.. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem* 273:16058-16066, 1998.

153. Burcham PC, Kuhan YT. Introduction of carbonyl groups into proteins of the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem Biophys Res Commun* 220:996-1001,1996.
154. Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Glucose and aging. *Sci Am.* 256:90-96, 1987.
155. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons YJ, Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 11:48-53, 1996.
156. Saxena AK, Saxena P, Wu X, Obrenovich M, Weiss MF, Monnier VM. Protein aging by carboxymethylation of lysines generates sites for divalent metal and redox active copper binding: relevance to diseases of glycoxidative stress. *Biochem Biophys Res* 260:332-338, 1999.
157. Requena JR, Stadtman ER. Conversion of lysine to N-carboxymethyl lysine increases susceptibility of proteins to metal-catalyzed oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 264:207-211,1999
158. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, ER Stadtman. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478, 1990.
159. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, E Schacter. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357, 1994.
160. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 262:5488-5491, 1987.
161. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233:357-363, 1994.
162. Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7255-7259,1993.

ANEXOS

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Medición de proteínas totales en suero: método de Lowry (143)

El método de Lowry se basa en la reactividad del nitrógeno de los aminoácidos con los iones Cu^{2+} en condiciones alcalinas y posteriormente en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) a heteropolimolibdeno por la oxidación catalizada por el cobre de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptofano. El Folin reducido es de color azul y puede ser determinado en un espectrofotómetro en el rango de 500 a 750 nm. La reacción de Biuret por sí misma no es muy sensible, pero usando el reactivo de Folin para detectar el cobre reducido hace el ensayo cerca de 100 veces más sensible. La lectura obtenida es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra; los resultados se expresan en g/dL o mg/mL.

Se empleó como curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) 5-50 $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$.

Ensayo

Preparación de las muestras:

Las diluciones de las muestras de suero se hicieron con agua desionizada. La dilución utilizada fue de 1:600 (5.0 μL de suero + 2995 μl agua).

Las diluciones se hicieron en tubos de 12X75 mm.

Procedimiento

1. Se preparó una curva estándar con ASB al 0.05%.

[ASB] $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$	ASB (μL)	H ₂ O (μL)
Blanco	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

2. Se numeraron tubos de 12X75 mm o 13X100 mm (las determinaciones se hacen por duplicado).
3. En cada tubo se colocaron 0.2 mL de la dilución correspondiente.
4. A todos los tubos se les añadió 1 mL de la solución C, ver anexos, incluyendo los tubos de la curva estándar.
5. Se agitaron e incubaron a temperatura ambiente por 10 min.
6. A todos los tubos se le agregaron 100 μL de la solución D, ver anexos, agitando simultánea y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min.
7. Se leyeron a 660 nm.

Determinación proteínas urinarias: método turbidimétrico (144,145)

Para separar las proteínas de la orina hay que desnaturalizarlas, es decir, causar un cambio en su solubilidad, lo que causa que se precipiten. Esto puede lograrse por varios métodos: aumentando la temperatura, cambiando el pH o bien usando agentes desnaturizantes como urea, guanidina, mercaptoetanol, ditioneitol, sales inorgánicas (bromuro de litio, tiocianato de potasio, yoduro de sodio), solventes orgánicos (formamida, dimetilformamida, ácido tricloroacético) o detergentes (SDS).

En particular en este trabajo empleamos ácido tricloroacético (ATC) 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.

Obtención de la muestra:

Se centrifugaron las muestras de orina recolectada de la jaula metabólica a 3000 rpm/10 min a 4°C.

Ensayo.

1. Se preparó una curva estándar con ASB 0.1% de la siguiente manera:

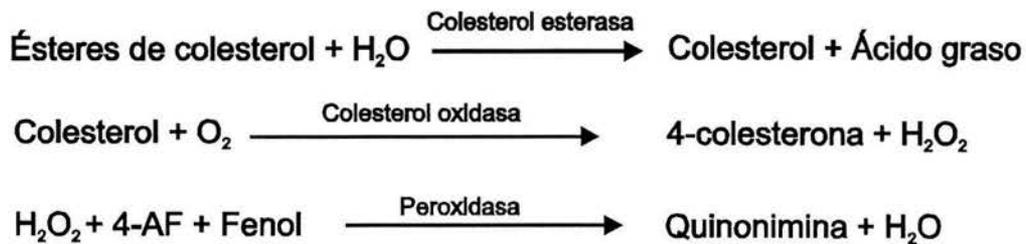
[ASB]mg/mL	ASB 0.1% (μL)	H₂O (μL)
Blanco	0	1000
0.04	40	960
0.1	100	900
0.2	200	800
0.4	400	600
0.6	600	400
0.8	800	200

2. Se diluyó la orina en agua desionizada, para las ratas control haciéndose una dilución de 1:6 (ratas de 250 g de peso en adelante), en tanto que para los animales nefróticos la dilución empleada fue de 1:100.
3. En tubos de vidrio de 12X75 se colocó 1 mL de cada muestra (por duplicado)
4. Se adicionaron 0.25 mL de ATC al 12.5% a una de las réplicas (y a todos los tubos de la curva estándar, incluido el blanco).
5. Se agregaron 0.25 mL de H₂O a la otra réplica (blanco de cada muestra).
6. Se leyó la absorbancia a 420 nm.

Determinación de colesterol: prueba enzimático-colorimétrico (CHOD-PAD)

Fundamento del método

La enzima 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 da origen a la formación de H_2O_2 el cual se valora por la reacción de Trinder, mediante el cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina, en presencia de peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, rosa, es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.



La técnica empleada fue la siguiente:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	---	10 μ L	---
Muestra	---	---	10 μ L
Reactivo al uso	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Proteínas oxidadas

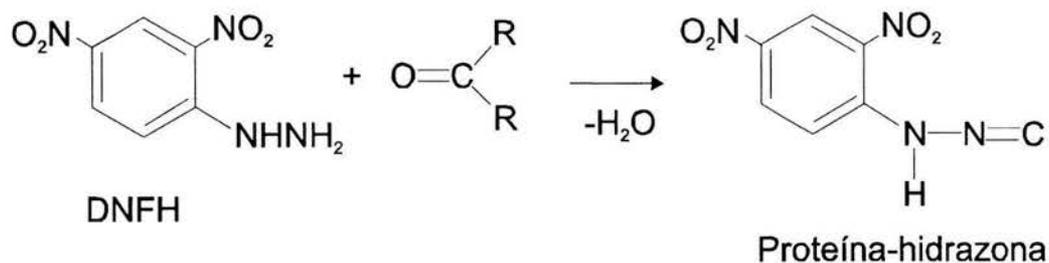
Las especies reactivas de oxígeno tienen una vida muy corta y son difíciles de detectar por un método directo. Una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidativo es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas, ejemplo de ello son los grupos carbonilo ($C=O$) que se originan por la acción de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas convirtiendo algunos residuos de aminoácidos (leucina, valina, lisina, prolina, arginina, treonina e isoleucina) a derivados carbonilo (146-148). Además, los grupos carbonilos también reflejan la presencia de productos de

fragmentación de reacciones de rompimiento de enlaces peptídicos, e incluso por la interacción de los aminoácidos de las cadenas laterales (grupos sulfhidrilo de la cisteína, grupos imidazol de la histidina y grupos amino de la lisina) con productos de lipoperoxidación (149) como 4-hidroxi-2-nonenal (150,151), acroleína (152) y malondialdehído (153); asimismo, resultado de reacciones de glicación/glico-oxidación (154) e indirectamente se forman derivados de *N*-carboximetil-lisina (155) que, debido a su fuerte capacidad quelante (156) son capaces de promover la generación de grupos carbonilo por reacciones catalizadas por metales (157).

Debido a que los derivados carbonilo son formados por diferentes procesos, se han desarrollado algunos métodos sencillos y altamente específicos para medir los carbonilos en las proteínas (158-162). Usando esos métodos, la medición de este parámetro ha sido ampliamente usada como marcador de daño mediado por las especies reactivas de oxígeno durante el estrés oxidativo.

Fundamento

Este método da evidencia indirecta de la actividad de las especies reactivas de oxígeno y se basa en la reactividad de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) para formar un complejo proteína-hidrazona.



Método

1. Se pesaron 100 mg de tejido (en el caso de las glándulas suprarrenales se ajustó el peso total de ambas glándulas) y se homogenizó en 900 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM con inhibidores de proteasas, EDTA 1 mM y tritón al 0.1%.
2. Se centrifugaron las muestras 20 min a 15300 rpm a 4°C en tubos eppendorf.
3. Las muestras se trataron con sulfato de estreptomicina al 10% durante 24 horas a 4°C, colocando 200 μ L de sulfato de estreptomicina más 600 μ L de homogenado.
4. Se centrifugaron 10 min a 5000 rpm a 4°C.
5. Se hicieron 2 tubos por muestra.
Blanco: 150 μ L de homogenado más 600 μ L de HCl 2.5M
Problema: 150 μ L de homogenado más 600 μ L de DNPH 10 mM
6. Se agitaron los tubos e incubaron 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Se agregaron 750 μ L de ATC 20%. Se agitaron en vortex y se incubaron los tubos a 4°C (refrigerador) por 10'.
8. Se centrifugaron por 10 min a 4°C a 5000 rpm.
9. Se decantó el sobrenadante de cada tubo.
10. Se resuspendieron los botones con 600 μ L de ATC al 10% a temperatura ambiente.
11. Se centrifugaron los tubos por 10 min a 5000 rpm a 4°C
12. Se decantaron el sobrenadante de cada tubo.
13. Se efectuaron 3 lavados con etanol-acetato de etilo (600 μ L).
14. Se centrifugaron los tubos 10 min a 5000 rpm a 4°C
15. Se dejó que se evaporara el etanol en el último lavado.
16. El botón fue resuspendido en 1 mL de guanidina 6M.
17. Se leyeron los tubos a 370 nm (visible)
18. Se preparó una curva de albúmina en guanidina como se indica a continuación:

[ASB] mg/mL	ASB (μL)	Guanidina-HCl 6.0 M (μL)
0.25	62.5	937.5
0.5	125	875
1.0	250	750
2.0	500	500

19. Se leyeron solo los tubos blanco (tratar con HCl) en esta curva para obtener el contenido de proteínas en el ensayo a 280 nm (U.V).
20. Se calibró con guanidina-HCl 6.0 M ó con el tubo de HCl 2.5 M de la respectiva muestra.

DETERMINACIONES HORMONALES

Progesterona

La medición de progesterona circulante se realizó empleando un estuche comercial de la marca Active® PROGESTERONA RIA DSL-3900.

Principio de la prueba

El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoanálisis en la cual existe una competencia entre un antígeno radiactivo y un no radiactivo por un número fijo de sitios de unión a anticuerpos. La cantidad de testosterona marcada [I-125] unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de testosterona no marcada presente. La separación del antígeno libre y el unido se logra decantando o aspirando los tubos de conteo de anticuerpos.

Procedimiento

Se permitió que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente (~25°C) y mezcló por inversión suave antes de utilizarlos. Después de la reconstitución de los estándares y los controles, se mezclaron, evitando la formación de espuma. Los estándares, controles y las muestras hicieron por duplicado.

1. Se marcaron dos tubos sin anti-progesterona para cuentas totales. Asimismo rotularon y arreglaron los tubos de cuentas con anti-progesterona por duplicado para los estándares, controles y las muestras.
2. Se adicionaron 25 µL de los estándares de progesterona, controles y las muestras a sus respectivos tubo. Depositando hasta el fondo del tubo.
3. Inmediatamente se agregaron 500 µL de la progesterona [I-125] a todos los tubos con ayuda de una repetidora.
4. Los tubos se mezclaron con vortex.
5. Posteriormente, los tubos se incubaron en un baño de agua a 37 ± 2 °C por 60 a 70 min.
6. Finalmente, los todos los tubos fueron decantados, excepto los tubos de cuentas totales, por inversión simultánea, manteniendo los tubos boca abajo en una cama de papel absorbente por uno o dos minutos. El exceso progesterona [I-125] en los tubos fue eliminada con hisopos de papel absorbente.
7. Todos los tubos se contaron en un contador gamma por un minuto.

Testosterona

La medición de progesterona circulante se realizó empleando un estuche comercial de la marca Active® TESTOSTERONE RIA DSL-4000.

Principio de la prueba

El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoanálisis en donde existe una competencia entre un antígeno radiactivo y un no radiactivo por un número fijo de sitios de unión a anticuerpos. La cantidad de testosterona marcada [I-125] unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de testosterona no marcada presente. La separación del antígeno libre y el unido se logra decantando o aspirando los tubos de conteo de anticuerpos.

Procedimiento

Se dejó que todos los reactivos del estuche alcanzaran la temperatura ambiente (~25°C) y mezclaron por inversión suave antes de utilizarlos. Después de la reconstitución de los estándares y los controles, se mezcló, evitando la formación de espuma. Los estándares, controles y las muestras se hicieron por duplicado.

1. Se marcaron dos tubos sin anti-testosterona para cuentas totales. Del mismo modo se rotularon y arreglaron los tubos de cuentas con anti-testosterona por duplicado para los estándares, controles y las muestras.
2. Se adicionaron 50 µL de los estándares de testosterona, controles y las muestras a sus respectivos tubo asegurándose que el depósito se efectúe hasta el fondo del tubo.
3. Inmediatamente se agregaron 500 µL de la testosterona [I-125] a todos los tubos.
4. Los tubos se mezclaron con ayuda de un vortex.
5. Posteriormente, todos los tubos se incubaron en un baño de agua a 37 ± 2 °C por 60 a 70 min.
6. Finalmente, todos los tubos, excepto los tubos de cuentas totales se decantaron por inversión simultánea, manteniéndose los tubos boca abajo en una cama de papel absorbente por uno o dos minutos. El exceso de testosterona [I-125] fue retirada con hisopos de papel absorbente.
7. Todos los tubos se contaron en un contador gamma por un minuto.

Estradiol

La medición de progesterona circulante se realizó empleando un estuche comercial de la marca DPC COAT-A-COUNT

Principio del análisis

El procedimiento Coat-A-Count Estradiol se basa en la utilización de tubos recubiertos con anticuerpos. El estradiol marcado con I^{125} compete con el estradiol de la muestra del paciente por los sitios de unión en los anticuerpos. Después de la incubación, el estradiol unido se separa del estradiol libre por decantación. Luego el tubo se cuenta en un contador gamma. La cantidad de cuentas es inversamente proporcional con la cantidad de estradiol presente en la muestra. La cantidad de estradiol en la muestra se determina comparando las cuentas con la curva de calibración.

Procedimiento

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15-28°C) antes del uso.

1. Tubos de ensayo: Se rotularon dos tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12x75 mm para cuentas totales.

Tubos recubiertos: Se marcaron catorce tubos recubiertos de anticuerpo: A (máxima unión) y B hasta G por duplicado así como los tubos necesarios recubiertos de anticuerpo, también en duplicado, para controles muestras.

Calibrador pg/mL pmol/L		
A(MB)	0	0
B	20	73
C	50	184
D	150	551
E	500	1836
F	1800	6608Z
G	3600	13216

2. Se agregaron 100 μ L del calibrador cero A en el tubo A y 100 μ L de cada uno de los calibradores B-G en los tubos correspondientes marcados así como 100 μ L tanto de los controles y de las muestras de suero en los tubos preparados, asegurándose depositar hasta el fondo del tubo.
3. Inmediatamente se añadió 1.0 mL de I^{125} -estradiol a todos los tubos, mezclando en el vortex.
4. Todos los tubos se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente (15-28°C).
5. Posteriormente, los tubos se decantaron dejando escurrir durante 2 o 3 min, enseguida se eliminó todo el exceso de estradiol marcado con un hisopo de papel absorbente para mejorar la precisión.
6. Los tubos se contaron durante un minuto en un contador gamma.

EVALUACIÓN MOLECULAR

Extracción de ARN total por el método de Chomczynski y Sacchi modificado

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 instante de la ruptura de las células y disolución de los componentes celulares, adicionando cloroformo seguido de centrifugación, se logra separar en la fase acuosa el ARN mediante la precipitación de isopropanol.

1. El tejido (20 a 100 mg) se homogenizó con un politrón en 2 mL de TRIZOL®.
2. Se incubó el homogenado por 5 min en hielo.
3. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a las muestras 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de solución.
4. Las muestras se agitaron vigorosamente.
5. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C.
6. Del paso anterior se obtiene la fase acuosa la cual fue transferida a otro tubo estéril.
7. A esta fase se le agregan 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de la solución inicial agitándose suavemente.
8. Las muestras fueron incuban por 10 min a 4°C.
9. Una vez concluido el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.
10. Inmediatamente se decantó el sobrenadante.
11. La pastilla fue lavada con etanol al 75% y centrifugado por 10 minutos a 4°C.
12. Los pasos 9 y 10 centrifugando 5 min se repitieron un par de veces.
13. Finalmente, la pastilla resultante se disolvió con agua tratada con DEPC, el volumen varió dependiendo el tamaño de la pastilla obtenida.
14. El ARN total fue cuantificado en un espectrofotómetro para determinar la densidad óptica a 260 y a 280nm. La relación de los valores de densidad óptica 260/280 debe estar entre 1.7-2.0, esto asegura que la muestra está libre contaminantes. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 40 µg de ARN por mL.

Electroforesis de ARN en gel de agarosa al 1%.

Preparación del gel de agarosa al 1%.

1. Se disolvieron 0.5 g agarosa en 37.5 mL de agua desionizada estéril por calentamiento. Una vez disuelta se dejó enfriar a una temperatura de aproximadamente 50°C.

2. Posteriormente, se le añadió lo siguiente:
 - 4.15 mL de MOPS
 - 8.13 mL de formaldehído al 37%
 - 0.5 μ L de bromuro de etidio
3. Se mezcló muy bien y vació en una cámara de electroforesis y se dejó que polimerizará por 20 min.

Preparación de la muestra de ARN total para correr en gel de agarosa al 1% por electroforesis

4. Se colocó a baño María a 60°C durante 10 min en un baño de agua, una mezcla de ARN total equivalente a 10 μ g y 23 μ L de la solución desnaturalizante (ver anexos: Soluciones).
5. Pasado el tiempo, se retiró del baño y se colocó en hielo inmediatamente.
6. Posteriormente se añadieron a cada muestra 3 μ L de solución de carga (ver anexo 8. Soluciones).
7. A la cámara de electroforesis previamente montada, ya con el gel de agarosa al 1%, y se le agregó la mitad del amortiguador de corrida (ver anexos: Soluciones) .
8. Enseguida se depositaron las muestras en los pozos del gel, la cámara se conectó a una fuente de poder y se corrió a 45 volts por 4 h.
9. Se observa el gel con luz U.V. para confirmar que el corrimiento sea el adecuado.
10. Transcurrido el tiempo el gel de agarosa se observó en un transiluminador de U.V para verificar que los ARNs estuvieran en buenas condiciones tomándosele una foto al gel.
11. Los ARNs separados en el gel de agarosa se transfirieron a una membrana de nylon por capilaridad con un buffer de transferencia (ver anexo 8. Soluciones).

12. El tiempo de transferencia fue de 12 h, al terminó de este periodo la membrana se observó en un transiluminador de UV para verificar que la transferencia se haya efectuado.
13. La membrana se lavó con agua desionizada estéril y los ARN se fijaron por exposición a UV en un Crosslinker.
14. Las membranas se mantuvieron en refrigeración hasta que fueron utilizadas.

Diseño de las sondas de la enzima P450scc y la proteína StAR

Las sondas de la enzima P450scc y la proteína StAR fueron preparadas empleando los oligonucleótidos previamente diseñados en base a las secuencias publicadas en el Genbank de cada uno de los genes de estas dos proteínas. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se extrajo ARN total de ovario de rata a través del método de Chomczynski y Sacchi modificado (ver anexos) (128).
2. Una vez obtenido el ARN total de ovario, se procedió a obtener los ARN mensajeros empleando el estuche comercial SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR como se describe a continuación:

Agregar en tubo eppendorf :

ARN (1-3µg)	3.0 µg
DNTPs (10mM)	1.0 µL
Oligo de T	1.0 µL
H ₂ O- DEPC	7.5 µL
Vol Final	10.0 µL

Incubar a 65°C por 5 min en hielo.

Adicionar 9 µL de mezcla, preparada de la siguiente manera:

2.0 µL de 10X RT amortiguador

4.0 μL de MgCl_2 25 mM

1.0 μL RNAasa OUT

2.0 μL de DTT 0.1M

Incubar a 42°C por 2 min.

Agregar 1.0 μL de Super Script II RT, mezclar e incubar a 42°C por 50 min.

Incubar a 70°C por 15 min en hielo.

Agregar 1.0 μL de RNAasa H e incubar a 37°C por 20 min.

Efectuar las siguientes incubaciones:

1. 65 °C por 5 min.

2. 42°C por 5 min.

3. 42°C por 55 min.

4. 70°C por 15 min.

5. 37°C por 30 min.

3. Terminada esta serie de incubaciones, el producto resultante son los ARN mensajeros.

4. Con estos ARN mensajeros y empleando los oligonucleótidos diseñados para la enzima P450scc y la proteína StAR como cebadores se realizó una reacción de PCR (una para la P450scc y otra para la proteína StAR), cuyo producto final fue la sonda de cada una de estas proteínas.

Hibridación del cADN de la enzima P450scc

Una vez que se transfirió el ARN total a la membrana de nylon, esta fue sometida al siguiente proceso :

Prehibridación de la membrana de nitrocelulosa que contiene los ARN totales.

1. Se lavó la membrana de nitrocelulosa con agua desionizada estéril.

2. Se calentaron 10 mL de la solución de Quikhyb a 68 °C por 15 min, la solución de ser agitada vigorosamente antes de tomar la cantidad los 10 mL. (la cantidad

de solución de hibridación depende del tamaño de la membrana (150 μL por centímetro cuadrado de membrana).

3. La membrana fue colocada dentro de una bolsa de plástico más los 10 mL de la solución de Quikhyb previamente calentados, eliminando las burbujas formadas en la bolsa y especialmente las que se encuentren sobre la membrana, finalmente la fue sellada y puesta a baño maría con agitación en un baño de agua durante 24 h a 68 °C.

Hibridación (marcaje de la sonda específica de la P450scc)

4. En un tubo eppendorf se colocaron 5 μL de sonda de la P450scc en 16 μL de agua destilada estéril.
5. La sonda fue desnaturalizada en agua hirviendo por 5 min.
6. Concluido el tiempo inmediatamente se puso tubo con la sonda en hielo.
7. Posteriormente, se le agregaron en el siguiente orden:

1 μL 500 μM dATP

1 μL 500 μM dGTP

1 μL 500 μM dTTP

20 μL 2.5X solución random primers

5 μL de P^{32}

8. Con ayuda de una micropipeta subir y baja la mezcla de tal forma que esta se homogenice.
9. Enseguida se le agregó 1 μL del fragmento Klenow y se incubó a 37 °C por 10 min.
10. Concluido el tiempo de incubación se le adicionaron 5 μL de solución amortiguadora de paro y se mantuvo en hielo.

Preparación de la columna de purificación

11. En el interior de la columna (una jeringa para insulina) se colocó fibra de vidrio estéril.
12. Posteriormente, se le añadió sephadex G-50 y se centrifugó por 2 min a 1500 rpm. Se repitió la centrifugación hasta que se logró que la columna quedara bien empacada.
13. Enseguida, se agregó a la columna la sonda de la P450scc marcada y se centrifugó a 1500 rpm x 2 min. La sonda fue recolecta en el tubo eppendorf y se verificó que el tubo y la columna contuvieran la misma cantidad de radioactividad, para ello se empleo un contador Geiger.
14. **Una vez que se obtuvo la sonda de la P450scc esta fue desnaturalizada en agua en ebullición (aproximadamente 98°C) por 5 min.**
15. En el tiempo desnaturalización de la sonda, se retiraron 1.5 mL de la solución (Quikhyb) de prehibridación de la bolsa, mezclándose con la sonda ya desnaturalizada. La mezcla se regresó a la bolsa y sello muy bien, teniendo cuidado de no dejar burbujas ni fugas de material radioactivo.
16. Finalmente, se incubó a baño maría a 68 °C durante una noche en agitación en baño de agua.
17. Concluido el tiempo de hibridación, la bolsa se abrió y la solución radiactiva se colocó en un tubo cónico de 15 mL con tapa y se prosiguió al lavado de la membrana.

Lavado de la membrana

18. La membrana fue lavada dos veces con la solución amortiguadora SSC 2X a temperatura ambiente, con agitación durante 20 min por cada lavado.
19. Al término de los dos lavados con el buffer SSC 2X, la membrana fue sometida a un lavado más con el buffer SSC 0.1X–SDS 0.1% a 59 °C por 45 min en agitación.

20. Finalmente, la membrana se colocó en una bolsa de plástico y se puso dentro de un cassette sobre una placa fotográfica toda la noche,
21. La placa fue revelada y se midió la talla de la banda obtenida.

Hibridación de la sonda de ADNc de StAR

Una vez que se transfirió el ARN total a la membrana de nylon, esta fue sometida al siguiente proceso:

Prehibridación de la membrana de nitrocelulosa que contiene los ARN totales.

1. Se lavó la membrana de nitrocelulosa con agua desionizada estéril.
2. Se calentaron 10 mL de la solución de Quikhyb a 68 °C por 15 min, la solución debe ser agitada vigorosamente antes de tomar la cantidad los 10 mL. (la cantidad de solución de hibridación depende del tamaño de la membrana (150 μ L por centímetro cuadrado de membrana).
3. La membrana fue colocada dentro de una bolsa de plástico más los 10 mL de la solución de Quikhyb previamente calentados, eliminando las burbujas formadas en la bolsa y especialmente las que se encuentren sobre la membrana, finalmente la bolsa fue sellada y puesta a baño maría con agitación durante 24 h a 68 °C.

Hibridación (marcaje de la sonda específica de la proteína StAR)

4. En un tubo eppendorf colocaron 2.5 μ L de sonda de la P450scc en 18.5 μ L de agua destilada estéril.
5. La sonda fue desnaturalizada en agua hirviendo por 5 min.
6. Concluido el tiempo inmediatamente se puso tubo con la sonda en hielo.
7. Posteriormente, se le agregaron en el siguiente orden:

- 1 μL 500 μM dATP
 - 1 μL 500 μM dGTP
 - 1 μL 500 μM dTTP
 - 20 μL 2.5X solución "random primers"
 - 5 μL de P³²
8. Con ayuda de una micropipeta subir y baja la mezcla de tal forma que esta se homogenice.
 9. Enseguida se le agregó 1 μL del fragmento Klenow y se incubó a 37 °C por 10 min.
 10. Concluido el tiempo de incubación se le adicionaron 5 μL de Buffer stop mantuvo en hielo.

Preparación de la columna de purificación

11. En el interior de la columna (una jeringa para insulina) se colocó fibra de vidrio estéril.
12. Posteriormente, se le añadió sephadex G-50 y se centrifugo por 2 min a 1500 rpm. Se repitió la centrifugación hasta que se logró que la columna quedara bien empacada.
13. Enseguida, se agregó a la columna la sonda de la proteína StAR marcada y se centrifugó a 1500 rpm x 2 min. La sonda marcada fue recolectada en el tubo eppendorf y se verificó que el tubo y la columna contuvieran la misma cantidad de radioactividad, para ello se empleo un contador Geiger.
14. Una vez que se obtuvo la sonda de la proteína StAR esta fue desnaturalizada en agua en ebullición (aproximadamente 98°C) por 5 min.
15. En el tiempo desnaturalización de la sonda, se retiraron 1.5 mL de la solución (Quikhyb) de prehibridación de la bolsa, mezclándose con la sonda ya desnaturalizada. La mezcla se regresó a la bolsa y sello muy bien, teniendo cuidado de no dejar burbujas ni fugas de material radioactivo.
16. Finalmente, se incubó a baño maría a 68 °C durante una noche en agitación en baño de agua.

17. Concluido el tiempo de hibridación, la bolsa se abrió y la solución radiactiva se colocó en un tubo cónico de 15 mL con tapa y se prosiguió al lavado de la membrana

Lavado de la membrana

18. La membrana fue lavada dos veces con solución amortiguadora SSC 2X a temperatura ambiente, con agitación durante 20 min por cada lavado.

19. Al término de los dos lavados con la solución amortiguadora SSC 2X, la membrana fue sometida a un lavado más con solución amortiguadora SSC 0.1X–SDS 0.1% a 42 °C por 45 min en agitación.

20. Finalmente, la membrana se colocó en bolsa de plástico y se puso dentro de un cassette sobre una placa fotográfica por 2 h.

21. La placa fue revelada y se midió la talla de las bandas obtenidas.

SOLUCIONES

-Albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05% 50 mg de ASB en 100ml de H₂O de estilada.

-Solución A:

Na₂CO₃ al 2% 20 g en 1000 mL

NaOH al 0.4% 4 g en 1000 mL

Tartrato de sodio al 0.02% 0.2 g en 1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

-Solución B:

CuSO₄ al 0.5% 0.5 g en 100 mL

Almacenar a temperatura ambiente

-Solución C (Se prepara al momento del ensayo)

	25 tubos	50 tubos
Solución A	25 mL	50 mL
Solución B	0.5 mL	1 mL

-Solución D (Se prepara al momento del ensayo)

Folín 1 N (diluir el folín 2.0 N 1:2 con Agua destilada)

-Amortiguador de homogenización: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 con leupeptina (5 µg/mL), pepstatina A (7 µg/mL) y aprotinina (5 µg/mL) y EDTA 1 mM.

	250 ml	1000 ml
KH₂PO₄	1.0522 g	4.209 g
Na₂HPO₄	0.677 g	2.707 g
EDTA-Na₂	0.093 g	0.3723 g
Leupeptina	1.25 mg	5.0 mg
Pepstatina A	1.75 mg	7.0 mg
Aprotinina	1.25 mg	5.0 mg

Se disuelve en un volumen menor y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH, se afora al volumen requerido y se almacena en refrigeración.

-Solución de HCl 2.5 M (0.5 L):

-Guanidina-HCl 6.0 M:

A. fosfatos 50 mM	100 ml	250 ml
Guanidina-HCl 6.0 M	57.31 g	143.29 g

-DNPH 10 mM:

HCl 2.5 M	10 ml	25 ml	50 ml
DNPH 10 mM	19.8 mg	49.5 mg	99.0 mg

Reactivos para Northern blot

-Agua con DEPC al 0.1%

Agua desionizada estéril 100 μ L

Dietilpirocarbonato 100 μ L

Incubar 24 hrs. a 37°C

Esterilizar dos veces

-MOPS 12X

Ácido propanesulfónico 3-N-morfolino 5.65 g

Acetato de sodio 0.06 M 6 mL

Etilendinitrotetracetato disódico (EDTA) 2.4 mL

0.5 M pH 8

Agua destilada desionizada estéril 100 mL

-Gel de agarosa al 1%

Agarosa 0.5 g

Agua destilada desionizada estéril 37.5 mL

MOPS 12X 37.5 mL

Formaldehído al 37% 8.13 mL

Bromuro de etidio 0.5 μ L

-Solución desnaturalizante

Formamida 500 μ L

MOPS 12X 83 μ L

Formaldehído al 37% 162 μ L

-Solución buffer de carga

Azul de bromofenol 0.25%

Cianol-xileno	0.25%
Ficoll 400	15.0%
-MOPS 1X	
MOPS 12X	21mL
Agua destilada desionizada estéril	Aforar hasta 250 mL
-SSC 10X	
NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
Agua estéril	Aforar a 1L
-SDS 0.1%-SSC 0.1X	
SSC 20X	1.25 mL
SDS al 7%	3.57 mL
Aforar a 250 mL	
•	