



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CICLOSPORINA Y
TACROLIMUS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEINURIA EN
RATAS CON SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:

PEDIATRÍA

PRESENTA:

DRA. MARICELA LUNA SANDOVAL

TUTOR DE TESIS

DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO

COTUTORA DE TESIS

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2009



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

65 AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA
Salud para las Nuevas Generaciones



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CICLOSPORINA Y TACROLIMUS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEINURIA EN RATAS CON SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL.

Dr. José Ignacio Santos Preciado

Director General

Dra. Yolanda Rocío Peña Alonso

Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Dra Mara Medeiros Domingo

Asesora de tesis.

Biol: Ana María Hernández Sánchez

Cotutor de tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y la oportunidad de estar en esta gran institución, y contribuir con un granito de arena y poder ayudar a esas personitas que tanto nos necesitan.

A mi Padre que en gran parte es la fuerza que me mantiene al pie de mi objetivo y aunque físicamente ya no está conmigo, sé que me apoya y cuida de mí.

A mi madre linda y querida, que no cuestiona mis decisiones y simplemente me apoya y está ahí para darme ánimos y dejarme ser.

A mis hermanos Lupi, Ani, Tere, Toni y Pepe gracias por todo el cariño y apoyo incondicional que siempre me brindan, y sé que siempre puedo contar con ustedes.

A mis sobrinos gracias por existir y ser mi primer estímulo en este largo pero hermoso camino.

A ti por ser parte de mi vida, por hacer cada momento maravilloso e inolvidable, por tu apoyo, por no dejarme caer en momentos de flaqueza y por amarme tanto.

A mis suegros también gracias por todo el cariño y apoyo brindado, y por estar siempre pendiente de mi desarrollo profesional.

Dra. Mara, muy en especial a usted, mil gracias por aceptar ser mi asesora en este proyecto, por su paciencia, apoyo y enseñanza, en verdad la admiro mucho, y es el mejor ejemplo a seguir.

Anita también gracias por todo el apoyo en la realización de este trabajo, pues sin ti, simplemente no lo hubiese logrado.

A todos simplemente gracias.

Maricela.

ÍNDICE

1. Introducción y Marco teórico	1
2. Planteamiento del problema	10
3. Justificación	11
4. Objetivos	11
5. Hipótesis	11
6. Variables	12
7. Descripción de variables	12
8. Diseño Metodológico	13
9. Consideraciones éticas	16
10. Análisis estadístico	17
11. Resultados	18
12. Discusión	22
13. Conclusiones	23
14. Referencias	24
15. Anexos.....	27

1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

Síndrome nefrótico

El síndrome nefrótico (SN), es un estado clínico caracterizado, por proteinuria masiva, ($>40\text{mg}/\text{m}^2\text{sc}/\text{h}$ ó relación proteína/Cr >2.0), hipoalbuminemia ($<25\text{ g/l}$), hiperlipidemia (colesterol $> 200\text{mg}$ y triglicéridos $> 200\text{mg}$) y edema. El edema es el resultado del desbalance entre la presión hidrostática y la presión osmótica coloidal en los compartimentos intravascular y extracelular. Con la albúmina sérica por debajo de 20 g/l , los mecanismos compensatorios se alteran, tales como la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona, con incremento de reabsorción tubular de sodio, ocasionando aumento en la formación de edema (1). El síndrome nefrótico, puede ser primario o secundario, el primero se a relacionado a alteraciones genéticas, y el segundo debido a infecciones, drogas, alérgenos, venenos, inmunizaciones, enfermedades sistémicas, metabólicas, hereditarias y neoplasias (2).

En el síndrome nefrótico idiopático el 80% de los niños responden al tratamiento con esteroides, denominándose corticosensibles, siendo la lesión histológica más frecuente la de cambios glomerulares mínimos en un 80%, con fusión de los podocitos al ser observados en la microscopía electrónica (ME), sin depósitos en la inmunofluorescencia. Mientras que entre el 5 - 10% de los niños con SN no responden al tratamiento con esteroides por lo que se les denomina corticorresistentes, y la principal lesión histopatológicas encontrada es la glomeruloesclerosis focal y segmentaria en 75% de los casos (3), estos pacientes pueden presentar complicaciones extrarrenales del Síndrome Nefrótico, además del riesgo de desarrollar Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT).

Otras alteraciones histopatológicas que podemos encontrar en el síndrome nefrótico se describen en el siguiente cuadro con sus respectivos porcentajes de presentación:

Cuadro I. Hallazgos histopatológicos en el Síndrome Nefrótico idiopático.

Tipo de lesión Glomerular	Porcentajes %
Lesiones Glomerulares Mínimas	77
Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria	10
Glomerulonefritis Membrano proliferativa	5
Proliferación Mesangial Difusa	3
Glomerulonefritis Endo y Extracapilar Focal o Difusa	3
Glomerulonefritis Membranosa	2

Las enfermedades que causan el síndrome nefrótico pueden ser divididas en tres categorías:

- 1.- Enfermedades donde el mecanismo del daño es mediado por anticuerpos como ejemplo, (Lupus, Glomerulonefritis membranoproliferativa, y nefropatía membranosa)
- 2.- Enfermedades que están asociadas con desordenes metabólicos, y como ejemplo (Diabetes, Amiloidosis, y enfermedad de Fabry)
- 3.- Enfermedades que son causadas por la función anormal celular glomerular.

En la actualidad se sugiere que prácticamente en todos los casos de esta última categoría inician con el daño o disfunción del podocito. Por esta razón estas enfermedades han sido clasificadas como Podocitopatías (4), Siendo la característica principal la proteinuria.

La proteinuria supone una falla de la barrera de filtración glomerular, esta barrera limita el paso de macromoléculas fundamentalmente en función del tamaño (5).

Esta barrera de filtración glomerular esta compuesta por tres capas:

- 1 - El endotelio fenestrado.
- 2.- La membrana basal glomerular (MBG).
- 3.- La hendidura del diafragma que es la zona que queda entre los procesos pedicelares de los podocitos.

El endotelio es donde se encuentran los poros o fenestraciones, que permiten la separación mecánica de los elementos de la sangre y el plasma, estos poros miden aproximadamente de 70 a 100 nm. de diámetro. La superficie de la célula endotelial esta cargada negativamente por la presencia de una glucoproteína polianiónica, la podocalixina (PCX), que es la principal proteína glomerular.

La membrana basal glomerular se compone de dos capas finas, la lámina rara interna y la lámina rara externa y una capa central gruesa llamada lámina densa.

Las células endoteliales y epiteliales adyacentes secretan moléculas tales como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, nidogen y proteoglicanos de heptarán sulfato que forman una estructura, semejante a un enrejado donde hay sitios aniónicos los glucosaminoglicanos de heptarán sulfato en las tres capas que componen la MBG si alguno de ellos se altera hay un incremento de la permeabilidad de la membrana basal glomerular (5).

El tercer elemento de la barrera de filtración glomerular lo constituyen las células epiteliales viscerales o podocitos estas se derivan del mesénquima, son células altamente diferenciadas debido a la inactividad del ciclo celular dada por la regulación de los inhibidores de las ciclinkinas durante la glomerulogénesis (6),

por lo que se dice que existe un número de podocitos inicial, que se pierden en forma progresiva e irreversible en el transcurso de la lesión glomerular. Sus funciones principales son las siguientes:

- 1.- Crear una barrera de tamaño para proteínas.
- 2.- Crear una barrera de carga.
- 3.- Mantenimiento de la forma del asa glomerular.
- 4.- Contrarrestar la presión intraglomerular.
- 5.- Síntesis y mantenimiento de la MBG.
- 6.- Productor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

La superficie del podocito puede ser dividida en tres dominios con diferentes localizaciones, componentes proteicos y funcionales (6). En cada dominio existen proteínas que son fundamentales para el mantenimiento y la integridad del mismo, y para la estabilidad global de la arquitectura del podocito (7).

Dominios proteicos de los podocitos.

Dominio apical o Proteínas estructurales: este corresponde a las proteínas del vértice superior del podocito estas proteínas son, la podocalixina, ezrina, complejo NHERF-2

Dominio del diafragma de filtración o Proteínas de la barrera de filtración: la principal responsable de la propiedad de selectividad del diafragma es la nefrina. A este nivel también encontramos la P-cadherina, neph-1, podocina, CD2AP, ZO-1, filtrina.

Dominio basal de anclaje o Proteínas de anclaje: es el encargado de fijar al pedicelo a la membrana basal glomerular, encontramos al distroglicano, el complejo integrina $\alpha\beta$, y la megalina (7, 8). Se ha comprobado que el defecto de alguna de estas proteínas es causa de proteinuria en humanos y/o animales de experimentación (5).

La proteinuria es un factor de riesgo para la progresión de la insuficiencia renal y para mortalidad cardiovascular, en la actualidad disponemos de fármacos capaces de disminuir la proteinuria como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), antagonistas de receptores de angiotensina II (ARA II), esteroides e inhibidores de calcineurina como la ciclosporina (CsA) y tacrolimus (FK). Sin embargo no se conoce claramente la patogenia de la proteinuria y sobre el mecanismo de acción de estos fármacos (5).

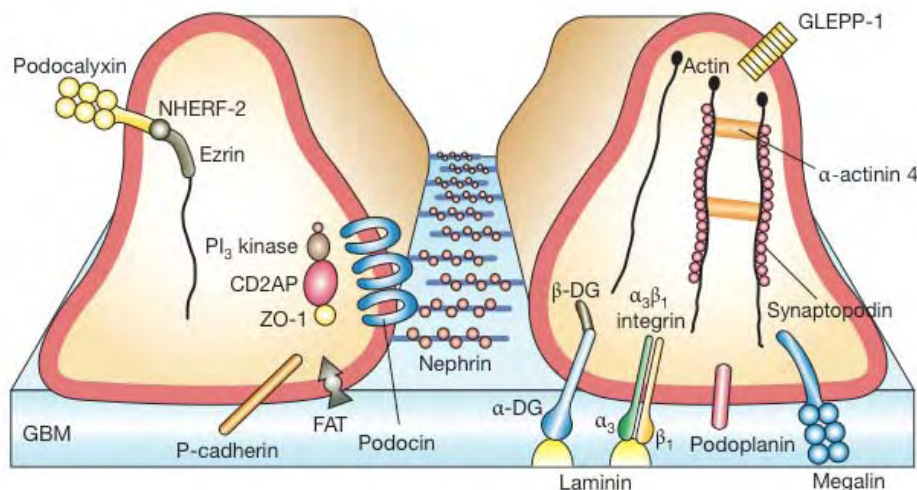


Figura 1. Estructura del podocito y del diafragma de filtración

TACROLIMUS Y CICLOSPORINA EN SÍNDROME NEFRÓTICO.

La ciclosporina y tacrolimus ejercen sus propiedades inmunosupresoras en caminos similares de transducción intracelular al ser ambos inhibidores de calcineurina.

La ciclosporina produce una inhibición reversible de la activación linfocitaria específica de los linfocitos T. En la superficie del linfocito la CsA se une a un receptor de membrana y penetra en la célula; es transportada al citoplasma donde se une a la ciclofilina posteriormente este complejo se une a la calcineurina e inhibe la actividad de la fosfatasa de calcineurina, para luego penetrar a continuación en el núcleo donde altera la transcripción del RNA mensajero codificado para linfocinas. Así, inhibe específicamente la producción de IL-2 y disminuye la respuesta del linfocito precitotóxico a la IL-1. Por este mecanismo, disminuye la proliferación de los linfocitos T activados por la IL-2 y suprime la proliferación de linfocitos T citotóxicos; también bloquea la producción del factor inhibitorio de migración de los macrófagos, del interferón y del factor de crecimiento de las células B (9).

El tacrolimus (FK506), al igual que la ciclosporina, se une a inmunofilinas citoplasmáticas pero en vez de unirse a la ciclofilina, se une a la fugifilina también conocida como FKBP12 (FK binding protein 12) El complejo tacrolimus-fugifilina se une a los complejos calcineurina/calmodulina y bloquea su actividad como fosfatasa, de esta manera evita la desfosforilación y translocación del factor nuclear de activación de linfocitos, con lo que impide la transcripción del gen de interleucina IL 2, IL 3, IL 4, IL 5, factor estimulante de granulocitos, factor de necrosis tumoral alfa e interferón gama; el efecto final es una inhibición en la activación y proliferación de células T citotóxicas. También puede alterar la función de la célula epitelial renal tubular, ya que el neurotransmisor en los nervios simpáticos renales, norepinefrina, regula la actividad de la Na⁺, K⁺ - ATPasa en el túbulo proximal en una manera bidireccional que estimula adrenorreceptores alfa y beta que es mediada por la calcineurina.

La ciclosporina A (CsA) ha demostrado ser útil en el manejo del síndrome nefrótico idiopático tanto de primera intención como en los casos de corticorresistencia, corticodependencia y recaídas frecuentes y el porcentaje de remisión se informa de 36-87%, según la serie (10) También la CsA es capaz de disminuir la proteinuria en ratas nefróticas, aún cuando en el modelo animal el síndrome nefrótico se debe al efecto tóxico de un fármaco y no a un trastorno inmunológico como puede suceder en la práctica clínica, de esta manera hay dos acciones de la CsA en el síndrome nefrótico, la primera es la acción inmunológica, presumiblemente dirigida al factor de permeabilidad glomerular secretado por linfocitos T, la segunda acción no es inmunológica y se debe tanto a una disminución en la velocidad de filtración glomerular como a la disminución de la permeabilidad a la albúmina por la pared capilar glomerular (11-14). En el caso específico del modelo nefrótico por ANP se ha postulado que la CsA tiene efecto benéfico al aumentar la expresión de enzimas antioxidantes(15). En contraste con la ciclosporina, el tratamiento de síndrome nefrótico con tacrolimus ha sido reportado en pocos casos con buenos resultados aún en pacientes que no habían respondido a ciclosporina, también se han documentado casos por diversos grupos de trasplante en donde pacientes con proteinuria masiva mejoran al ser convertidos de ciclosporina a tacrolimus (16-20).

En un estudio realizado para valorar la biodisponibilidad de la ciclosporina en ratas con síndrome nefrótico experimental observamos que el síndrome nefrótico incrementa la biodisponibilidad de CsA en 40% comparado con el grupo control debido a disminución en la distribución y en la eliminación del fármaco. El aumento en el área bajo la curva de concentración plasmática vs. Tiempo se relacionó con los niveles de colesterol, ya que la ciclosporina es un fármaco altamente lipofílico (21).

SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL

Existen diferentes modelos animales de síndrome nefrótico utilizando nucleótidos como aminonucleósido de puromicina (ANP) o adriamicina la secuencia de eventos clínicos e histopatológicos se han caracterizado detalladamente (22, 23), en el caso del ANP en ratas se emplea una dosis única subcutánea de 150 mg/Kg diluida al 2% en solución salina isotónica, la evolución en el tiempo se ha descrito de la siguiente manera: las ratas desarrollan proteinuria en los días 4 a 30 y presentan hipoproteinemia en los días 4 a 16, que se considera la etapa nefrótica, posteriormente la proteinuria va desapareciendo después del día 30, también hay incremento en los lípidos séricos incluyendo colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta y de baja densidad durante la etapa nefrótica (22, 24).

Se sabe que existe cambio en la expresión de las proteínas del diafragma glomerular en el síndrome nefrótico experimental. El RNAm de nefrina disminuye desde las dos horas después de la administración de ANP. En el día 1 hay cambio en el patrón de localización de la podocina de linear a granular. La cantidad de nefrina y podocina disminuyen significativamente en la etapa nefrótica (25).

Nakoul y colaboradores reportaron que en animales con síndrome nefrótico inducido por adriamicina hay disminución de nefrina en el tejido renal y que el tratamiento con enalapril y mofetilmicofenolato reducen la proteinuria y aumentan la expresión de nefrina en estos animales.

Los cambios morfológicos en nefrosis por aminonucleósido de puromicina incluye pronunciada ineficacia y fusión de procesos pedicelos, lo cual es consistente con las características morfológicas del síndrome nefrótico tipo Filandés (1).

Después de la administración de ANP se observa que antes de iniciar la proteinuria hay cambios en la distribución de nefrina y podocina; la podocina disminuyó y los procesos pedicelos se hincharon. Los cambios cuantitativos en

podocina fueron más tempranos que nefrina (podocina al segundo día, mientras que nefrina al quinto día) (26).

La Hsp27 es una proteína de bajo peso molecular identificada en los podocitos, Smoyer y Ransom encontraron que esta proteína es capaz de regular morfológicamente la actina del citoesqueleto ante la respuesta de los podocitos al daño inducido por PAN. En la nefrosis por aminonucleósido de puromicina en ratas, parece ser que la α -actinina-4 es una proteína blanco para toxicidad por PAN (27).

Se ha observado una redistribución de nefrina, podocina, CD2AP y α actinina-4 en pacientes con síndrome nefrótico con mutaciones en el gen NPHS2 y en ratas nefroticas con aminonucleósido de puromicina (28)

En ratas también se ha observado cambios relacionados con borramiento de los pedicelos ocurre en minutos ante la infusión intrarrenal de sulfato de protamina, y la morfología normal del podocito puede ser restaurada en minutos ante la infusión de heparán sulfato (26).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome nefrótico es una entidad frecuente en niños, reportándose en el hospital infantil de México 35-40 casos nuevos anualmente, representando 26% de las admisiones al departamento de nefrología.

Para su tratamiento se han propuesto diferentes líneas de tratamiento, como primera opción se han utilizado esteroides del tipo de la prednisona, con la cual observamos disminución de la proteinuria a partir de las 4-6 semanas de tratamiento, pero un grupo reducido de pacientes no responden a tratamiento esteroideo, y es necesario buscar otras alternativas terapéuticas como son los inhibidores de calcineurina, ciclosporina y tacrolimus, Diversos estudios confirman que estos fármacos disminuyen de forma importante la proteinuria, aunque se desconoce la acción específica ejercida en el diafragma de filtración, La ciclosporina A (CsA) ha demostrado ser útil en el manejo del síndrome nefrótico idiopático tanto de primera intención como en los casos de corticorresistencia, corticodependencia y recaídas frecuentes. En contraste con la ciclosporina, el tratamiento de síndrome nefrótico con tacrolimus ha sido reportado en pocos casos con buenos resultados aún en pacientes que no habían respondido a ciclosporina. Una de las preocupaciones del uso de estos fármacos es que pueden ocasionar nefrotoxicidad.

3. JUSTIFICACIÓN

La ciclosporina, un inhibidor de calcineurina menos potente que el tacrolimus, es capaz de disminuir la proteinuria tanto en pacientes como en modelos animales de síndrome nefrótico. Existen reportes clínicos que sugieren que el tacrolimus puede ser de utilidad en el manejo de los pacientes con síndrome nefrótico.

No se conoce el efecto del tacrolimus sobre ratas con síndrome nefrótico experimental.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de tacrolimus y ciclosporina sobre la proteinuria de ratas con síndrome nefrótico experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar los valores de albúmina sérica en ratas con síndrome nefrótico experimental.
- Evaluar los valores de colesterol sérico en ratas con síndrome nefrótico experimental..
- Evaluar los valores de triglicéridos séricos en ratas con síndrome nefrótico experimental.

5. HIPÓTESIS

La administración de los inhibidores de calcineurina tacrolimus y ciclosporina reducen la proteinuria en ratas con síndrome nefrótico experimental.

6. VARIABLES

6.1 Variables independientes:

- Tacrolimus
- Ciclosporina

6.2 Variables dependientes:

- Proteinuria
- Colesterol
- Triglicéridos
- Albúmina

7. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Tacrolimus: Medicamento inhibidor de calcineurina, variable cualitativa expresada en mg.

Ciclosporina: Medicamento inhibidor de calcineurina, variable cualitativa expresada en mg.

Proteinuria: Cantidad de proteínas filtradas por el riñón, mayor de 40mg/24h, Variable cuantitativa, expresada en mg/dL.

Colesterol: Variable cuantitativa, expresada en mg/dL.

Triglicéridos: Variable cuantitativa expresada en mg/dL

Albúmina: Variable cuantitativa expresada en g/dL.

8. DISEÑO METODOLÓGICO.

Se realizó un estudio experimental, prospectivo y comparativo, con seis grupos de ratas, Wistar macho, de 10-12 semanas de edad, las que se colocaron en jaulas metabólicas para recolección de orina de 24 horas, con acceso libre al agua y alimentos, y ciclos de luz/obscuridad de 12 horas.

Se formaron seis grupos de la siguiente manera:

Grupo I.- Nueve ratas a quienes se les inyectó ANP 150 mg/kg vía subcutánea, diluido al 2% en solución salina isotónica, dosis única. Cuatro días después de la inyección de ANP se les administró tacrolimus 0.3mg/kg/día vía oral diluido en 0.3ml de aceite de maíz durante diez días.

Grupo II.- Nueve ratas a quienes se les inyectó ANP 150 mg/kg vía subcutánea, diluido al 2% en solución salina isotónica, dosis única. Cuatro días después de la inyección de ANP recibieron ciclosporina en microemulsión 20 mg/kg/día, diluida en 0.3ml de aceite de maíz durante diez días.

Grupo III.- Nueve ratas a quienes se les inyectó ANP 150 mg/kg vía subcutánea, diluido al 2% en solución salina isotónica, dosis única. Cuatro días después de la inyección de ANP recibieron 0.3ml de aceite de maíz durante diez días.

Grupo IV. Nueve ratas testigo "puro" a las que se les administró 0.3ml de solución fisiológica salina isotónica vía subcutánea sin ANP y 0.3 ml de aceite de maíz vía oral durante 10 días.

Grupo V: Seis ratas testigos a quienes se les administró tacrolimus 0.3mg/kg/día vía oral diluido en 0.3ml de aceite de maíz durante diez días.

Grupo VI: Seis ratas testigos a las que se le administró ciclosporina en microemulsión 20 mg/kg/día, diluida en 0.3ml de aceite de maíz durante diez días, como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro II. Grupos de tratamiento

GRUPOS	Vía subcutánea/ Día 1		Vía oral/ Día 6-14		
	Sol. Fisiológica	ANP-sol. fisiológica	Aceite de maíz	CsA dil. Aceite de maíz	FK dil. Aceite de maíz
SN+ FK	-	150mg/kg	-	-	0.3mg/kg/día
SN+ CsA	-	150mg/kg	-	20mg/kg/día	-
Control SN	-	150mg/kg	100µL	-	-
Control puro	1.5ml	-	100µL	-	-
Control+ FK	1.5ml	-	-	-	0.3mg/kg/día
Control+CsA	1.5ml	-	-	20mg/kg/día	-

LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, con apoyo para el procesamiento de las muestras del laboratorio de investigación de Nefrología, laboratorio central y servicio de patología. Las jaulas metabólicas y las ratas se mantuvieron en el bioterio de la UNAM, ubicado en el Hospital General de México.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron 48 ratas, Wistar machos, entre 10-12 semanas de edad, con peso entre 180-230g, con acceso libre al agua y alimento, ciclos de luz/obscuridad de 12 horas.

METODOLOGÍA

En todos los grupos se cuantificó proteinuria de 24 horas durante 14 días, las muestras se trasladaron al laboratorio de nefrología para su lectura y procesamiento. En el día 14 se sacrificaron los animales, previa sedación con éter, y se realizó toma de muestra sanguínea por punción cardiaca directa, para la determinación de colesterol, triglicéridos, albumina, las cuales se procesaron en el laboratorio central del Hospital Infantil de México, posterior a la extracción sanguínea, los animales ya no despertaron.

Método cuantitativo de proteinuria por el método del Ácido Sulfosalicílico.

Fundamento:

La proteína es precipitada por el ácido Sulfosalicílico; este precipitado desarrolla una turbidez homogénea, la cual es comparada colorimétricamente con la producida por cantidades conocidas de albúmina en una curva estándar.

Reactivos:

- 1) Ácido Sulfosalicílico (ASS) al 3%. Se disuelven 30g de ASS en cantidad suficiente y aforar a 1000 ml de agua destilada.
- 2) Solución salina isotónica.

Material:

- 1) Tubos de vidrio de 150 x 15 mm.
- 2) Celdillas para leer en Coleman Jr.
- 3) Fotocolorímetro Coleman Jr.
- 4) Pipetas de vidrio y automáticas de dos pasos

Procedimiento:

- 1) A 4.0 ml de orina agregar 6.0 ml de ASS al 3 %. Mezclar bien.
- 2) Preparar un testigo, usando 4.0 ml. de orina y 6.0 ml. de solución salina.
- 3) Leer después de 5 minutos a 660 nm en fotocolorímetro Coleman Jr, llevando al testigo al 100% de transmitancia.

Curva de calibración:

- 1) Determinar el contenido de proteínas de una solución conocida (suero humano, Albúmina Armour).
- 2) Preparar estándares de 10 a 100 mg/dl. por disolución con solución salina.
- 3) Hacer una gráfica comparando porciento de transmitancia versus concentración.

La determinación de colesterol, Triglicéridos, albúmina. Se realizó en el laboratorio central con el analizador Dimesion X/PAND (DADE BEHRING), que realiza método colorimétrico de punto final.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los animales fueron tratados conforme las guías institucionales del cuidado y uso de animales de laboratorio (Ley General de Salud).

Los animales se anestesiaron con éter antes de sacrificarlos.

El personal que participó en este proyecto, cuenta con el adiestramiento necesario para el manejo de muestras biológicas, así como de tejidos.

Las muestras de orina, sangre y tejidos fueron procesadas en laboratorio de nefrología, laboratorio central y patología y posteriormente colocadas y descartadas en los contenedores de RPBI destinados a este fin.

Todo el material desechable utilizado fue depositado en bolsas especiales de residuos peligrosos sólidos-biológico-infeccioso, el cual fue depositado en un contenedor especial para este propósito, posteriormente personal de RPBI se encargó de su tratamiento para su destino final.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se recolectaron los datos en hojas previamente diseñadas, y luego se pasan a hojas del programa de Microsoft Excel.

Análisis con software Graph Pad version 4.0

Estadística descriptiva (promedio \pm DS) de proteinuria, albúmina sérica, colesterol, triglicéridos.

Comparación por ANOVA. Post test Prueba de Comparaciones múltiples de Tukey's.

11.RESULTADOS

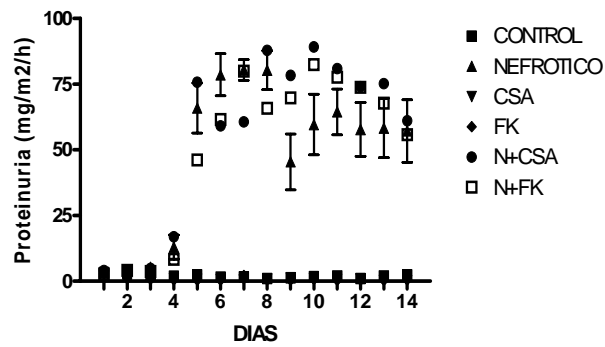
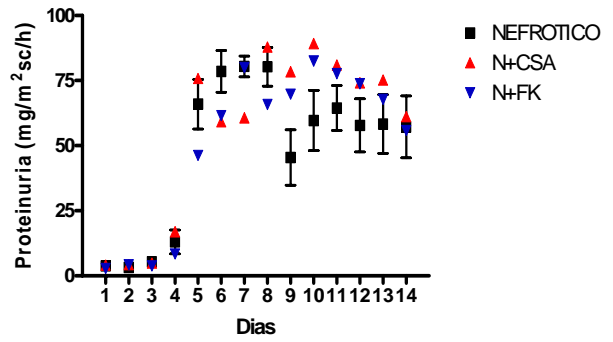
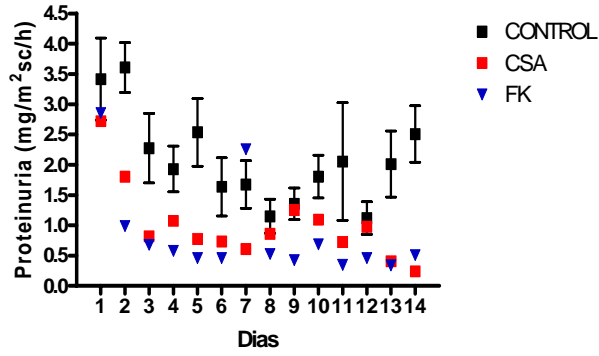
De las 48 ratas incluidas en el estudio, se eliminaron cuatro, una del grupo control de síndrome nefrótico, una del grupo síndrome nefrótico con ciclosporina y dos del grupo síndrome nefrótico con tacrolimus, por fallecimiento durante el estudio, el estudio post-mortem demostró que cursaban con septicemia, frecuente en los estados nefróticos.

Todos los animales tratados con PAN presentaron proteinuria nefrótica desde el 4º. día posterior a su aplicación, tal y como se reporta en la literatura.

En el grafico 1 se ve la evolución temporal de la proteinuria en los diferentes grupos. Los animales control (no nefróticos se muestran el grafico 1A, los animales nefróticos en el 1B y todos en el 1C). Puede observarse que los animales nefróticos (PAN solo o PAN+ inhibidor de calcineurina) tuvieron proteinuria masiva desde el cuarto día hasta el termino del estudio.

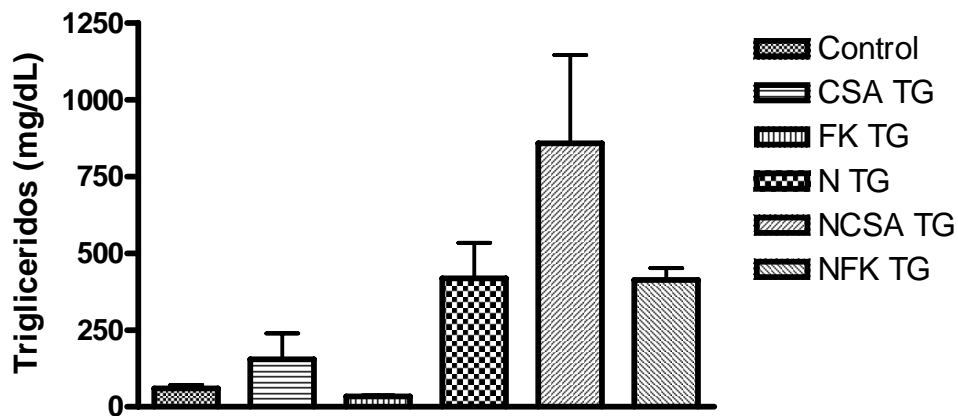
No observamos diferencia significativa al comparar la proteinuria del grupo control nefrótico, contra grupos nefróticos con medicamentos: Sin embargo los inhibidores de calcineurina disminuyeron en forma significativa la proteinuria en los grupos no nefróticos. Control puro vs grupo control con CsA ($p < 0.03$), grupo control puro vs grupo control con FK ($P < 0.01$). Grafica 1A.

Gráfico 1. Proteinuria en los diferentes grupos: 1 A control puro, control CsA, control FK, 1 B Nefrotico puro, Nefrotico + CsA, Nefrótico + FK, 1 C Todos los grupos.



En el Cuadro 3 se muestran los parámetros bioquímicos de colesterol, triglicéridos, albúmina y colesterol en los diferentes grupos estudiados. Los grupos nefróticos elevaron en forma significativa la cifra de triglicéridos en sangre, también es notoria la elevación de triglicéridos en animales control tratados con CsA. (Gráfico 2)

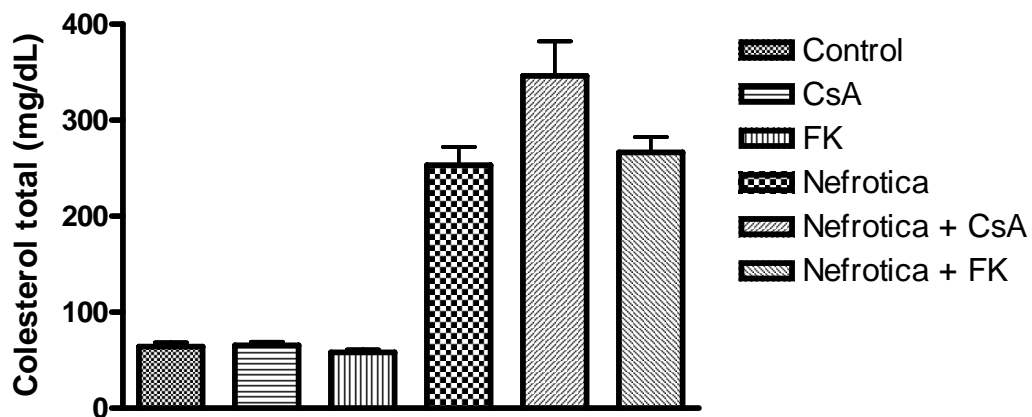
Gráfico 2. Comparación de triglicéridos en los diferentes grupos.



P<0.05. Prueba de comparaciones Tukey's.

El colesterol también aumento en forma significativa en los animales nefróticos, siendo mayor en el grupo tratado con CsA. (Grafico 3).

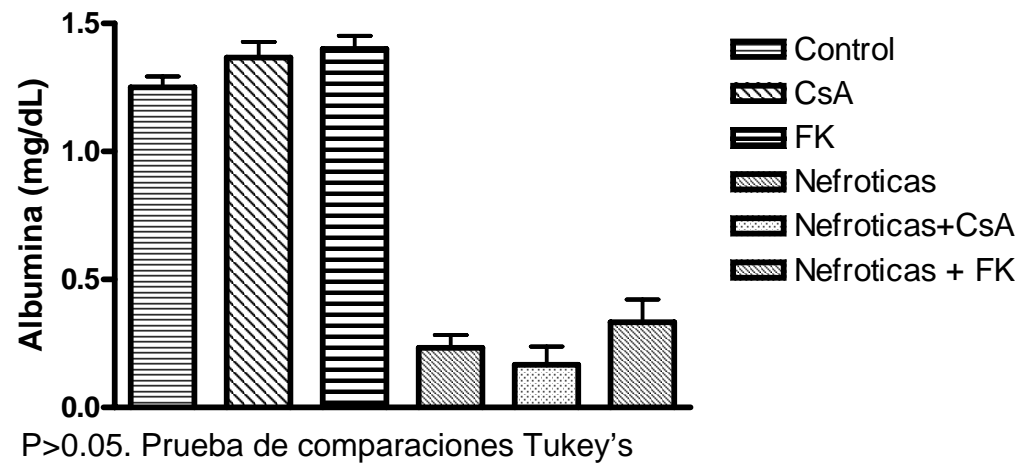
Grafico 3. Comparación de colesterol sérico en los diferentes grupos



P< 0.001. Prueba de comparaciones Tukey's

Con respecto a la albúmina sérica, observamos disminución significativa en los grupos nefróticos.

Grafico 4. Albúmina en los diferentes grupos.



12.DISCUSIÓN

Observamos que a la administración de ciclosporina y tacrolimus no resultó en disminución significativa de la proteinuria en los animales con síndrome nefrótico experimental, en el modelo de adriamicina se ha reportado que la CsA es capaz de disminuir la proteinuria en ratas nefróticas, aún cuando en el modelo animal el síndrome nefrótico se debe al efecto tóxico de un fármaco y no a un trastorno inmunológico como puede suceder en la práctica clínica (13-15).

Sin embargo llama la atención que tanto CsA como Tacrolimus disminuyeron la proteinuria de animales control, si bien permanece dentro de valores considerados normales la diferencia es estadísticamente significativa.

La administración de ciclosporina ocasiono un incremento en los triglicéridos tanto en animales no nefróticos como en animales nefróticos.

Este a pendiente el estudio histopatológicos con inmunohistoquímica para nefrina y podocina, para determinar el efecto de los inhibidores de calcineurina sobre estas proteínas

13. CONCLUSIONES

El uso de ciclosporina en síndrome nefrótico no redujo la proteinuria y si incremento significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol, en comparación con todos los grupos. El tacrolimus no redujo la proteinuria en ratas nefróticas y no incrementó los niveles de colesterol y triglicéridos esto comparado con el grupo control de síndrome nefrótico. El tacrolimus y la ciclosporina incrementan los niveles de albúmina en animales con síndrome nefrótico. Los dos inhibidores de calcineurina disminuyeron en forma significativa la proteinuria en animales no nefróticos.

14.REFERENCIAS

1. Nakhoul F, Ramadam R, Khankin E, Yaccob A, Kositch Z, Lewin M, et al. Glomerular abundance of nephrin and podocin in experimental nephrotic syndrome: different effects of antiproteinuric therapies. . Am J Physiol Renal Physiol 2005;289:880-890.
2. pediatria Amd. síndrome nefrótico en niños. Vol Med. Hosp. Infantil de México 2000;57:522-536.
3. Ruf RG, Lichtenberger A, Matousovich K, Haas JP, Anacleto FE. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) Do Not Respond to standard Steroid Treatment of Nephrotic Syndrome J. Am Soc. Nephrol. 2004;15:722-732.
4. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. Clin J Am Soc Nephrol 2007;2(3):529-42.
5. Ortiz A, Marron B, Ramos A. [The fate of podocytes in proteinuric nephropathies]. Nefrologia 2002;22(5):425-31.
6. Nagata M, Tomari S, Kanemoto K, Usui J, Lemley KV. Podocytes, parietal cells, and glomerular pathology: the role of cell cycle proteins. Pediatr Nephrol 2003;18(1):3-8.
7. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. J Clin Invest 2001;108(11):1583-7.
8. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. J Am Soc Nephrol 2000;11(1):1-8.
9. Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. Transplant Proc 1999;31(5):1978-80.
10. Velazquez L, Dobras B, Ocotitla J, Zavala N. tratamiento con ciclosporina en niños con síndrome nefrótico corticorresistente. Bol. med. Hosp. Infantil de México Federico Gómez 1996;53(3):109-116.
11. Anup S, Tejani C, Tejani A. One-Center experience with cyclosporine in refractory nephrotic syndrome in children. Pediatr Nephrol 1999;13:26-32.
12. Medeiros M, Perez-Urizar J, Mejia-Gaviria N, Ramirez-Lopez E, Castaneda-Hernandez G, Munoz R. Decreased cyclosporine exposure during the remission of nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol 2007;22(1):84-90.

13. Sharma R, Sharma M, Ge X, McCarthy ET, Savin VJ. Cyclosporine protects glomeruli from FSGS factor via an increase in glomerular cAMP. *Transplantation* 1996;62(12):1916-20.
14. Desassis JF, Raats CJ, Bakker MA, van den Born J, Berden JH. Antiproteinuric effect of ciclosporin A in adriamycin nephropathy in rats. *Nephron* 1997;75(3):336-41.
15. Meyrier A, Condamin M, Simon P. Treatment with cyclosporine of adult idiopathic nephrotic syndrome resistant to corticosteroids and other immunosuppressants. *Transplant Proc* 1988;20(259-261).
16. Wang JS, Yang AH, Chen SM, Young TK, Chiang H, Liu HC. Amelioration of antioxidant enzyme suppression and proteinuria in cyclosporin-treated puromycin nephrosis. *Nephron* 1993;65(3):418-25.
17. Westhoff TH, Schmidt S, Zidek W, Beige J, van der Giet M. Tacrolimus in steroid-resistant and steroid-dependent nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 2006;65(6):393-400.
18. McCauley J, Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Jensen C, et al. FK 506 in the management of nephrotic syndrome after renal transplantation. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 2):1351-4.
19. McCauley J, Shapiro R, Ellis D, Igdal H, Tzakis A, Starzl TE. Pilot trial of FK 506 in the management of steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8(11):1286-90.
20. Kramer BK, Schweda F. Differing proteinuria control with cyclosporin and tacrolimus. *Lancet* 1997;349(9056):953-4.
21. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001;10(1):1-8.
22. Rossmann P, Bukovsky A, Matousovic K, Holub M, Kral J. Puromycin aminonucleoside nephropathy: ultrastructure, glomerular polyanion, and cell surface markers. *J Pathol* 1986;148(4):337-48.
23. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chavez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Pena JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on proteinuria and sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42(3):210-6.

24. Lee YK, Kwon T, Kim DJ, Huh W, Kim YG, Oh HY, et al. Ultrastructural study on nephrin expression in experimental puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(12):2981-6.
25. Hosoyamada M, Yan K, Nishibori Y, Takiue Y, Kudo A, Kawakami H, et al. Nephrin and podocin expression around the onset of puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Pharmacol Sci* 2005;97(2):234-41.
26. Guan N, Ding J, Deng J, Zhang J, Yang J. Key molecular events in puromycin aminonucleoside nephrosis rats. *Pathol Int* 2004;54(9):703-11.
27. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Takagi M, Kodama F, Tomino Y. The role of podocytes in proteinuria. *Nephrology (Carlton)* 2007;12 Suppl 3:S15-20.
28. Fan Q, Xing Y, Ding J, Guan N, Zhang J. The relationship among nephrin, podocin, CD2AP, and alpha-actinin might not be a true 'interaction' in podocyte. *Kidney Int* 2006;69(7):1207-15.

15. ANEXOS

Cuadro 3. Variables bioquímicas estudiadas en los diferentes grupos. Los datos están expresados como Promedio \pm Error estándar.

Grupo.	Colesterol mg/dL	Triglicéridos mg/dL	Albúmina mg/dL	Proteinuria ² mg/m SC/día
Control sano	64.1 \pm 4.3	60 \pm 11.4	1.25 \pm 0.04	2.5 \pm 0.4
Control nefrótico	253 \pm 18.9	418 \pm 115	0.23 \pm 0.04	57.2 \pm 12
Control CsA	65.3 \pm 3.88	154.6 \pm 84.2	1.36 \pm 0.06	0.24 \pm 0.17
Control FK	58.7 \pm 2.88	33.6 \pm 3.07	1.4 \pm 0.05	0.5 \pm 0.18
Nefrótico CsA	355 \pm 42	1025 \pm 286	0.20 \pm 0.07	61.16 \pm 12
Nefrótico FK	266 \pm 15.9	412 \pm 38.3	0.33 \pm 0.08	55.3 \pm 10

Cuadro 4. Valor de p en la comparación de la proteinuria entre los diferentes grupos mediante t de Student.

Grupos	Valor de P
Control puro vs Control CsA	<0.005
Control puro vs Control FK	<0.01
SN vs SN + CsA	>0.05
SN vs SN + FK	>0.05
SN + CsA vs SN + FK	>0.05

Cuadro 5. Valor de p en la comparación de triglicéridos séricos entre los diferentes grupos controles mediante t de Student.

Grupos	Valor de P
Control puro vs SN	>0.05
Control puro vs Control + CsA	>0.05
Control puro vs Control FK	>0.05
Control puro vs SN +CsA	<001
Control SN+FK vs	>0.05

Cuadro 6. Valor de p en la comparación de triglicéridos séricos entre los diferentes grupos nefróticos mediante t de Student .

Grupos	Valor de P
SN vs Control CsA	>0.05
SN vs Control FK	>0.05
SN vs SN +CsA	>0.05
SN vs SN +FK	>0.05

Cuadro 7. Valor de p en la comparación de triglicéridos sericos entre los diferentes grupos con inhibidores de la calcineurina mediante t de Student.

Grupos	Valor de P
Control CsA vs Control FK	>0.05
Control CsA vs SN +CsA	<0.01
Control CsA vs SN +FK	>0.05
Control FK vs SN +CsA	<0.01
Control FK vs SN +FK	>0.05
SN+CsA vs SN +FK	>0.05

Cuadro 8. Valor de p en la comparación de colesterol sérico entre los diferentes grupos controles mediante t de Student.

Grupos	Valor de P
Control puro vs SN	<0.001
Control puro vs Control CsA	>0.05
Control puro vs Control FK	>0.05
Control puro vs SN+CsA	<0.001
Control puro vs SN+FK	<0.001

Cuadro 9. Valor de p en la comparación de colesterol sérico entre los diferentes grupos nefróticos mediante t de Student.

Grupos	Valor de P
SN vs Control CsA	<0.001
SN vs Control FK	<0.001
SN vs SN+CsA	<0.001
SN vs SN+FK	>0.05

Cuadro 10. Valor de p en la comparación de colesterol serico entre los diferentes grupos con inhibidores de calcineurina, mediante t de Student.

Grupos	Valor de P
Control CsA vs Control FK	>0.05
Control CsA vs SN+CsA	<0.001
Control CsA vs SN+FK	<0.001
Control FK vs SN+CsA	<0.001
Control FK vs SN+FK	<0.001
SN+CsA vs SN+FK	<0.05

HOJA DE VACIAMIENTO DE DATOS

Rata: _____ Fecha: _____ Grupo: _____ Tratamiento : _____

	Días													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Dosis														
Peso														
Volumen Urinario														
Proteinuria														

Dia 14	
Albumina	
Colesterol	
Triglicéridos	

FOTOS RATAS



Foto 1. Jaula metabólica y recolección de orina.



Foto 2. Aplicación de medicamentos.