

300627

UNIVERSIDAD LA SALLE

24
2ej



Escuela de Química
Incorporada a la U.N.A.M.

ESTUDIO SECUENCIAL DE LA ACTIVIDAD DE ONCE
ENZIMAS SERICAS EN RATAS CON SINDROME
NEFROTICO.

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a
MARTHA PATRICIA MORALES GARCIA

Director de Tesis:
M. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

México, D. F.

1992

ESTE CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE.

Capítulos	Páginas.
RESUMEN	i
ABREVIATURAS	ii
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVO	3
3. GENERALIDADES	4
3.1 Nefrona	4
3.2 Riego sanguíneo e inervación del riñón	8
3.3 Formación de orina	11
3.3.1 Filtración glomerular	11
3.3.2 Reabsorción y secreción tubular	13
3.4 Síndrome nefrótico	16
3.5 Proteinuria	17
3.5.1 Mecanismos de proteinuria	20
3.6 Hipoalbuminemia	21
3.7 Hiperlipidemia e hiperlipoproteinemia	22
3.7.1 Patogénesis de hiperlipidemia e hiperlipoproteinemia	23
3.8 Retención de sodio, ascitis y edema en el SN	24
3.9 Síndrome nefrótico experimental	25
3.10 Generalidades del ANP	27
3.11 Metabolismo y mecanismo del daño del ANP en sistemas <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u>	28
4. MATERIAL Y METODOS	32
4.1 Reactivos	32

4.2	Diseño experimental	32
4.3	Metodos analíticos	33
4.4	Presentación de datos y análisis estadístico	40
5.	RESULTADOS	41
6.	DISCUSION	67
7.	CONCLUSION	72
8.	REFERENCIAS	73

RESUMEN.

En el presente trabajo se realizó la determinación de proteínas totales en suero y en orina, albúmina sérica, y la actividad en suero de las enzimas: aldolasa (ALS), colinesterasa (CHS), deshidrogenasa láctica (LDH), alfa-hidroxiacetato deshidrogenasa (HBD), creatina cinasa (CK), fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALT), isocitrato deshidrogenasa (ICD), aspartato aminotransferasa (AST), leucina aminopeptidasa (LAP) y gama-glutamil transferasa (GGTP); en ratas con síndrome nefrótico (SN) los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 30 después de una inyección única de aminonucleósido de puromicina (ANP).

Los resultados obtenidos indican que a) las proteínas totales y la albúmina en suero disminuyeron el día 4, y recuperan valores normales los días 20 y 30 respectivamente; b) las proteínas totales en la orina aumentaron el día 4, y se mantuvieron altas hasta el final del estudio; c) las actividades de ALS y CHS aumentaron; d) las actividades de LDH, HBD, CK, ALP, y ALT disminuyeron; e) las actividades de ICD, AST, LAP presentaron un modelo bifásico, ya que primero aumentaron y después disminuyeron; y f) la actividad de GGTP permaneció constante.

Estas diferencias en los perfiles de las actividades enzimáticas sugieren que existe una regulación independiente de los niveles séricos de estas proteínas en el SN experimental inducido por ANP.

ABREVIATURAS

ALS	Aldolasa
CHS	Colinesterasa
LDH	Deshidrogenasa láctica
HBD	alfa-Hidroxi butirato deshidrogenasa
CK	Creatina cinasa
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
ICD	Isocitrato deshidrogenasa
AST	Aspartato aminotransferasa
LAP	Leucina aminopeptidasa
GGTP	gama-Glutamil transferasa
SN	Síndrome nefrótico
ANP	Aminonucléosido de puromicina
ADR	Adriamicina
KDa	Kilodalton
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Acido desoxirribonucléico
ARN	Acido ribonucléico
SNI	Síndrome nefrótico idiopático
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
MBG	Membrana basal glomerular
MMPA	Análogo de 6-metil adenosina
APA	Análogo de adenosina
IPA	Análogo de inosina
ADA	Desaminasa de la adenosina
PNP	Nucleosidasa
XO	Xantina oxidasa
TXA ₂	Tromboxano
LTs	Leucotrienos
GEC	Células epiteliales del glomérulo
DBP	Proteína acarreadora de vitamina D
Ig	Inmunoglobulina
TPI	Triosa fosfato isomerasa
NADPH	Dinucléotido fosfato reducido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucléotido reducido de nicotinamida y adenina
MD	Malato deshidrogenasa
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
HK	Hexocinasa
GPD	Deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato
UI	Unidades Internacionales

1. INTRODUCTION.

El síndrome nefrótico (SN) inducido por el aminonucléosido de puromicina (ANP); que es uno de los productos de la hidrólisis de la puromicina, ha sido muy empleado debido a que es un modelo experimental semejante al SN de cambios mínimos presente en el humano [1,2]. Este síndrome se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, retención de sodio, ascitis e hiperlipidemia [3-6].

La nefrosis en humanos y en ratas se caracteriza por alteraciones profundas en los niveles circulantes y en el metabolismo de las proteínas plasmáticas; y aunque existe una marcada hipoproteinemia, la concentración sérica de algunas proteínas permanece sin cambio, mientras que la de otras aún aumenta. Estos cambios en la concentración de una proteína plasmática específica dependen de su síntesis, degradación, pérdida corporal y/o volumen plasmático; estos factores se encuentran documentados sobre diversas proteínas en SN experimental [3,4,7-11].

Se han realizado diversos estudios sobre las concentraciones de diferentes proteínas plasmáticas en SN; sin embargo, en muy pocos de éstos se ha podido establecer el mecanismo por medio del cual cambia la concentración de una proteína circulante específica en ésta enfermedad [3-6,8-20]. En la tabla 1 se presenta una lista de las proteínas estudiadas en el SN inducido experimentalmente. Por otra parte, aún no se ha estudiado la actividad de muchas enzimas circulantes en ratas con SN inducido por ANP; por lo cual en este estudio empleando este mismo modelo experimental se midió la actividad enzimática de: Aldolasa (ALS, EC 4.1.2.13); colinesterasa (CHS, EC 3.1.1.8); leucina aminopeptidasa (LAP, EC 3.4.1.1); isocitrato des-

hidrogenasa (ICD, EC 1.1.1.42); aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1); alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2); deshidrogenasa láctica (LDH, EC 1.1.1.27); alfa-hidroxiacetato deshidrogenasa (HBD, EC 1.1.1.27); creatina cinasa (CK, EC 2.7.3.2); fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1); y gama-glutamil transferasa (GGTP, EC 2.3.2.2).

TABLA 1. ALTERACIONES EN PROTEINAS CIRCULANTES Y EN ORINA (NEFROSIS EXPERIMENTAL).

PROTEINAS	SUERO	ORINA	REFERENCIAS
Albúmina	-	+	3,8,12
Transferrina	-	+	9,13,14
Glicoproteína ácida alfa-1	-	+	15
Ceruloplasmina	-	+	16
Angiotensinógeno	-	+	4-6,11
Antitrombina III	-	+	8
DBP	-	+	10
IgG	-	+	18
IgM	+	?	18
alfa 1-macroglobulina	+	?	20
Renina	+	+	4-6,11
ECA	+	+	4,7
Protrombina	+	+	8
Fibrinógeno	+	0	8
IgA	=	?	18

(-): Concentración disminuida; (+): Concentración aumentada; (=): Concentración sin cambio; (0): No hay excreción urinaria; (?): Se desconoce.

2. OBJETIVO.

Determinar la actividad de once enzimas circulantes en ratas con síndrome nefrótico (SN) inducido por el aminonucleósido de puromicina (ANP).

3. GENERALIDADES.

3.1 NEFRONA.

La unidad funcional del riñón es la nefrona, formada por la cápsula del glomérulo (o cápsula de Bowman), el glomérulo y el túbulo renal (figura 1). La cápsula glomerular se localiza en la corteza renal; esta cápsula presenta una pared doble, en la cual la capa interna de la pared (capa visceral) esta formada de células epiteliales (podocitos). La capa visceral rodea a la red de capilares que es el glomérulo, y existe un espacio entre la pared interna y la externa o capa parietal, que está constituida de epitelio escamoso simple. La membrana endotelio capsular o barrera de filtración está formada por las siguientes partes, enumeradas en el orden en que pasan por ellas las sustancias filtradas por el riñón (figura 2) [21]:

a) Endotelio del glomérulo. Capa sencilla de células endoteliales con poros totalmente abiertos cuyo diámetro es de 50-100 nm (el diámetro promedio es de 70 nm), permiten que los elementos solubles del plasma estén en contacto íntimo con la membrana basal glomerular [22]. Estas células están cubiertas con ácido siálico y contienen un complejo formado de proteoglicanos con sulfato de heparán [23].

b) Membrana basal del glomérulo. Membrana subyacente al endotelio, no posee poros. Consta de fibrillas de colágena incluidas en una matriz de glicoproteína; estas fibrillas constituyen una barrera significativa para la filtración de las proteínas plasmáticas neutras [22]. Los proteoglicanos se localizan en la parte interna y externa de la membrana basal [24].

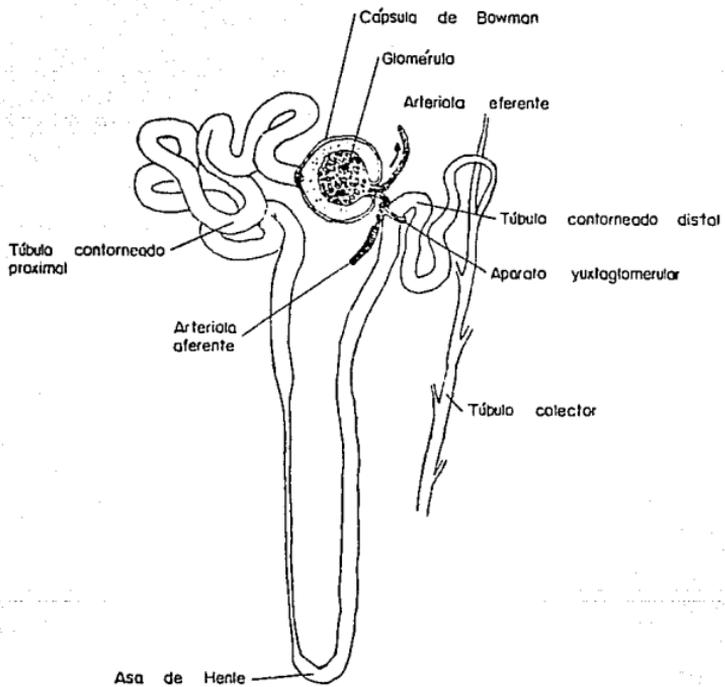


Figura 1. Estructura de la nefrona [21].

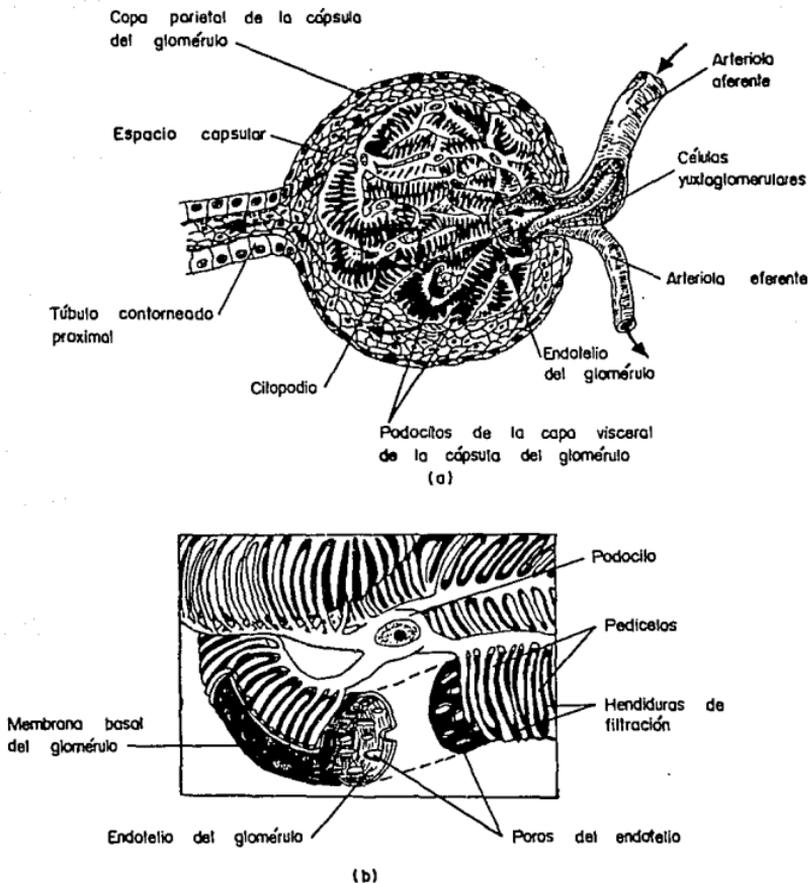


Figura 2. Membrana endotelio capsular: a) componentes de un corpúsculo renal, y b) detalles de la membrana endotelio capsular [21].

c) Epitelio de la capa visceral de la cápsula glomerular. Presenta podocitos (prolongaciones en forma de pie) y citopodios (pies de podocitos). Estos últimos están dispuestos en forma paralela a la circunferencia del glomérulo y cubren a la membrana basal presentando espacios existentes entre ellos, denominados hendiduras de filtración [21] a través de las cuales pasan moléculas pequeñas, restringiendo probablemente el paso de moléculas grandes [22]. Los podocitos están cubiertos por un glicocálix rico en ácido siálico [25].

El túbulo renal sale de la cápsula glomerular; la primera parte, se conoce como túbulo contorneado proximal, este presenta una porción contorneada y otra recta (figura 1) [21]. La pared de este túbulo consiste en epitelio cuboidal con microvellosidades lo que sugiere que el epitelio está adaptado para la reabsorción y la secreción. Esta parte del túbulo se localiza en la corteza. La parte siguiente del túbulo es el asa de Henle, que está compuesta de dos partes rectas del túbulo y la curva conectora; la primera parte del túbulo, es la porción descendente del asa de Henle que llega hasta la médula y consiste de epitelio escamoso y la segunda parte, es la porción ascendente del asa que se dirige hacia la corteza y que está compuesta de epitelio columnar de poca altura y cuboidal. Ambas porciones descendente y ascendente están unidas por la curva conectora del asa, que se localiza en la médula [21]. La porción final de la nefrona que se localiza en la corteza vuelve a estar contorneada, a esta parte se le denomina túbulo contorneado distal, él cual es más corto que el proximal y contiene epitelio cuboidal con pocas microvellosidades [21,26].

Los túbulos contorneados distales se vacían en los túbulos colectores revestidos de epitelio cilíndrico, estos últimos atraviesan las pirámides renales y se abren en los cálices de la pelvis renal mediante varios túbulos papilares, que presentan células columnares (figura 1 y 3) [21].

Las nefronas se clasifican en:

a) Nefrona cortical. Presenta su glomérulo en la corteza, por lo tanto sus túbulos renales relativamente cortos; penetran en la médula externa.

b) Nefrona yuxtamedular. Generalmente presenta su glomérulo en la cercanía de la unión entre la corteza y la médula, y sus túbulos renales relativamente largos; penetran en la médula interna [21].

3.2 RIEGO SANGUINEO E INERVACION DEL RINON.

Los riñones tienen abundante riego sanguíneo, debido a que las nefronas son las encargadas principales de la extracción de los desechos presentes en la sangre; y de la regulación del contenido de líquidos y electrolitos de la propia sangre. Las arterias renales transportan un 25 % del gasto cardíaco a los riñones, o sea, un promedio de unos 1300 ml de sangre (700 ml de plasma) por minuto [21,26].

La arteria renal se divide en arterias interlobares que se dispersan radialmente entre las pirámides (figura 3). En el límite entre médula y corteza se dividen nuevamente dando las arterias arciformes (arterias arqueadas), que discurren por la zona límite. Estas dan origen a las arterias interlobulillares que penetran radialmente en la corteza, donde dan origen a un

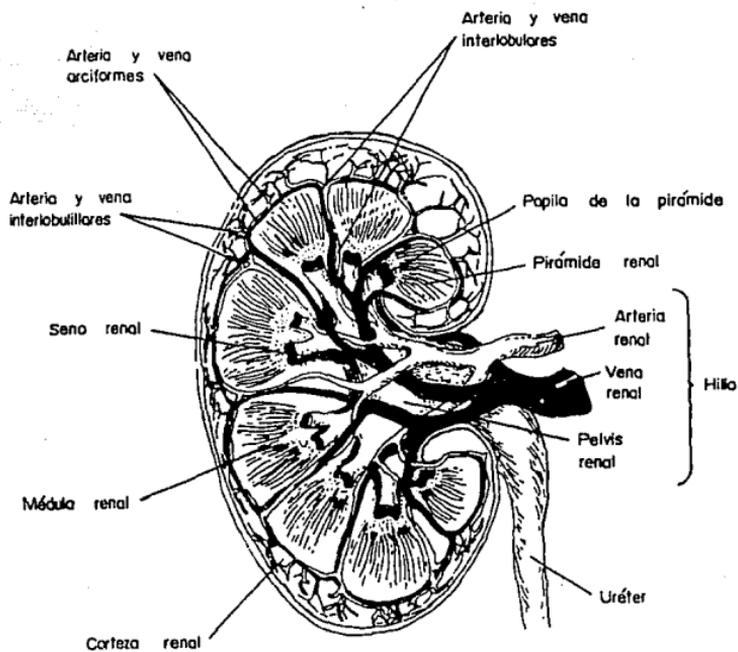


Figura 3. Riego sanguíneo del riñón [21].

vaso aferente para cada glomérulo, en el que se divide esta arteriola para formar una red de capilares [26]. Estos últimos se reúnen después en el vaso eferente, por el cual circula la sangre en sentido opuesto a la cápsula [21].

Los vasos eferentes se dividen en una segunda serie de capilares que riegan los túbulos contorneados tanto de la nefrona cortical como la yuxtamedular; además los vasos eferentes de la nefrona yuxtamedular forman vasos vasculares paralelos, los llamados vasos rectos, que penetran en la médula y forman el riego capilar para las asas de Henle. La segunda serie de capilares se reúnen para formar las venas interlobulillares, luego las arciformes, y finalmente las interlobulares. Estas últimas cursan entre las pirámides y salen del riñón por el hilio mediante una sola vena renal [21,26].

Las fibras nerviosas simpáticas para el riñón acompañan a las arterias renales en forma de plexo (cuando los ramos ventrales de los nervios espinales, no llegan de manera directa a las estructuras que inervan, sino que forman redes con nervios adyacentes, a uno y otro lado del cuerpo; tales redes se denominan plexos) y acaban entre el músculo liso de los vasos sanguíneos renales aferentes y eferentes; y del aparato yuxtglomerular. La estimulación de los nervios simpáticos renales o la inyección de noradrenalina, disminuyen el riego sanguíneo del riñón por vasoconstricción general; en consecuencia reducen la formación de orina. Sin embargo, impulsos nerviosos fisiológicos pueden aumentar la formación de orina por vasoconstricción selectiva de los vasos eferentes [26].

3.3 FORMACION DE URINA.

Los procesos principales que intervienen en la formación de orina son:

a) Filtración glomerular. La mayor parte de las sustancias del plasma se filtran en la cápsula glomerular con excepción de células sanguíneas y algunas proteínas [21].

b) Reabsorción tubular. Es la retención de sustancias necesarias para el organismo, por medio de una reabsorción parcial o completa en diversas partes del túbulo [21,26].

c) Secreción tubular. Algunos solutos son secretados hacia el interior del túbulo por las células epiteliales, permitiendo al organismo eliminar desechos y regular el pH [21,26].

3.3.1 Filtración Glomerular.

La filtración de la sangre se lleva a cabo en los corpúsculos renales; en los cuales cada cápsula incluye capilares glomerulares en espiral, originándose así una superficie mayor de filtración. Por otra parte, la membrana endotelio capsular, presenta los poros endoteliales que por lo general no restringen el paso de las sustancias; sin embargo, la membrana basal sólo permite el paso de las moléculas pequeñas e impide el de las moléculas de peso molecular elevado como los elementos corpusculares de la sangre y algunas proteínas (ejemplo: albúmina plasmática, peso molecular 67.5 KDa). Otra característica es que el vaso eferente tiene menor diámetro que el aferente, de modo que se establece una gran resistencia a la salida de la sangre presente en el glomérulo, ocasionando que la

presión arterial sea más elevada en los capilares glomerulares [21].

La filtración en el glomérulo depende de diversas presiones:

a) Presión hidrostática sanguínea glomerular es la fuerza que ejerce la sangre en los capilares glomerulares, que tienden a desplazar al líquido fuera del glomérulo con una presión impulsora, en promedio, de 75 mm de Hg [21,26].

b) Presión hidrostática capsular; es la fuerza que origina un flujo retrógrado, el cual consiste en que una parte del filtrado regrese al capilar, y esto se debe a que el filtrado en el espacio glomerular se enfrenta a dos formas de resistencia: las paredes de la cápsula y el líquido presente en el túbulo renal o bien, depende principalmente de la tensión de los tejidos renales dentro de su cubierta rígida de tejido conectivo. La fuerza que origina este flujo, es por lo general de unos 20 mm de Hg [21,26].

c) Presión osmótica sanguínea, es la fuerza que conserva el equilibrio entre dos soluciones de diferente concentración, que se encuentran separadas por una membrana semipermeable. Las proteínas plasmáticas ejercen la presión osmótica, que tiende a regresar agua del filtrado (solución de concentración menor) a los vasos capilares que contienen la sangre (solución de concentración mayor). La presión osmótica presenta un valor aproximadamente de 30 mm de Hg. Las dos últimas presiones se oponen a la presión impulsora [21,26].

El ritmo de formación de filtrado glomerular es

proporcional a la presión efectiva de filtración con la cual se produce, y que se representa por la siguiente fórmula:

$$P_{eff} = P_s - (P_c + P_o)$$

donde

P_{eff} = Presión efectiva de filtración.

P_s = Presión hidrostática sanguínea glomerular.

P_c = Presión hidrostática capsular.

P_o = Presión osmótica sanguínea.

sustituida queda

$$P_{eff} = 75 \text{ mm Hg} - (20 \text{ mm Hg} + 30 \text{ mm Hg})$$

$$P_{eff} = 25 \text{ mm Hg}$$

La presión efectiva de filtración 25 mm de Hg; produce un índice de filtración glomerular, que es el volumen de filtrado que sale de todos los corpúsculos renales cada minuto, de unos 125 ml de filtrado/min; a partir de los 700 ml de plasma/min que pasan sobre la superficie glomerular [21,26].

3.3.2 Reabsorción y Secreción Tubular.

La reabsorción tubular consiste en el paso del filtrado (constituido por agua y solutos) hacia la sangre que circula por los capilares peritubulares o los vasos rectos, que tiene lugar atravesando las células epiteliales del túbulo, el espacio peritubular o extracelular y el endotelio capilar. El espacio extracelular está compuesto por tejido conectivo laxo continuo y líquido intersticial [21,26].

Algunos componentes del líquido tubular son reabsorbidos en cantidades específicas, conforme a las necesidades del organismo, por transporte activo; es decir, que se desplazan

contra gradientes de concentración o electroquímicos, y el paso requiere de energía metabólica. Los desplazamientos pasivos sólo pueden producirse con sustancias a las cuales las membranas son permeables [26].

Las diferencias de la pared epitelial según los niveles del túbulo sugieren que las funciones de este túbulo cambian en diferentes partes del mismo; por lo cual, se estudiará la reabsorción tubular de cada una de las partes [26].

a) Túbulo contorneado proximal. En esta parte del túbulo se reabsorbe hasta el 80 % del filtrado glomerular (unos 100 ml/min). El epitelio del túbulo proximal es muy permeable al agua. Las sustancias que se reabsorben en esta zona son la glucosa; los aminoácidos y los iones sodio, potasio, cloruro, fosfato y bicarbonato [21].

El líquido que llega al extremo del túbulo contorneado proximal difiere del filtrado glomerular debido a que su volumen ha disminuido aproximadamente a la quinta parte; la concentración de ión sulfato y de componentes nitrogenados es mayor, carece de glucosa, y el 80 % aproximadamente del sodio y el potasio han sido reabsorbidos junto con cantidades equivalentes de cloruro, fosfato y bicarbonato [26].

b) Asa de Henle. Esta presenta una nueva reabsorción de solutos principalmente de cloruro de sodio y agua. Las dos ramas del asa tienen propiedades diferentes: la descendente es permeable al agua, mientras que la ascendente es relativamente impermeable al agua. El epitelio de la rama ascendente transporta activamente cloruro desde el interior del túbulo

hacia el líquido intersticial; el anión va acompañado pasivamente de cationes (principalmente iones sodio). El desplazamiento neto de solutos saliendo de la rama ascendente hace que el líquido intersticial sea hipertónico, facilitando la reabsorción de agua que se desliza saliendo de la rama descendente según el gradiente osmótico; a su vez, esta reabsorción de agua facilita la reabsorción activa de cloruro de la rama ascendente, aumentando la concentración de cloruro de sodio y agua en el líquido intersticial, con lo cual disminuye el gradiente de concentración contra el cual se transporta cloruro. Este mecanismo global se denomina multiplicador de contracorriente [26].

c) Túbulo contorneado distal. Esta porción de la nefrona es más flexible en sus capacidades de reabsorción, ya que puede ajustarse a las necesidades del momento. Además de que está bajo el control de retroalimentación por hormonas [26].

El túbulo distal recibe aproximadamente la octava parte del volumen que tiene el filtrado glomerular original. En esta zona, se lleva a cabo la reabsorción de iones sodio, cloruro, bicarbonato y fosfato [26]. La reabsorción de agua está regulada por el transporte de sodio (ósmosis) y por moléculas portadoras de agua, estas moléculas se encuentran en las células de los túbulos distales y colectores; las cuales son reguladas por la hormona antidiurética (ADH) [21]. Esta hormona facilita la reabsorción de agua aumentando la permeabilidad de las membranas plasmáticas de los túbulos. Un aumento de la presión osmótica de la sangre, o una disminución del volumen sanguíneo, son el

estímulo para la liberación de ADH [26].

La excreción tubular es el fenómeno opuesto a la reabsorción tubular, por tanto las sustancias que pasan de la sangre al filtrado son iones potasio, protones, amoniaco y creatinina. Este último proceso para la formación de orina se estimula mediante un pH sanguíneo bajo, el cual induce a una secreción de protones y de iones amonio en el filtrado; y por lo tanto la reabsorción de bicarbonato de sodio en los túbulos distales. La secreción de protones y de iones amonio produce una disminución en el pH de la orina y la reabsorción de bicarbonato de sodio origina un incremento del pH sanguíneo, dando como resultado éste último la restauración del pH sanguíneo normal que tiene un valor promedio de 7.4 [21].

3.4 SINDROME NEFROTICO.

El síndrome nefrótico (SN) es un estado clínico multifactorial que se caracteriza por un aumento en la permeabilidad glomerular de proteínas plasmáticas, lo que conduce a proteinuria (principalmente albuminuria) y lipiduria masivas. Además existe una tendencia variable de presentar edema generalizado, hipoalbuminemia, hiperlipidemia, ascitis, retención de sodio, disminución de la inmunidad humoral y celular, desnutrición, alteraciones en la concentración de casi todas las proteínas plasmáticas, alteraciones en el metabolismo de calcio y vitamina D, alteraciones en los factores de la coagulación e hipertrofia hepática con aumento de ADN y ARN; se piensa que todas estas alteraciones sistémicas son consecuencia de la pérdida de proteínas plasmáticas a través de la orina,

debido a que la barrera de filtración glomerular esta alterada [1,15,27-29]. En la figura 4 se representa la relación que existe entre las principales alteraciones sistémicas.

En la tabla 2 se presenta una clasificación de las causas de SN más frecuentes. Cualquier lesión glomerular puede estar asociada, al menos temporalmente, con proteinuria de magnitud suficiente para producir hipoalbuminemia y de esta forma iniciar la fisiopatología del SN [15].

El síndrome nefrótico idiopático (SNI) es un estado clinicopatológico que se desarrolla en ausencia de cualquier factor etiológico mencionado en el SN secundario (tabla 2); es decir, que se desconoce su origen [15]. Sin embargo, produce una lesión renal característica, la cual consiste en la fusión de las células epiteliales (podocitos) de la barrera de filtración glomerular; además existe un aumento espontáneo en la retención de sodio, edema, proteinuria e hiperlipidemia; y es común en niños [1,4,6].

3.5 PROTEINURIA.

El paso anormal de proteínas plasmáticas en la orina se conoce como proteinuria; esto se debe a un incremento en la permeabilidad glomerular provocada por una lesión glomerular o de una reabsorción defectuosa de proteínas por un túbulo lesionado o saturado [3].

No siempre existe una correlación inversa significativa entre la cantidad de proteína excretada y la concentración de albúmina sérica; debido a que la cantidad de proteína excretada

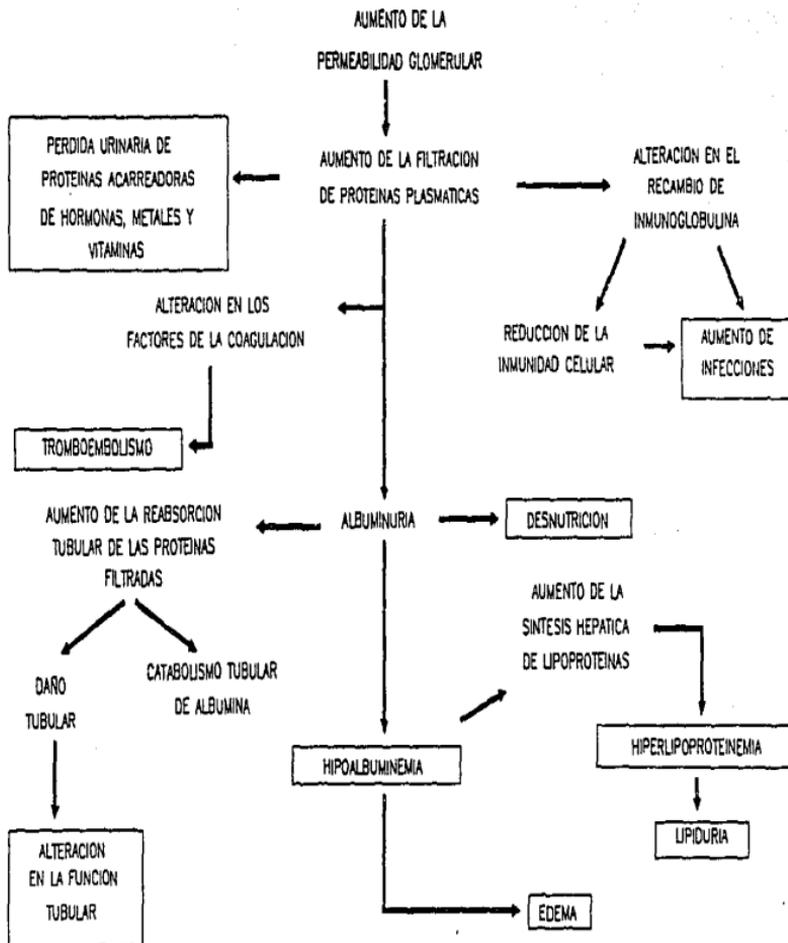


Figura 4. Fisiopatología del síndrome nefrótico. Se propone que todas las alteraciones sistémicas son consecuencia del aumento en la permeabilidad glomerular a las proteínas plasmáticas y que la hipoalbuminemia inicia las principales manifestaciones [3].

TABLA 2. CLASIFICACION DE LOS ESTADOS DE ENFERMEDAD ASOCIADOS
CON EL DESARROLLO DE SINDROME NEFROTICO.

I. SN idiopático o enfermedad glomerular primaria.

II. SN secundario. Esta asociado con eventos etiológicos específicos, por lo tanto es la enfermedad glomerular que se deriva de la complicación de otras enfermedades:

1. Medicamentos: Mercurio orgánico, inorgánico y elemetal; oro orgánico; penicilamina; heroína; probenecid; captopril; antiinflamatorio no esteroidal.
2. Alergenos, venenos, inmunizaciones: piquete de abeja; polen.
3. Infecciones:
 - a) Bacteriana. Glomerulonefritis post-estreptocócica; "Nefritis de derivación".
 - b) Viral. Hepatitis B, herpes zoster, virus de inmunodeficiencia humana.
 - c) Protozoaria. Malaria (especialmente malaria cuartana).
 - d) Helminética. Schistosomiasis.
4. Neoplásica:
 - a) Tumores sólidos (carcinoma y sarcoma); en pulmón, corazón y estómago.
 - b) Leucemia y linfoma. Enfermedad de Hodgkin.
5. Enfermedad multisistémica: Lupus eritematoso sistémico; púrpura Schönlein - Henoch; amiloidosis (primaria y secundaria).
6. Enfermedad heredofamiliar y metabólica: Diabetes mellitus.
7. Misceláneos: Gestación asociada (pre-eclampsia, recurrente, transitoria); rechazo del tejido transferido (injerto) renal crónico.

Clasificación de las causas de SN más frecuentes [15].

en SN varía mucho, ya que está influenciada considerablemente por la velocidad de filtración glomerular, la ingestión de proteínas en la dieta y la concentración plasmática de albúmina, la cual puede presentar alteraciones en la permeabilidad capilar sistémica de albúmina (se acumula albúmina en el espacio intersticial) o alteraciones en la síntesis hepática de albúmina [3,15].

Ciertos fármacos actúan sobre la resistencia vascular en los vasos pre- y post-glomerulares, teniendo efectos significativos sobre la magnitud de la proteinuria. Ejemplos: Agentes antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA); ambos reducen la proteinuria del 40 al 60 % [15].

3.5.1 Mecanismos de Proteinuria.

La proteinuria en el SN se origina a partir de un aumento en la permeabilidad glomerular; y a su vez este aumento puede resultar de las anormalidades que se presentan en la carga y/o tamaño de la barrera de filtración glomerular [15]:

a) La barrera de carga selectiva. Esta constituida de polianiones, sialoproteínas y un complejo formado de proteoglicanos con sulfato de heparán, que limitan el paso de moléculas específicas con carga negativa. La disminución marcada en los constituyentes aniónicos, puede favorecer la filtración de proteínas cargadas negativamente [30]. De hecho, diversos estudios sugieren que la disminución del ácido siálico juega un papel importante en la proteinuria [31,32]; sin embargo, no está claro aún si el complejo formado de proteoglicanos con sulfato de

heparán disminuye en SN [33].

b) La barrera de tamaño selectivo. Presenta diferencias en el radio del poro efectivo, resultando una heteroporosidad de la pared capilar [15]. Se ha propuesto que el tamaño del poro se debe a que la glucosa y la manosa se acumulan principalmente en las glicoproteínas de la membrana basal glomerular (MBG) induciéndola a cambios en su estructura tridimensional [29].

Los factores que determinan el paso de las moléculas a través de la barrera de filtración son: tamaño, deformabilidad, carga eléctrica y configuración molecular, además de la hemodinámica glomerular [25].

3.6 HIPDALBUMINEMIA.

La hipoalbuminemia es la disminución de la concentración plasmática de albúmina, esta anomalía metabólica puede ser consecuencia de una reducción en la síntesis, de un incremento en el catabolismo, de cambios en la distribución, de aumento en la excreción urinaria de albúmina y/o de una disminución en la ingestión de proteínas en la dieta. En el SN, algunos o todos estos factores pueden estar presentes [3]; sin embargo, no todos los pacientes con SN, desarrollan hipoalbuminemia durante el curso de la enfermedad [15].

Dado que la albúmina es la proteína plasmática más abundante y debido a su tamaño relativamente pequeño, contribuye de manera preponderante con la presión oncótica dentro del compartimiento intravascular. Por lo tanto, la concentración de albúmina plasmática tiene un papel importante en el mecanismo homeostático que mantiene el volumen normal de la sangre [3].

El promedio diario de la síntesis hepática de albúmina en adulto es de 130-200 mg/Kg, y esta cantidad puede incrementar 3 veces si es necesario. El catabolismo normal de albúmina intravascular es del 5-12 % diario; sin embargo, en pacientes con SN la pérdida catabólica varía del 16-50 %. Lo anterior indica que la síntesis de albúmina debe ser capaz de compensar las pérdidas de esta proteína por orina [3].

La síntesis de albúmina en el SN aumenta; sin embargo, este incremento no es suficiente para mantener el nivel plasmático normal de albúmina. Por otra parte, la albuminuria, el catabolismo renal de albúmina y el catabolismo extrarrenal producen la pérdida desproporcionada de una fracción grande de la albúmina intravascular, produciéndose de este modo la hipoalbuminemia [3]. El riñón es el sitio que presenta un mayor catabolismo de la albúmina, y este aumento parece derivarse de una captación tubular y destrucción de la albúmina filtrada [12].

3.7 HIPERLIPIDEMIA E HIPERLIPOPROTEINEMIA.

La hiperlipidemia y la hiperlipoproteinemia constituyen una de las manifestaciones más notables del SN. Numerosos estudios han confirmado un incremento en todas las grasas de la sangre (colesterol sérico, fosfolípidos y triglicéridos plasmáticos), tanto en modelos humanos como animales con SN; simultáneamente existe un aumento en las proteínas transportadoras de lípidos de la sangre, que son las lipoproteínas [3].

Los niveles de colesterol sérico total y fosfolípidos

están casi siempre elevados en SN, excepto en los casos leves. Los niveles de estos lípidos aumentan progresivamente con la gravedad del SN. El nivel de triglicéridos en suero es variable, en muchos casos se aproxima al valor normal pero cuando el síndrome aumenta en severidad, los triglicéridos llegan a aumentar marcadamente, y en casos más severos puede llegar a ser el más prominente de los lípidos en la sangre. Los ácidos grasos están normales, aunque la fracción unida a la albúmina se reduce [3].

3.7.1 Patogénesis de la Hiperlipidemia e Hiperlipoproteinemia.

La patogénesis de los lípidos y lipoproteínas incrementadas en SN, es el resultado final de los defectos presentes en el número de pasos fundamentales de la ruta metabólica de las lipoproteínas [3].

Muchos estudios en SN han presentado una relación inversa entre los lípidos de la sangre y las lipoproteínas con respecto a la concentración de albúmina plasmática; sin embargo, otros estudios sugieren que la albúmina no puede ser por sí misma la responsable de la elevación de los lípidos y de las lipoproteínas; más bien es una función de la baja concentración de albúmina, tal como el volumen sanguíneo o la presión oncótica del plasma. Por lo tanto, la hipoalbuminemia, directamente o indirectamente, es el factor crítico de iniciación de la hiperlipoproteinemia e hiperlipidemia [3].

Actualmente se piensa que la hiperlipoproteinemia en el SN es secundaria a un aumento en su síntesis y a una disminución en su degradación [3].

3.8 RETENCION DE SODIO, ASCITIS Y EDEMA EN EL SN.

La hipótesis clásica que se ha propuesto para la retención de sodio y el desarrollo de ascitis y edema en SN; se fundamenta en que la hipoalbuminemia es el factor crítico que induce a los síntomas antes mencionados [28,29,34]. El mecanismo que se presenta durante la hipoalbuminemia es el siguiente: En el SN existe una disminución de proteínas plasmáticas principalmente albúmina, originando una disminución en la presión oncótica de la sangre lo que favorece el movimiento de agua y solutos al espacio intersticial; presentándose una reducción del volumen sanguíneo (hipovolemia), esta última estimula el sistema renina-angiotensina-aldosterona, mediante mecanismos neurohormonales que inician la retención de sodio y agua para mantener la osmolaridad de los líquidos del cuerpo, dando un progresivo desarrollo del fluido extracelular (edema) [34].

Sin embargo, esta hipótesis no es válida debido a que no en todos los casos de SN se presenta hipovolemia [35] además; se ha encontrado que la actividad plasmática de renina y la aldosterona (ambas son indicadores funcionales del volumen circulante) no siempre se encuentran elevadas en pacientes con SN [36]. Estos hallazgos sugieren que la retención de sodio y la formación de edema no depende del sistema renina-angiotensina-aldosterona, sino que más bien se debe a mecanismos intrarrenales [37].

3.9 SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.

El SN que se desarrolla en humanos, puede ser reproducido experimentalmente en animales mamíferos como las ratas. Las alteraciones renales y sistémicas en la nefrosis experimental son similares a las de la forma clínica de la enfermedad [2].

Para inducir y realizar el estudio de SN experimental, se han diseñado diversos modelos experimentales, en los cuales se emplean inyecciones de las siguientes sustancias:

a) Suero nefrotóxico. Produce nefritis de Heymann [29,38].

b) Aminonucléosido de puromicina (ANP). Se parece mucho al síndrome nefrótico con lesiones mínimas encontradas en humanos [2,39].

c) Adriamicina (ADR o doxorubicina). Una sola inyección intravenosa de 7.5 mg/Kg de peso, produce proteinuria por meses [40].

d) Daunomicina (daunorubicina) [41].

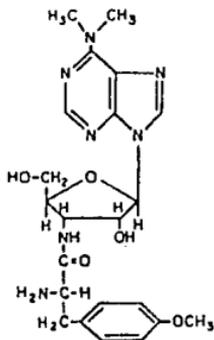
Todas estas sustancias inducen a una proteinuria, que es característica del SN. Las estructuras de estas sustancias se representan en la figura 5.

El ANP produce los siguientes modelos experimentales:

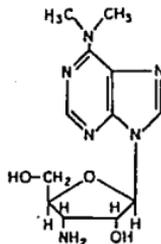
a) SN crónico. Se induce por una inyección intravenosa de ANP a dosis baja (50 mg/Kg de peso corporal total), produciéndose proteinuria crónica y daño renal irreversible [42].

b) SN agudo. Se induce por una o por varias inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de ANP que van de 50-150 mg/Kg

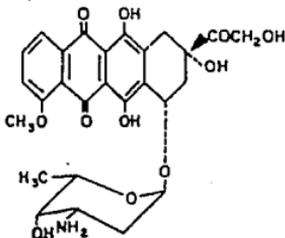
7960. PUOMICINA (P.M.=471.51)



AMINONUCLEOSIDO DE LA PUOMICINA (P.M.= 294)



3428. DOXORUBICINA (P.M.=543.54)
(ADRIAMICINA)



2815. DAUNORUBICINA (P.M.= 527.11)
(DAUNOMICINA)

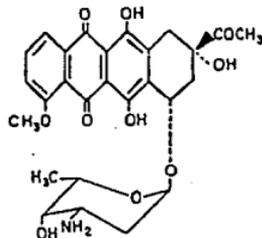


Figura 5. Estructuras de los compuestos usados para producir síndrome nefrótico experimental. La puomicina sólo se muestra como comparación con el ANP. Los números corresponden al Index Merck, décimo primera edición, 1989.

de peso corporal total, desencadenando una proteinuria masiva y SN en un lapso de 7-14 días después de su aplicación, más o menos 3 semanas después la proteinuria disminuye y a las 6 semanas desaparece; lo cual indica que es un proceso reversible [43].

Diversos estudios indican que la patogenia inducida por el ANP es el resultado de un daño directo sobre el riñón, presentando un corto período de inducción; después del cual se presenta la proteinuria [44]. Otros autores han informado que este período de latencia puede ser de 5 a 21 días dependiendo de la dosis y vía de administración [45].

3.10 GENERALIDADES DEL ANP.

El aminonucleósido de puromicina [ANP, 6-dimetilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi-beta-D-ribofuranosil) purina] [46] es un derivado de la puromicina [6-dimetilamino-9-(3'-p-metoxi-L-fenilalanilamino-D-ribosil) purina], este último compuesto obtenido del hongo actinomicete Streptomyces albo-niger fue utilizado como antibiótico, y en el tratamiento de la tripanosomiasis [47]. El ANP se obtiene por la hidrólisis del residuo p-metoxitirosil unido al grupo amino del azúcar de la puromicina (reacción de Edman) [48]. La actividad tripanicida del ANP es mayor que la de la puromicina [49].

La estructura del ANP esta constituida por un anillo de purina con un grupo dimetilamino en la posición 6 y por un aminoazúcar desoxirribosídico en la posición 3'. Se ha observado que ninguna de las dos partes antes mencionadas por sí sola es

el agente nefrotóxico, por lo que el ANP integro tiene esta capacidad [50].

3.11 METABOLISMO Y MECANISMO DEL DANO DEL ANP EN SISTEMAS IN VIVO E IN VITRO.

La vía de administración del ANP puede ser subcutánea, intraperitoneal e intravenosa. Para que exista una menor variación en la excreción basal de proteínas, en modelos experimentales, se debe procurar que las ratas sean de la misma raza, peso, sexo y bajo las mismas condiciones de laboratorio [51].

En diversos estudios, la excreción urinaria de ANP en ratas varía del 25 al 50 % de ANP sin cambio, y el 90% restante se presenta como ANP transformado; esto sucede dentro de las primeras 8 h. Lo anterior se complementa con otros experimentos realizados con ANP marcado radiactivamente, en donde se observa que desde el primer día se presenta un 65 % de la radiactividad total en orina dentro de las primeras 8 h; y en heces se presenta de un 27-30 % de la marca total. Del porcentaje total de ANP en orina (65 %); el 40 % es ANP sin modificar y el 60 % son metabolitos principalmente alantoina, MMPA, APA y ácido úrico. Por lo tanto, el porcentaje de excreción total de ANP marcado es del 92-95 % [52-54].

Después de varios hallazgos se ha propuesto que el metabolismo del ANP in vivo es similar a la vía metabólica de las purinas, debido a la estructura del ANP y su posibilidad de degradarse en metabolitos semejantes a los que se presentan en esta vía metabólica. En la figura 6 se presenta la ruta

catabólica del ANP, la cual esta basada en hallazgos experimentales: el ANP sufre una desmetilación por medio de las enzimas microsomales (desmetilasas) del hígado originando el metabolito MMPA, el cual es desmetilado nuevamente produciendo APA. La primera desmetilación es rápida, esto se debe a que las aminas secundarias son desalquiladas más lentamente que las aminas terciarias. EL APA obtenido anteriormente viene siendo el equivalente de la adenosina (metabolito de la vía de las purinas) y por medio de la enzima desaminasa de la adenosina (ADA) sufre una desaminación en la posición 6 originándose IPA que es el análogo de la inosina. Este último compuesto por acción de una nucleosidasa (PNP) produce hipoxantina. Este último metabolito en presencia de agua, oxígeno y la enzima XO (xantina oxidasa), genera radicales libres del oxígeno y xantina; que por acción nuevamente de XO se forma ácido úrico y radicales libres del oxígeno. El ácido úrico por medio de la enzima uricasa forma la alantoína que es el producto final del metabolismo de las purinas de mamíferos que no son primates. Los radicales libres del oxígeno que se producen en esta vía catabólica, a su vez inducen a la lipoperoxidación en la membrana glomerular, por lo cual se piensa que la hipoxantina se metaboliza vía XO de las purinas, en la cual la actividad de XO esta aumentada [53]. Además, se ha sugerido que la interacción entre tromboxano (TxA_2), leucotrienos (LTs) y radicales libres estan involucrados en la iniciación y desarrollo de la nefrosis por ANP; sin embargo, no existe un mecanismo claro [55]. Otros estudios muestran que las células epiteliales del

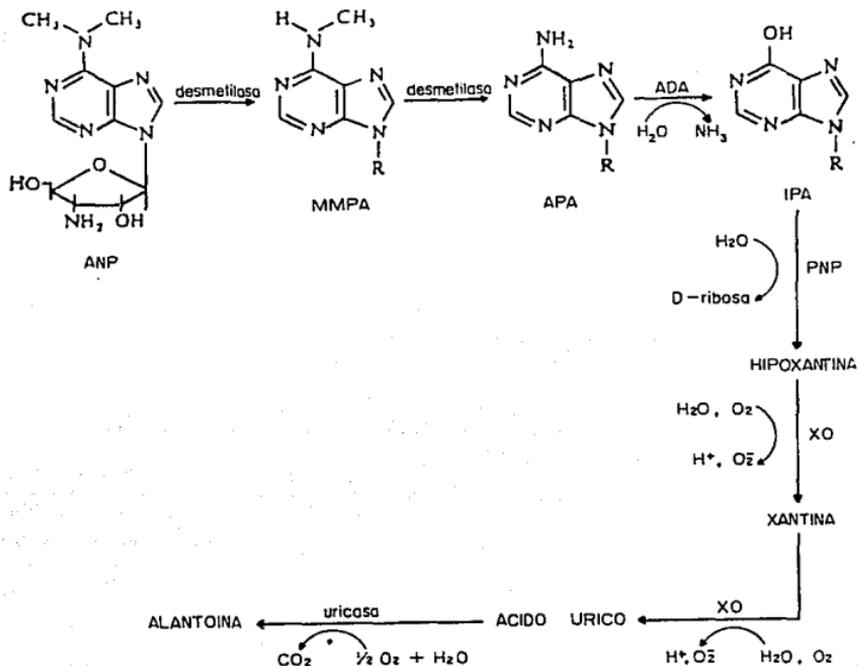


Figura 6. Esquema propuesto para la degradación metabólica de ANP en ratas. Abreviaturas: ANP= 6-dimetilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi-beta-D-ribofuranosil) purina; (aminonucleósido de puromicina). MMPA= 6-metilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi-beta-D-ribofuranosil) purina; (análogo de 6-metil adenosina). APA= 6-amino-9-(3'-amino-3'-desoxi-beta-D-ribofuranosil) purina; (análogo de adenosina). IPA= 6-hidroxi-9-(3'-amino-3'-desoxi-beta-D-ribofuranosil) purina; (análogo de inosina). ADA= desaminasa de la adenosina. PNP= nucleosidasa. XO= xantina oxidasa [53].

glomérulo (GEC) son el blanco de la citotoxicidad del ANP in vitro ya que se produce desprendimiento focal de células, alteración en la síntesis de polianiones y cambios en la "renovación" de glicosamina [56]. Todos estos cambios son considerados como factores que determinan la proteinuria en el modelo de SN por ANP.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1 REACTIVOS.

El aminonucleósido de puromicina (ANP) y los kits comerciales para medir las siguientes enzimas: Leucina aminopeptidasa (LAP), procedimiento No.251; alfa-hidroxiacetato deshidrogenasa (HBD), procedimiento No.DG 120-UV; aldolasa (ALS), procedimiento No.752; gama-glutamil transferasa (GGTP), procedimiento No.545; isocitrato deshidrogenasa (ICD), procedimiento No.176; colinesterasa (CHS), procedimiento No.420 y la albúmina, procedimiento No.631 se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Otros kits comerciales se obtuvieron de Beckman Instruments (México, D.F.) para medir las enzimas restantes: Deshidrogenasa láctica (LDH), catálogo No.683374; aspartato aminotransferasa (AST), catálogo No.683519; fosfatasa alcalina (ALP), catálogo No.683439; creatina cinasa (CK), catálogo No.683280 y alanina aminotransferasa (ALT), catálogo No.683453.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.

En este trabajo se emplearon ratas macho Wistar con un peso corporal de 200-250 g, a las cuales se les indujo el síndrome nefrótico (SN) mediante una inyección subcutánea única con un volumen de 1.5-1.9 ml de una solución de ANP al 2 % en solución salina 0.9 % (equivalente a una dosis de 15 mg de ANP/100 g de peso corporal) [4,6,7]. A los animales control (n=10) únicamente se les inyectó solución salina al 0.9 % (empleando la misma dosis que para ANP). Durante el estudio todos los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas. De 8 a

10 ratas se sacrificaron por decapitación (guillotina Harvard) los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 30 después de la inyección con ANP. Las ratas se sacrificaron los días antes mencionados para observar los perfiles de actividad de las diferentes enzimas, tanto en el estado pre-nefrótico que se presenta del día 1 al día 3 y el estado nefrótico que es a partir del día 4 al día 30 [4]. Se midió el volumen de la orina, se centrifugó y se almacenó a -20°C hasta que se realizó la determinación de proteínas totales. La sangre se centrifugó para separar el suero, el cual se utilizó inmediatamente para medir albúmina, proteínas totales y la actividad de las enzimas.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.

La actividad de las enzimas séricas se midió de acuerdo a las instrucciones dadas en los kits.

a) Aldolasa.

La técnica que se usó para medir la actividad de ALS es una modificación del procedimiento de Sibley & Lehninger [57]. La ALS cataliza la ruptura de fructosa 1-6 difosfato formando dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, la triosa fosfato isomerasa (TPI) presente en suero cataliza casi por completo la conversión del gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato. Posteriormente éste último producto de reacción es hidrolizado a temperatura ambiente formando triosa libre, la cual bajo condiciones alcalinas se convierte en aldehído hidroxipirúvico. Este reacciona con 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar la correspondiente hidrazona a la cual se le agrega más álcali, formando un complejo de color

púrpura estable, el cual es proporcional a la actividad de la ALS y se mide espectrofotométricamente a 560 nm (espectrofotómetro Bausch & Lomb). Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:

- 1) Fructosa 1-6 difosfato $\xrightarrow{\text{ALS}}$ Dihidroxiacetona fosfato + Gliceraldehído 3-fosfato
- 2) Dihidroxiacetona fosfato $\xrightarrow{\text{temp. amb.}}$ Dihidroxiacetona + Fosfato
- 3) Dihidroxiacetona $\xrightarrow{\text{OH}^-}$ Aldehído hidroxipirúvico
- 4) Aldehído hidroxipirúvico + 2,4-dinitrofenilhidrazina \longrightarrow Hidrazona pirúvico
- 5) Hidrazona $\xrightarrow{\text{OH}^-}$ Formación de un complejo de color púrpura intenso.

b) Colinesterasa.

El procedimiento para medir la actividad de CHS se basa en el método de Rappaport [58], en el cual se emplea un indicador, m-nitrofenol, ya que se cuantifica el ácido acético producido por la hidrólisis enzimática de acetilcolina. La disminución del color en la reacción, el cual se mide a 420 nm (espectrofotómetro Bausch & Lomb) es proporcional a la actividad de CHS. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:

- 1) Acetilcolina + Agua $\xrightarrow{\text{CHS, pH 7.8}}$ Colina + Acido acético
- 2) Acido acético + m-nitrofenol \longrightarrow Se produce una disminución en el pH, por lo tanto hay una pérdida de color.

c) Leucina aminopeptidasa.

La determinación de LAP está basada en el método modificado por Martinek y col. [59], el cual consiste en la hidrólisis de L-leucil-beta-naftilamida por LAP para producir L-

leucina más beta-naftilamina. Este producto reacciona con nitrito de sodio en medio ácido para formar un compuesto diazo, el cual reacciona con N-(1-naftil)-etilendiamina para formar un compuesto azo de color azul. La absorbencia de este color a 580 nm (espectrofotómetro Bausch & Lomb) es proporcional a la actividad de LAP. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:

- 1) L-leucil-beta- + Agua $\xrightarrow{\text{LAP}}$ L-leucina + beta-naftilamina naftilamida
- 2) beta-naftilamina + $\text{NaNO}_2 \xrightarrow{\text{H}^+}$ Compuesto diazo
- 3) Compuesto diazo + N-(1-naftil)-etilendiamina \longrightarrow Azo de color azul

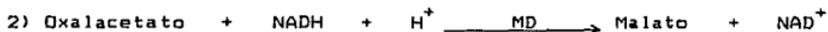
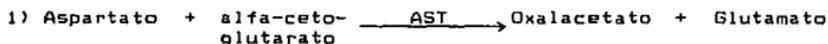
d) Isocitrato deshidrogenasa.

El método colorimétrico empleado para medir la actividad de ICD es una modificación del procedimiento de King [60]; en el cual la ICD sérica cataliza una reacción de descarboxilación oxidativa produciendo dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina (NADPH), bióxido de carbono (CO_2) y oxalosuccinato. Este último producto es inmediatamente descarboxilado para formar el alfa-cetoglutarato. La actividad de ICD es proporcional al alfa-cetoglutarato producido, éste reacciona con 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar la fenilhidrazona. Este producto tiene un intenso color en soluciones alcalinas, a 390 nm (espectrofotómetro Bausch & Lomb). Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:

- 1) L-iso- + $\text{NADP}^+ \xrightarrow[\text{(Mn}^{++}\text{)}]{\text{ICD}}$ $\text{NADPH} + \text{H}^+ +$ alfa-ceto + CO_2
citrato glutarato
- 2) alfa-ceto + 2,4-dinitrofenilhidrazina \longrightarrow Fenilhidrazona
glutarato

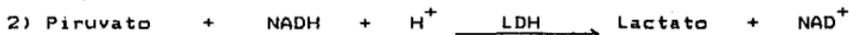
e) Aspartato aminotransferasa.

La actividad de AST se midió de acuerdo al método descrito por Karmen y col. [61]. La AST cataliza la reacción de aminotransferasa que existe entre aspartato y alfa-cetoglutarato, produciendo glutamato más oxalacetato; éste es el producto que se va a cuantificar por medio de una reacción de deshidrogenación, en la cual la malato deshidrogenasa (MD) cataliza la reducción de oxalacetato a malato con la oxidación concomitante del dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina (NADH). La disminución en la absorbencia a 340 nm (fotómetro Boehringer Mod.4010) causada por la oxidación de NADH, es directamente proporcional a la actividad de la AST presente. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



f) Alanina aminotransferasa.

La actividad de ALT se midió de acuerdo al método de Wróbleski & LaDue [62]. El piruvato y glutamato son productos de la reacción entre alanina y alfa-cetoglutarato catalizada por ALT; esta reacción se acopla a una reacción de deshidrogenación, en la cual la deshidrogenasa láctica (LDH) cataliza la reducción de piruvato a lactato con la oxidación simultánea de NADH. La disminución en la absorbencia a 340 nm (fotómetro Boehringer Mod.4010) causada por la oxidación de NADH, es directamente proporcional a la actividad de ALT en la muestra. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



g) Deshidrogenasa láctica.

La actividad de LDH se midió por la técnica directa [63]. La LDH cataliza la reacción de óxido-reducción entre lactato y NAD, induciendo a la formación del piruvato y NADH. El incremento en la absorbencia a 340 nm (fotómetro Boehringer Mod.4010) se debe al aumento en la producción de NADH. La velocidad del cambio en la absorbencia es directamente proporcional a la actividad de la LDH en la muestra. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



h) alfa-Hidroxiacetato deshidrogenasa.

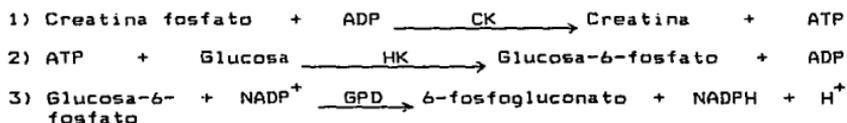
La HBD cataliza la reducción de 2-cetobutirato a 2-hidroxiacetato con la oxidación concomitante de una cantidad equimolar de NADH a NAD [64]. Por lo tanto, la cantidad de cambio de la absorbencia a 340 nm (fotómetro Boehringer Mod.4010) se debe a la oxidación de NADH, que es directamente proporcional a la actividad de HBD. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



i) Creatina cinasa.

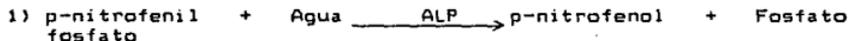
La CK cataliza la transferencia reversible de un grupo de creatina fosfato a adenosina difosfato (ADP) formando adenosina trifosfato (ATP). La velocidad de la formación del ATP se mide a través del uso de 2 reacciones acopladas catalizadas por

hexocinasa (HK) y deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (GPD). La velocidad de la reducción del NADP a NADPH se determina midiendo el aumento en la absorbencia a 340 nm (fotómetro Boehringer Mod.4010). El ritmo del cambio en la absorbencia está directamente relacionado con la actividad de la CK en el suero; la determinación de esta enzima es mediante el procedimiento modificado por Rosalki [65]. La secuencia de las reacciones enzimáticas es la siguiente:



j) Fosfatasa alcalina.

La ALP cataliza la hidrólisis de p-nitrofenilfosfato a p-nitrofenol más fosfato, esta reacción esta descrita en el método de Bessey [66]. El p-nitrofenol es el producto que se cuantifica a 405 nm (fotómetro Boehringer Mod.4010). El aumento en la absorbencia es directamente proporcional a la actividad de ALP en la muestra. La reacción enzimática que se lleva a cabo es la siguiente:



k) gama-Glutamil transferasa.

La GGTP se midió por el método descrito por Naftalin [67]. La gama-L-glutamyl-p-nitroanilida sirve como sustrato y la glicil-glicina como la molécula aceptora del grupo glutamil liberado por la acción de GGTP. La p-nitroanilina liberada es diazotada de acuerdo a la reacción modificada de Bratton-

4.4 PRESENTACION DE DATOS Y ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos se expresan como el promedio +/- desviación estándar. EL análisis estadístico se realizó por medio de la prueba t de Student no pareada. Los valores de p menores que 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS.

Las ratas inyectadas con el aminonucleósido de puromicina (ANP) desarrollaron una marcada proteinuria, poliuria, hipoproteinemia y ascitis. El fluido ascítico acumulado se perdió rápidamente como poliuria.

De la figura 7 a la 12 se presentan las curvas de calibración de albúmina, ALS, GGTP, LAP, ICD y CHS respectivamente; en las cuales se presentan la ordenada al origen (b), el coeficiente de correlación (r) y la pendiente (m).

En todas las figuras se consideró el estado pre-nefrótico a partir del día 1 al día 3, y el estado nefrótico a partir del día 4 en adelante; por otra parte, todos los valores control están dados el día cero. Los datos expresados en las diversas figuras están dados como el promedio +/- la desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

En las figuras 13 y 14 se presentan los perfiles de la excreción de proteínas en orina y el volumen urinario respectivamente. La excreción urinaria de proteínas aumentó el día 4, alcanza su máximo valor el día 8 y después disminuye paulatinamente, sin embargo, en el día 30 aún está significativamente elevado. El volumen urinario aumentó el día 6, alcanzó su valor máximo el día 8 y después disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores no diferentes del control el día 30.

En las figuras 15 y 16 se presentan los perfiles de las proteínas totales y de albúmina en suero respectivamente; los niveles séricos de proteínas totales y de albúmina disminuyeron el día 4. Las proteínas totales alcanzaron su valor más bajo el día 6 y después aumentaron progresivamente hasta alcanzar valores

control el día 20. La albúmina alcanzó sus valores más bajos los días 6-16 y regresó a valores control el día 30.

En las figuras 17 y 18 se presentan los perfiles de actividad de las enzimas ALS y CHS respectivamente. La actividad de ambas enzimas se elevó durante el estado nefrótico (días 4 y 6 respectivamente); sin embargo, la ALS en contraste con la CHS no regresó a valores control. Esta última enzima regresó a valores control a partir del día 16.

Las actividades de las enzimas LDH, HBD, CK, ALP y ALT están en las figuras 19 a la 23 respectivamente. Todas disminuyeron durante el estado nefrótico, excepto la ALP que decreció a partir del estado pre-nefrótico. Las actividades de casi todas las enzimas permanecieron bajas; al final del estudio sólo las actividades de la ALP y la ALT regresaron a valores control a partir de los días 16 y 20 respectivamente. Por otra parte, la LDH y la HBD presentan perfiles de actividad semejantes; tal vez esto se deba a que son isoenzimas.

Las actividades de las enzimas ICD en la figura 24 y AST en la figura 25, incrementaron en el estado pre-nefrótico y disminuyeron durante el estado nefrótico. La actividad de ICD no regresó a valores control, ya que presentó una actividad baja al final del estudio; y la AST regresó a valores control el día 30.

La actividad de LAP en la figura 26 aumentó el día 4 y posteriormente disminuyó substancialmente el día 8 (ambos días corresponden al estado nefrótico), regresando a valores control a partir del día 16.

La actividad de la GGTP en la figura 27 permaneció

constante a lo largo del estudio. Los valores control fueron:
3.38 +/- 0.55 UI/ml.

En las tablas 3 y 4 se encuentran los resultados condensados de todas las figuras.

CURVA DE CALIBRACION DE ALBUMINA

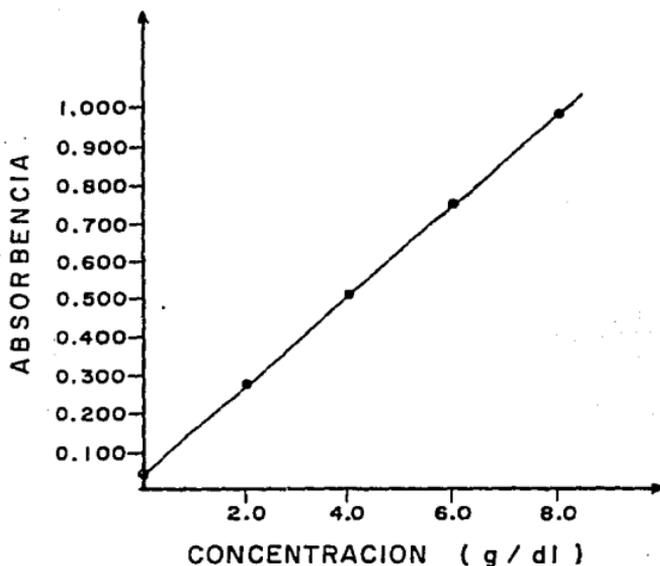


Figura 7. Curva de calibración de albúmina: $r=0.9944$, $b=0.04$ y $m=0.1186$. La absorbencia se leyó a 628 nm.

CURVA DE CALIBRACION DE ALS

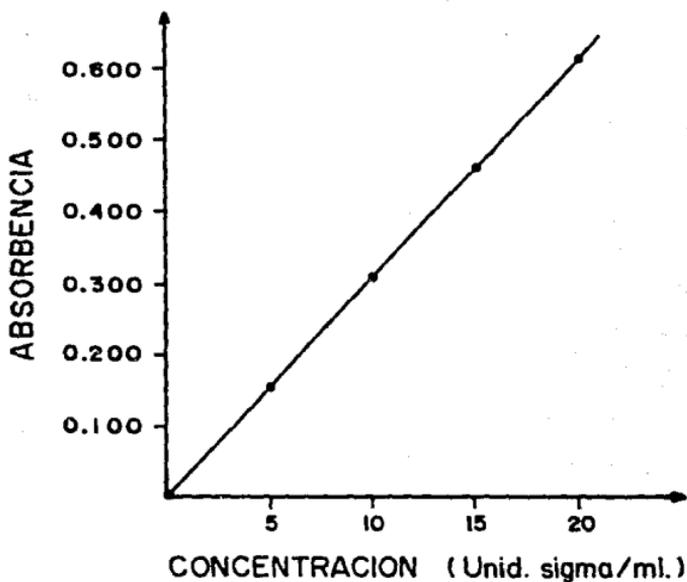


Figura B. Curva de calibración de aldolasa: $r=0.9990$, $b=0.006$ y $m=0.0308$. La absorbencia se leyó a 560 nm.

CURVA DE CALIBRACION DE GGTP

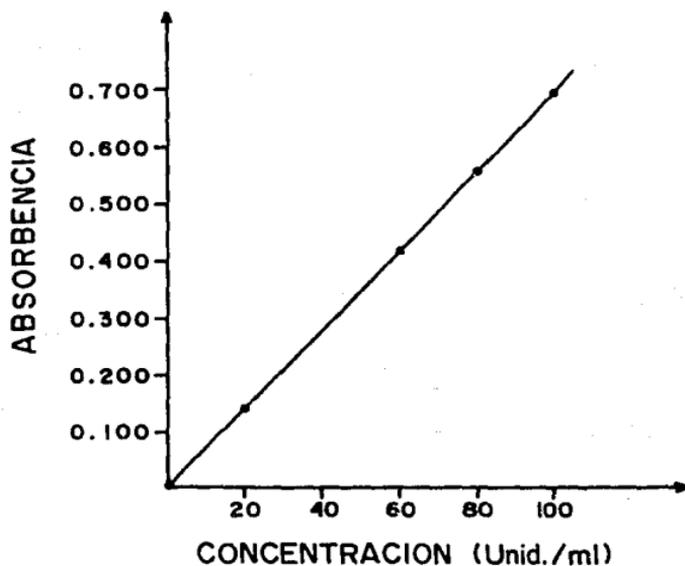


Figura 9. Curva de calibración de gama-glutamyl transferasa: $r=0.9996$, $b=0.0019$ y $m=0.007$. La absorbencia se leyó a 540 nm.

CURVA DE CALIBRACION DE LAP

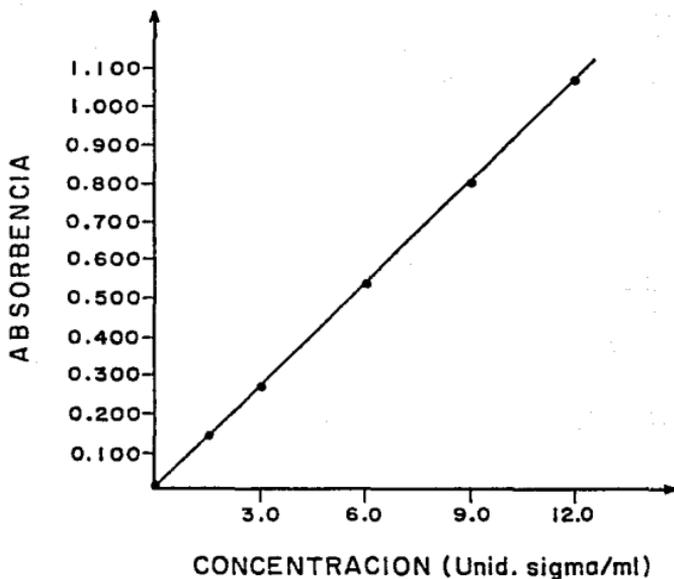


Figura 10. Curva de calibración de leucina aminopeptidasa: $r=0.9990$, $b=0.0048$ y $m=0.0886$. La absorbencia se leyó a 580 nm.

CURVA DE CALIBRACION DE ICD

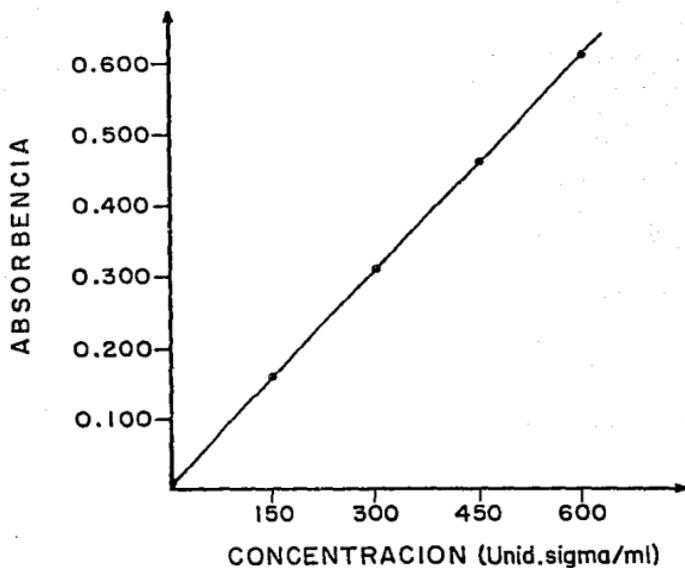


Figura 11. Curva de calibración de isocitrato deshidrogenasa: $r=0.9963$, $b=0.0085$ y $m=0.0009$. La absorbencia se leyó a 390 nm.

CURVA DE CALIBRACION DE CHS

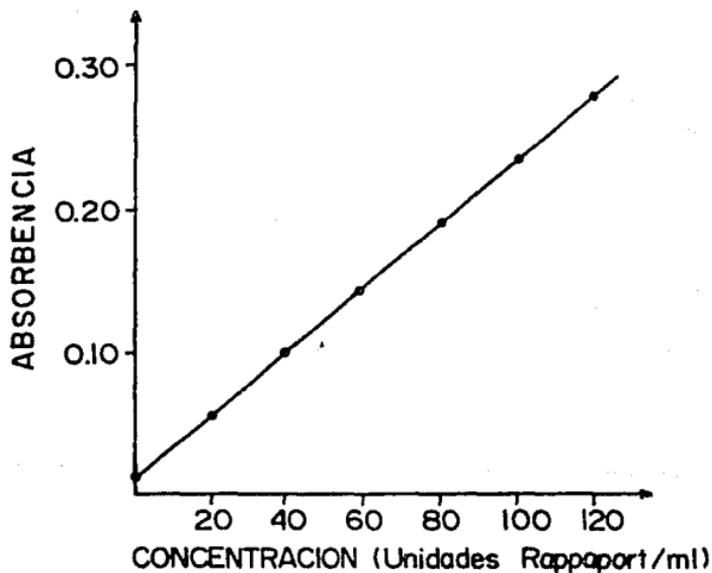


Figura 12. Curva de calibración de colinesterasa: $r=0.9976$, $b=0.0107$ y $m=0.0022$. La absorbancia se leyó a 420 nm.

PROTEINAS EN ORINA

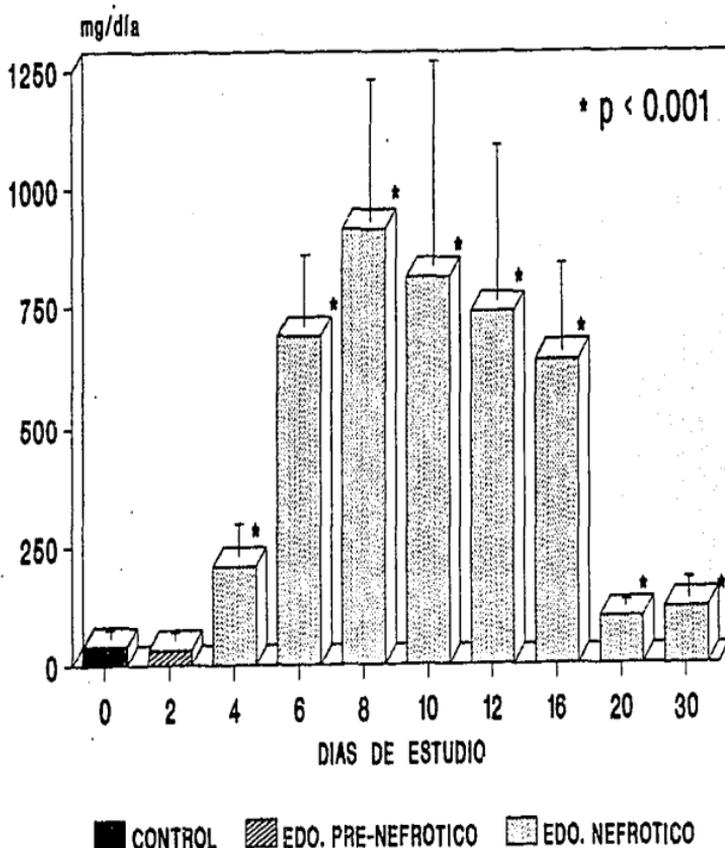


Figura 13. Perfil de proteínas en orina en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

VOLUMEN URINARIO

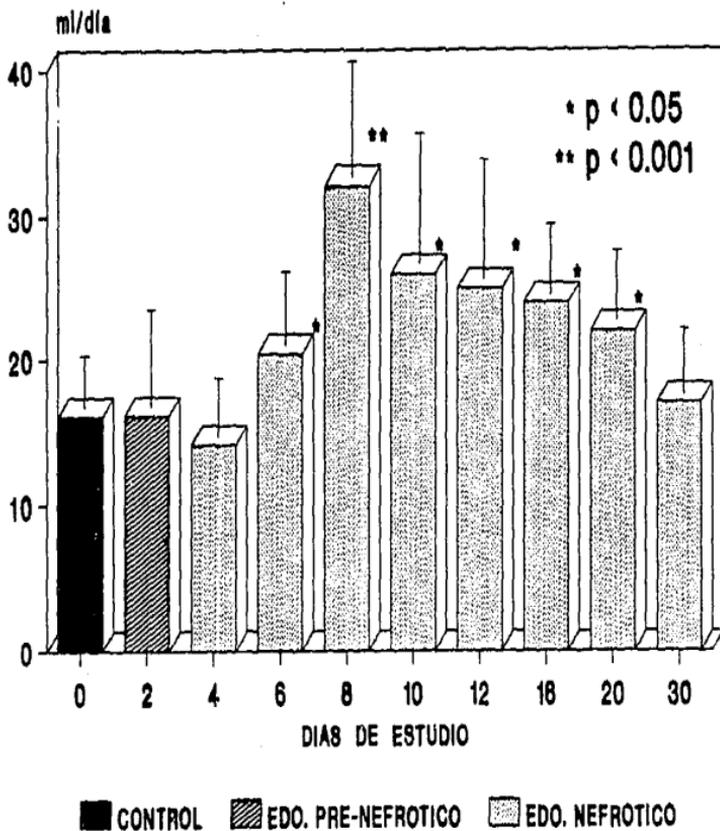


Figura 14. Perfil de volumen urinario en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

PROTEINAS TOTALES EN SUERO

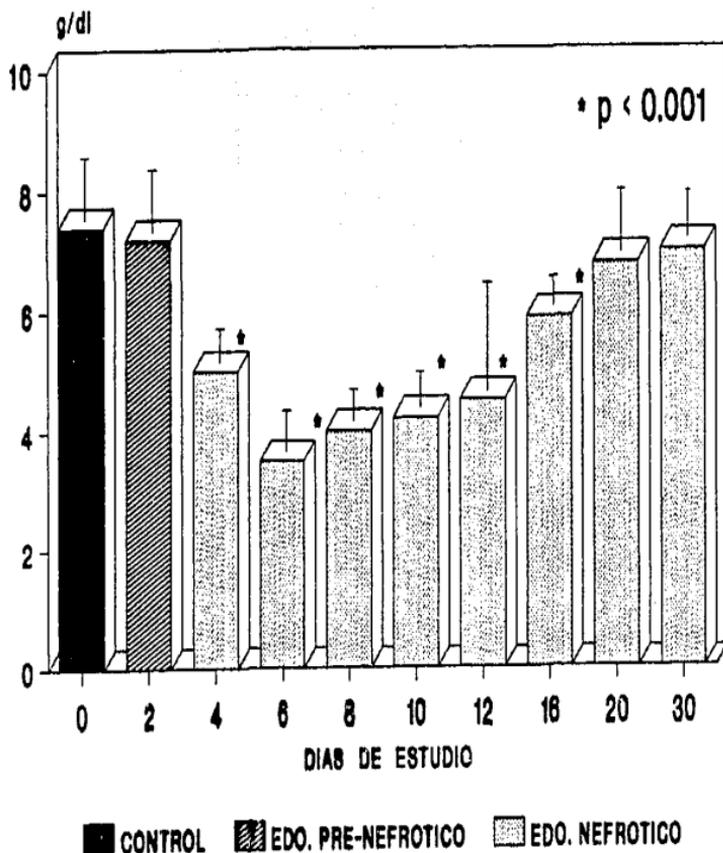


Figura 15. Perfil de proteínas totales en suero en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

ALBUMINA SERICA

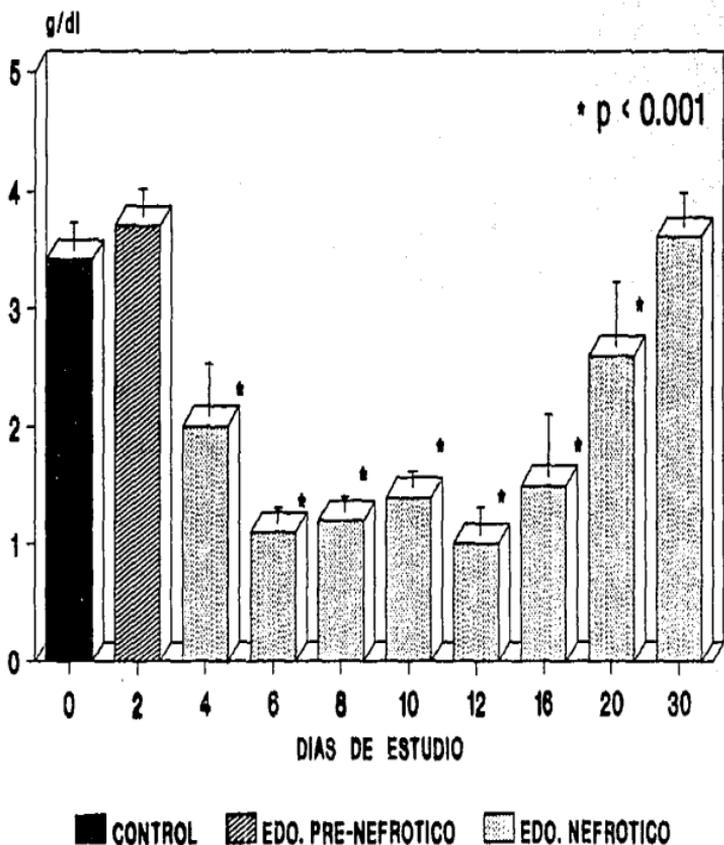


Figura 16. Perfil de albúmina sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

ALDOLASA

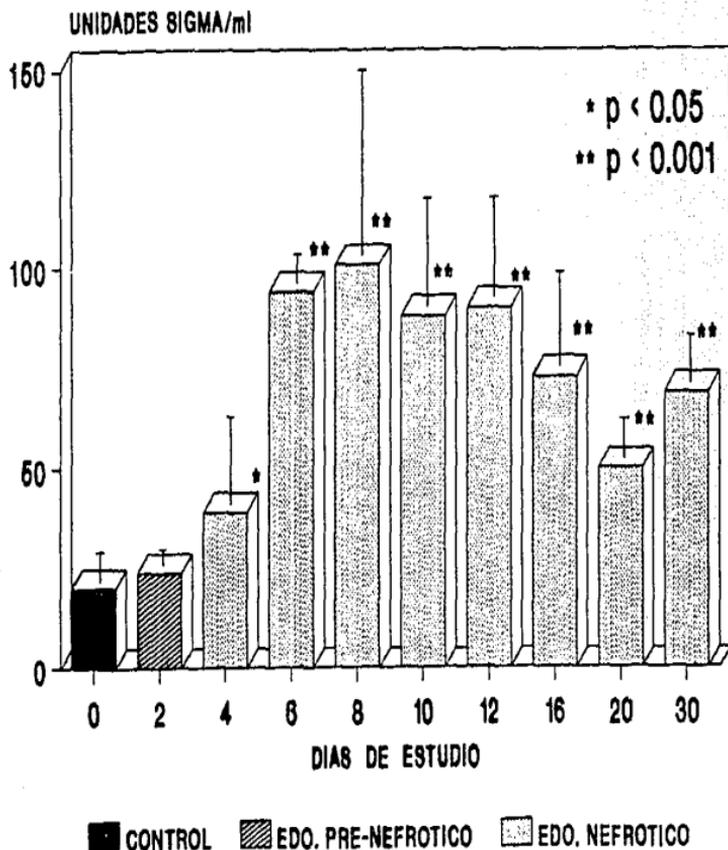


Figura 17. Perfil de actividad de aldolasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

COLINESTERASA

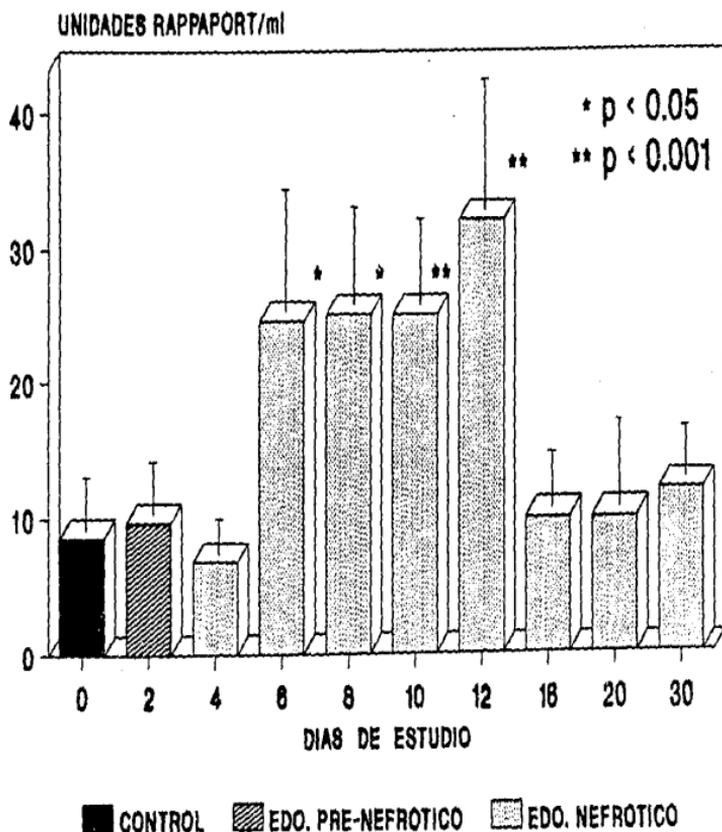


Figura 18. Perfil de actividad de colinesterasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

DESHIDROGENASA LACTICA

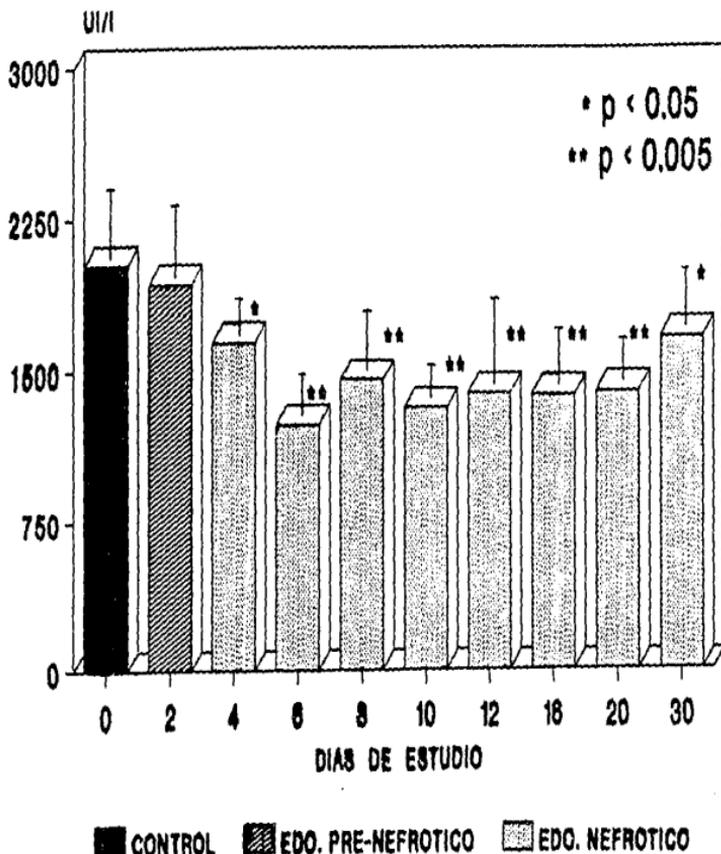


Figura 19. Perfil de actividad de deshidrogenasa láctica sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

ALFA-HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA

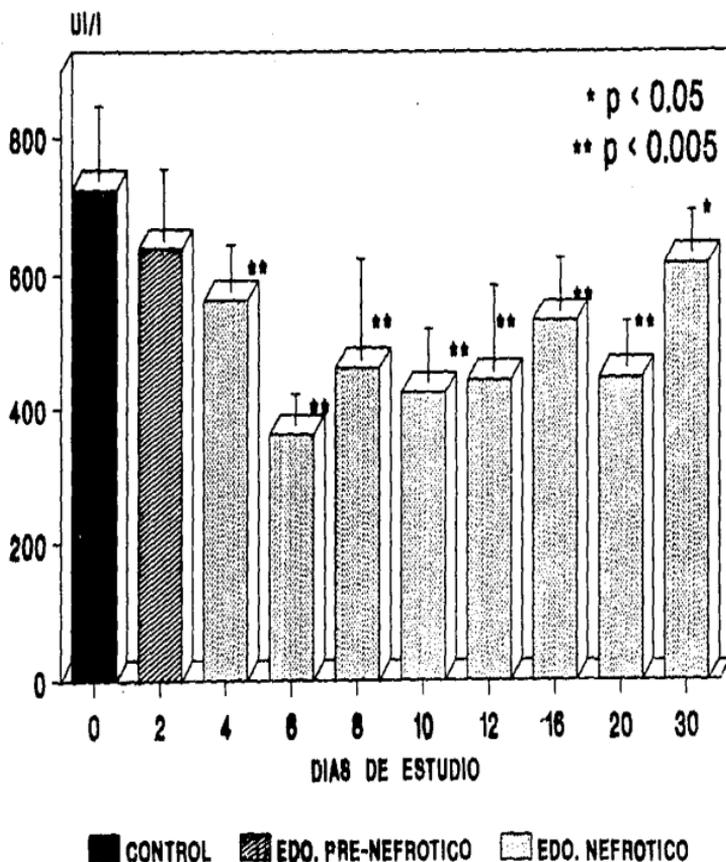


Figura 20. Perfil de actividad de alfa-hidroxibutirato deshidrogenasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

CREATINA CINASA

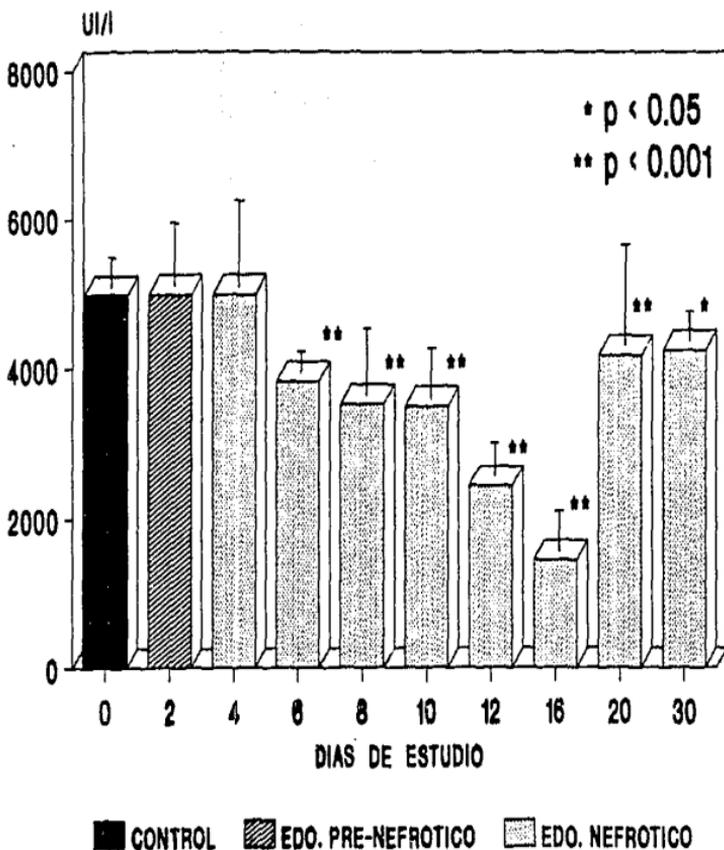


Figura 21. Perfil de actividad de creatina cinasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

FOSFATASA ALCALINA

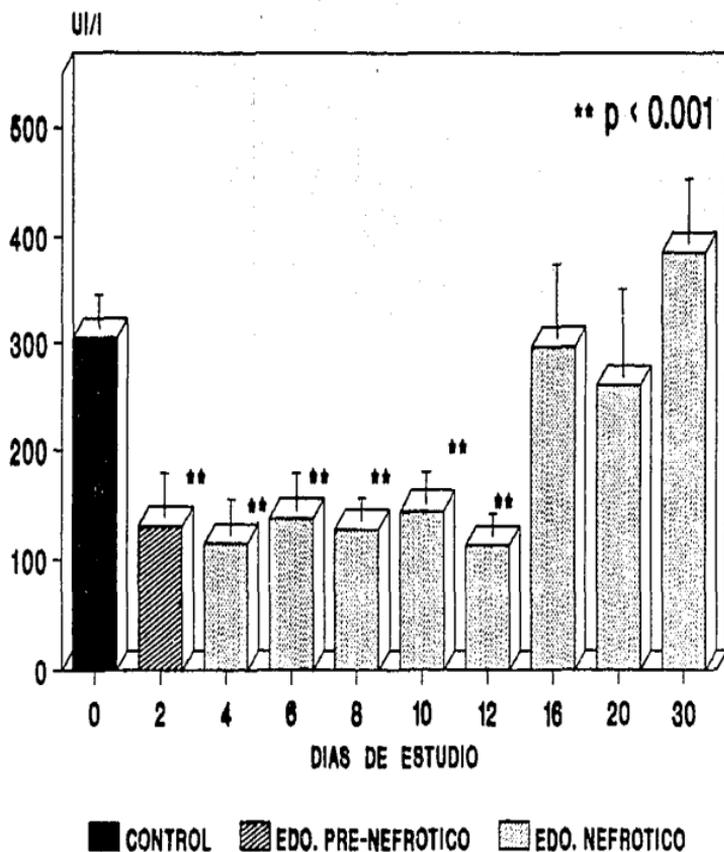


Figura 22. Perfil de actividad de fosfatasa alcalina sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

ALANINA AMINOTRANSFERASA

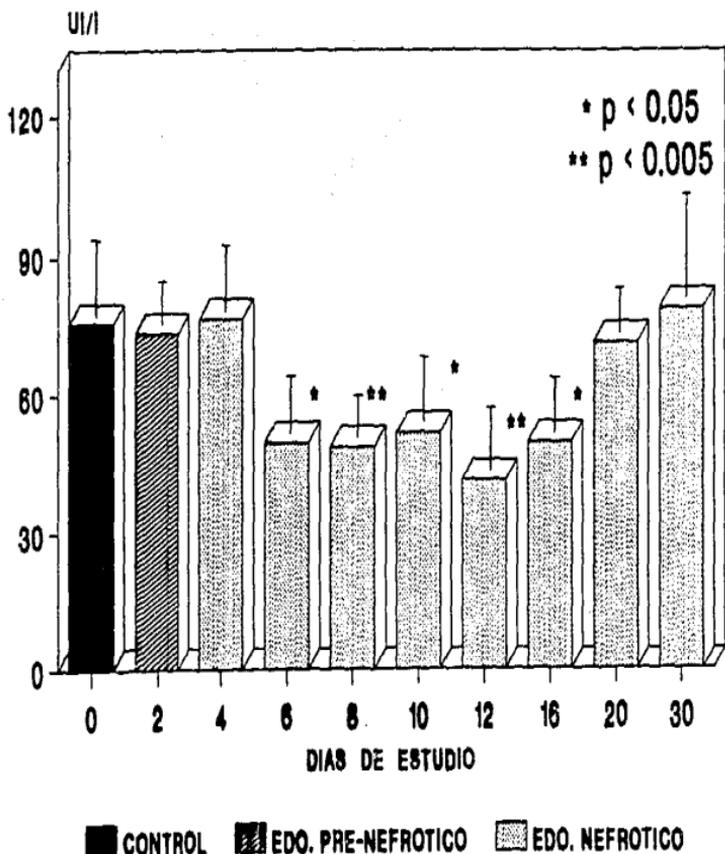


Figura 23. Perfil de actividad de alanina aminotransferasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

ISOCITRATO DESHIDROGENASA

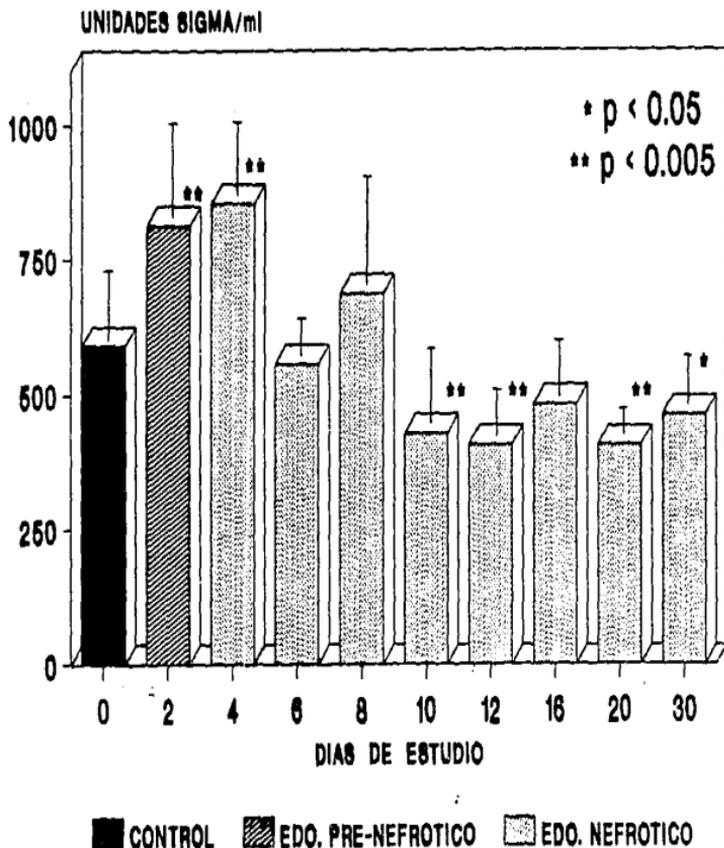


Figura 24. Perfil de actividad de isocitrato deshidrogenasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

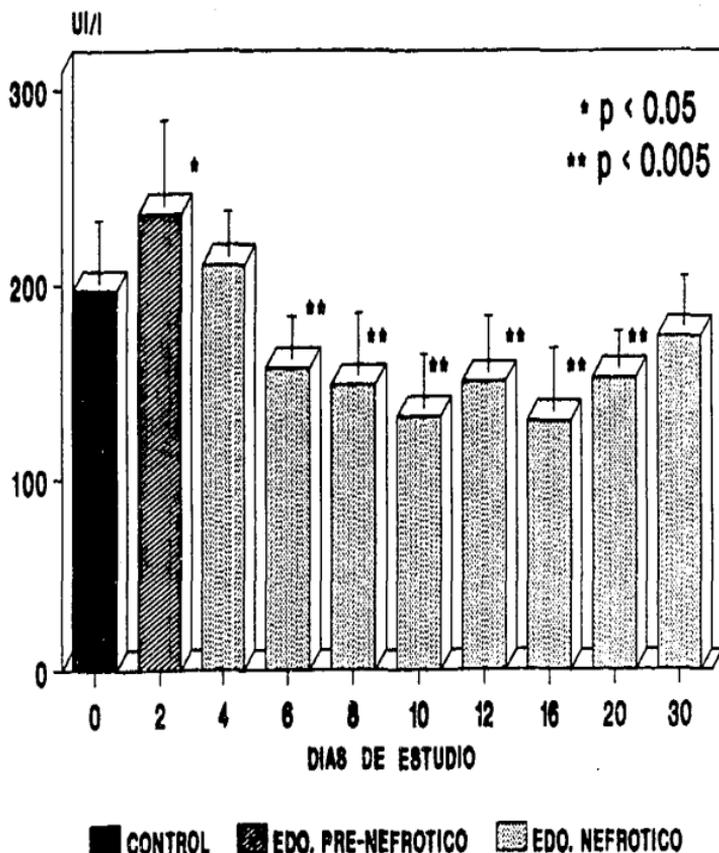
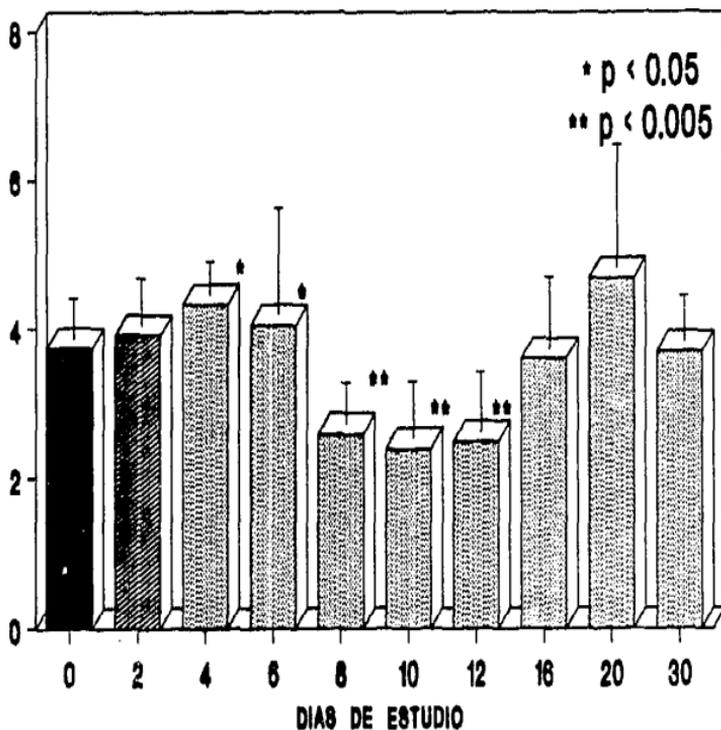


Figura 25. Perfil de actividad de aspartato aminotransferasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

LEUCINA AMINOPEPTIDASA

UNIDADES SIGMA/ml



■ CONTROL ▨ EDO. PRE-NEFROTICO ▩ EDO. NEFROTICO

Figura 26. Perfil de actividad de leucina aminopeptidasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio +/- desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASA

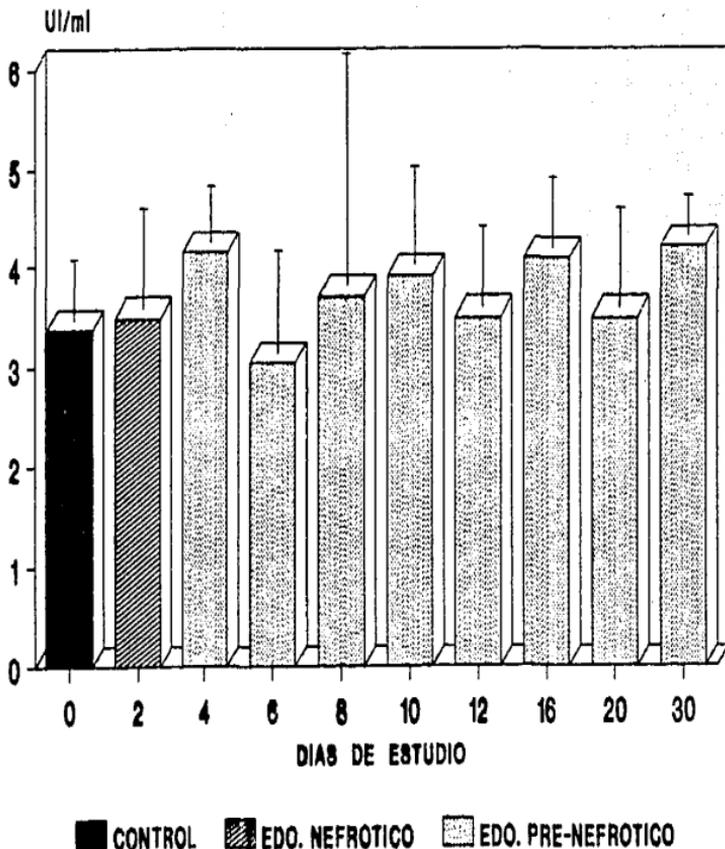


Figura 27. Perfil de actividad de gama-glutamyl transferasa sérica en ratas control (día cero) y ratas nefróticas con ANP. Los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar de 8-10 determinaciones por cada día.

TABLA 3. RESULTADOS DE PROTEINAS EN ORINA Y EN SUERO, ALBUMINA SERICA Y VOLUMEN URINARIO EN SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.

Figs.	Determinaciones	Valor ctrl. +/- desv. estándar.	Aumento	Disminución	Notas
13	Proteínas en orina (mg/día).	38 +/- 11	* 4-30 ** 8 *** 916		No regresó a valores control.
14	Volumen urinario (ml/día).	15.9 +/- 3.6	* 6-20 ** 8 *** 32		Regresó a valores control.
15	Proteínas totales en suero (g/dl).	7.4 +/- 1		* 4-16 ** 6 *** 3.5	Regresó a valores control.
16	Albumina sérica (g/dl).	3.4 +/- 0.23		* 4-20 ** 12 *** 1	Regresó a valores control.

* Días en que aumentó o disminuyó la concentración o volumen de las determinaciones.

** Día en que se presenta el mayor cambio de las determinaciones.

*** Valor que presenta el día de mayor cambio.

TABLA 4. RESULTADOS DE LAS ONCE ENZIMAS SERICAS DETERMINADAS SECUENCIALMENTE EN SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.

Figs.	Enzimas medidas	Valor ctrl. +/- desv. estándar.	Aumento	Disminución	Notas
17	Aldolasa (unidades sigma/ml)	20 +/- 7	* 4-30 ** 8 *** 101		No regresa a valores control.
18	Colinesterasa (U. Rappapor/ml)	8.5 +/- 3.9	* 6-12 ** 12 *** 32		Regresa a valores control.
19	Deshidrogenasa láctica (U/l)	2022 +/- 331		* 4-30 ** 6 *** 1233	No regresa a valores control.
20	alfa-Hidroxi- butirato deshidrogenasa (U/l)	724 +/- 107		* 4-30 ** 6 *** 362	No regresa a valores control.
21	Creatina cinasa (U/l)	4973 +/- 371		* 6-30 ** 16 *** 4173- 4237	No regresa a valores control.
22	Fosfatasa alcalina (U/l)	305 +/- 33		* 2-12 ** 12 *** 114	Regresa a valores control.

* Días en que aumentó o disminuyó la concentración de las enzimas medidas.

** Día en que se presenta el mayor cambio de las enzimas medidas.

*** Valor que presenta el día de mayor cambio.

TABLA 4. RESULTADOS DE LAS ONCE ENZIMAS SERICAS DETERMINADAS SECUENCIALMENTE EN SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.

Figs.	Enzimas medidas	Valor ctrl. +/- desv. estándar.	Aumento	Disminución	Notas
23	Alanina amino- transferasa (U/l)	76 +/- 16		* 6-16 ** 12 *** 42	Regresa a valores control.
24	Isocitrato deshidrogenasa (Unidades sigma/ml)	590 +/- 124	* 2-4 ** 4 *** 854	* 10-30 ** 20 *** 408	No regresa a valores control.
25	Aspartato amino- transferasa (U/l)	197 +/- 31	* 2 ** 2 *** 236	* 6-20 ** 16 *** 130	Regresa a valores control.
26	Leucina amino- peptidasa (Unidades sigma/ml)	3.74 +/- 0.56	* 4-6 ** 4 *** 4.34	* 8-12 ** 10 *** 2.4	Regresa a valores control.
27	gama-Glutamil Amino- transferasa (U/ml)	3.38 +/- 0.55			Permanece constante.

- * Días en que aumentó o disminuyó la concentración de las enzimas medidas.
- ** Día en que se presenta el mayor cambio de las enzimas medidas.
- *** Valor que presenta el día de mayor cambio.

6. DISCUSSION.

El aminonucléosido de puromicina (ANP) ha sido muy empleado para producir nefrosis en ratas [4-7,11,18,20]; este es el producto de la hidrólisis (Degradación de Edman) del antibiótico puromicina [46]. A diferencia de la puromicina, el ANP no es un inhibidor específico de la síntesis de proteínas [70]. La nefrosis inducida en las ratas tratadas con ANP, es un modelo experimental muy útil; debido a que existen semejanzas entre las lesiones glomerulares y las alteraciones metabólicas; del modelo experimental y el síndrome nefrótico (SN) en humano [1,2].

La nefrosis experimental y en humano se caracterizan por presentar alteraciones profundas en el metabolismo de muchas proteínas plasmáticas. Se ha medido la concentración sérica de diversas proteínas en ratas y en humanos con SN, y se ha observado que, a pesar de una marcada hipoproteïnemia producida por la disminución de muchas proteínas individuales; las concentraciones séricas de algunas proteínas pueden ser altas [3-8,18,20], bajas [3-7,9,10,18] o normales [18]. Además, se ha documentado el aumento en la excreción urinaria de muchas proteínas circulantes [13,71]; excepto la pérdida en orina del fibrinógeno [8]. Prosiguiendo con las investigaciones anteriores sobre el comportamiento de diversas proteínas circulantes en ratas nefróticas con ANP, en este trabajo, se midió la actividad de once enzimas circulantes en el modelo experimental.

Los perfiles de actividad de casi todas las enzimas séricas medidas cambiaron durante el estado nefrótico; con excepción de ALP, ICD y AST que cambiaron en el estado pre-nefrótico: ALS y CHS aumentaron; LDH, HBD, CK, ALT y ALP

disminuyeron; LAP, ICD y AST presentaron un modelo bifásico, en el cual, primero aumentan y después disminuyen; por último la GGTP permaneció sin cambio (tabla 5). Solamente los perfiles de actividad de HBD y LDH fueron similares; los demás son totalmente diferentes. Estos hallazgos sugieren que la actividad de cada enzima medida en este trabajo, durante la nefrosis experimental esta regulada específicamente.

La concentración de una proteína plasmática específica es el resultado neto de las siguientes variables: síntesis, degradación, pérdida corporal y/o volumen plasmático. De hecho, la excreción urinaria incrementada [3-8,10-12,15,16], los cambios en síntesis [3,5,8,72] y la degradación [3,18] de varias proteínas en SN experimental están bien documentadas. Algunas proteínas tal como protrombina, renina y la enzima convertidora de angiotensina I (ECA); aumentan su síntesis suficientemente para compensar sus pérdidas en orina, y por lo tanto aumentan sus niveles circulantes. Otras proteínas tal como albúmina, transferrina, glicoproteína ácida alfa-1, angiotensinógeno, antitrombina III y ceruloplasmina no tienen la capacidad de incrementar su síntesis para balancear su pérdida en orina y/o su degradación aumentada. Finalmente, la síntesis del fibrinógeno está aumentada aún cuando no se pierde en orina.

La actividad de algunas enzimas intracelulares aumenta en la circulación cuando las células están dañadas y, por lo tanto las membranas celulares llegan a ser muy permeables [73]. Una o la combinación de las variables antes mencionadas pueden estar involucradas en los cambios de la actividad enzimática en suero,

TABLA 5. PESOS MOLECULARES Y ACTIVIDADES DE ONCE ENZIMAS
CIRCULANTES EN NEFROSIS EXPERIMENTAL.

Enzima	EC número	Peso molecular (KDa)	Referencia	Actividad sérica en nefrosis con ANP
ALS	4.1.2.13	160 músculo 156 hígado	81	Aumentó
CHS	3.1.1.8	348 suero	81	Aumentó
CK	2.7.3.2	82 cerebro, músculo	81	Disminuyó
LDH	1.1.1.27	140 corazón, hígado	81	Disminuyó
HBD	1.1.1.27	140 corazón	81	Disminuyó
ALT	2.6.1.2	101 hígado	78	Disminuyó
ALP	3.1.3.1	140 intestino 120 placenta, hueso	81	Disminuyó
AST	2.6.1.1	90 hígado, corazón	81	Aumentó/disminuyó
ICD	1.1.1.41	330 corazón	78	Aumentó/disminuyó
LAP	3.4.1.1	230-330 cristalino, hígado, riñón	81	Aumentó/disminuyó
GGTP	2.3.2.2	90 suero	82	Sin cambio

ALS: Aldolasa;
 CHS: Colinesterasa;
 CK: Creatina cinasa;
 LDH: Lactato deshidrogenasa;
 HBD: alfa-Hidroxi butirato deshidrogenasa;
 ALT: Alanina aminotransferasa;
 ALP: Fosfatasa alcalina;
 AST: Aspartato aminotransferasa;
 ICD: Isocitrato deshidrogenasa;
 LAP: Leucina aminopeptidasa;
 GGTP: gama-Glutamil transferasa.

observada en este trabajo.

El aumento en la actividad de ALS, CK, LDH y HBD son consideradas marcadores de la lesión cardíaca y muscular; y los niveles altos de ALT, ALP, AST ICD, LAP y GGTP son marcados en el daño hepático y/o enfermedad hepatobiliar. Sin embargo, puesto que estas enzimas no son específicas de algún tejido en particular; estas pueden aumentar también en respuesta a un daño en otros tejidos [73]. Por otra parte, se ha encontrado que la actividad sérica de CHS esta incrementada tanto en nefrosis en humano como en forma experimental [13,74]; se ha sugerido que este aumento es secundario a una elevación en la síntesis de proteínas en el hígado.

Se conoce que las ratas excretan de un 25-50 % del ANP como una sustancia sin cambio, y que un 90 % del resto se presenta como producto transformado dentro de las primeras 8 h. [52-54], es posible que el aumento en la actividad sérica de algunas enzimas se deba a las células liberadas en el daño producido por ANP. En efecto se ha demostrado que el ANP produce lesión en el corazón [75] y en el hígado [76], y que puede afectar la actividad de algunas enzimas hepáticas durante el estado pre-nefrótico [77]. El aumento en la síntesis enzimática y/o disminución en la degradación enzimática también puede explicar la elevación en la actividad enzimática, sin embargo, por el momento no se conoce el porcentaje de síntesis y degradación de estas enzimas.

La disminución en la actividad enzimática en suero puede ser consecuencia simplemente de pérdida en orina. Esta sugerencia se basa en el hecho de que la actividad de casi todas las enzimas

disminuyó durante el estado proteinúrico de la enfermedad. Aunque algunas enzimas son muy grandes (tabla 5), se ha demostrado por estudios de microscopía electrónica que la ferritina (445 KDa) [78] y la catalasa (245 KDa) [78], las cuales no penetran la membrana basal glomerular normal; son permeables en la membrana basal glomerular de ratas nefróticas con ANP y aparecen en la orina [79]. Esto indica que las proteínas séricas, tan grandes como ferritina, pueden perderse en la orina de ratas nefróticas con ANP. Otros autores han observado que la ALP es eliminada en orina de ratas nefróticas por ANP [80]. No obstante, la disminución en la síntesis enzimática, el aumento en la degradación enzimática o una combinación de éstos factores, puede también estar involucrado en la disminución de la actividad enzimática. En realidad la caída en la actividad de ALP durante el estado pre-nefrótico, indica que otros factores además de la pérdida en orina pueden estar involucrados.

Finalmente, la importancia de este estudio fue ampliar el panorama de las once enzimas determinadas en SN experimental, para que de este modo no solamente se les atribuya una importancia clínica específica para ciertos órganos, como en enfermedades hepáticas o cardíacas; sino que la determinación de éstas pueda constituir parte del cuadro clínico manifestado en el SN. Por otra parte, estos hallazgos pueden servir como base para realizar nuevas investigaciones sobre el SN en humanos.

7. CONCLUSION.

Basándose en los resultados obtenidos podemos concluir que, las ratas nefróticas tratadas con ANP presentan profundas alteraciones en la actividad de las once enzimas medidas. El mecanismo por el cual la actividad sérica de éstas enzimas se modifica en las ratas nefróticas no se conoce por el momento. Este y otros hallazgos sobre los perfiles séricos heterogéneos de otras proteínas en síndrome nefrótico experimental, realizados por otros autores confirman fuertemente el argumento de que los mecanismos de regulación de síntesis de proteínas en la nefrosis experimental parecen ser diferentes para cada proteína.

8. REFERENCES.

1. Vernier, R.L., Papermaster, B.W. and Good, R.A.: Aminonucleoside nephrosis. I. Electron microscopic studies of the renal lesion in rats. *J. Exp. Med.*, 109: 115-126, 1959.
2. Frenk, S., Antonowics, V.M., Craig, J.M. and Metcoff, J.: Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 89: 424-427, 1955.
3. Bernard, D.B.: Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome, pathophysiology and complications. In: *The Nephrotic Syndrome, Contemporary Issues in Nephrology*, vol.9. Brenner, B.M. and Stein, J.H. (Eds.), Churchill Livingstone, New York, 1982, p.p. 85-120.
4. Pedraza-Chaverri, J., Cruz, C., Ibarra-Rubio, M.E., Chávez, M.T., Calleja, C., Tapia, E., Uribe, M.C., Romero, L. and Peña, J.C.: Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-system on sodium retention. *Rev. Invest. Clin.*, 42: 29-38, 1990.
5. Pedraza-Chaverri, J., Cruz, C., Chávez, M.T., López, A., Ibarra-Rubio, M.E., Tapia, E. and Peña, J.C.: Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. In vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev. Invest. Clin.*, 42: 120-126, 1990.
6. Pedraza-Chaverri, J., Cruz, C., Chávez, M.T., Ibarra-Rubio, M.E., Tapia, E. and Peña, J.C.: Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on sodium retention and proteinuria. *Rev. Invest. Clin.*, 42: 210-216, 1990.
7. Arévalo, A.E., Ibarra-Rubio, M.E., Cruz, C., Peña, J.C. and Pedraza-Chaverri, J.: Angiotensin I -converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside- nephrotic syndrome. *Clin. Chim. Acta.*, 191: 175-184, 1990.
8. Girot, R., Jaubert, F., Leon, M., Bellon, B., Aiach, M., Jossot, F., Lepelletier, G., Beguin, S. and Monnet, J.P.: Albumin, fibrinogen, protrombin and antithrombin III variations in blood, urines and liver in rat nephrotic syndrome (Heymann nephritis). *Thromb. Haemostas.*, 49: 13-17, 1983.
9. Alfrey, A.C. and Hammond, W.S.: Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int.*, 37: 1409-1413, 1990.
10. Khamiseh, G., Vaziri, N.D., Oveisi, F., Ahmadnia, M.R. and Ahmadnia, L.: Vitamin D absorption, plasma concentration and urinary excretion of 25- hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196: 210-213, 1991.

11. Pedraza-Chaverri, J., Cruz, C., Ibarra-Rubio, M.E., Hernández, C., Tapia, E. and Peña, J.C.: Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron*, 57: 106-108, 1991.
12. Katz, J., Bonorris, G. and Sellers, A.L.: Albumin metabolism in aminonucleoside nephrotic rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 62: 910-934, 1963.
13. Jensen, H.: Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. *Acta Med. Scand.*, 182: 465-473, 1967.
14. Ellis, D.: Anemia in the course of nephrotic syndrome secondary to transferrin depletion. *J. Pediatr.*, 90: 953-955, 1977.
15. Glasscock, R.J., Adler, S.G., Ward, H.J. and Cohen, A.H.: Primary glomerular diseases. In: *The Kidney*. Brenner, B.M. and Rector, F.C. Jr. (Eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1991, p.p. 1212-1252.
16. Mainero, A., Cruz, C. and Pedraza-Chaverri, J.: Serum and urinary ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome. *Clin. Invest. Med.: en prensa*, 1992.
17. Llach, F.: Hipercoagulability, renal vein thrombosis, and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. *Kidney Int.*, 28: 429-439, 1985.
18. Beaman, M., Oldfield, S., MacLennan, I.C.M., Michael, J. and Adu, D.: Hypogammaglobulinaemia in nephrotic rats is attributable to hypercatabolism of IgG. *Clin. Exp. Immunol.*, 74: 425-430, 1988.
19. Giangiacomo, J., Cleary, T.G., Cole, B.R., Hoffsten, P. and Robson, A.M.: Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 293: 8-12, 1975.
20. Housley, J., Jones, L. and Harvey, A.: Serum alpha-macroglobulins in rat aminonucleoside nephrosis. *Clin. Chim. Acta*, 21: 85-90, 1968.
21. Tortora, G.J. y Anagnostakos, N.P.: Sistema urinario. En: *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Harla, México, D.F., 1984, p.p. 820-847.
22. Renneke, H.G. and Venkatchalam, M.A.: Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. *J. Clin. Invest.*, 63: 713-717, 1979.
23. Mohos, S.C. and Skoza, L.: Histochemical demonstration and localization of sialoproteins in the glomerulus. *Exp. Mol. Pathol.*, 12: 316-323, 1970.

24. Kanwar, Y.S., Farquhar, M.G.: Anionic sites in the glomerular basement membrane. *In vivo* and *in vitro* localization to the lamina rara by cationic probes. *J. Cell. Biol.*, 81: 137-153, 1979.
25. Skoza, L. and Mohos, S.C.: Glomerular sialoproteins. *Science*, 164: 1519-1521, 1969.
26. Bowman, W.C. y Rand, M.J.: El aparato urinario, drogas que afectan las funciones del riñón y vías urinarias. En: *Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas*. Editorial Interamericana, México, D.F. 1984, p.p. 27.1-27.33.
27. Heymann, W. and Lund, H.Z.: The nephrotic syndrome in rats. *Pediatr.*, 7: 691-698, 1951.
28. Skorecki, K.L., Nadler, S.P., Bard, K.F. and Brenner, B.M.: Renal and sistemic manifestations of glomerular disease. In: *The Kidney*. Brenner, B.M. and Rector, F.C. (Eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1986, p.p. 891-928.
29. Schnaper, H.W. and Robson, A.M.: Nephrotic syndrome, minimal change disease, focal glomerulosclerosis and related disorders. In: *Diseases of the kidney, vol.II*. Schrier, R.W. and Gottschalk, C.W. (Eds.), Boston, Toronto, Little Brown, 1988, p.p. 1949-2004.
30. McVicar, M. and Chandra, M.: Pathogenic mechanisms in the nephrotic syndrome of childhood. *Adv. Pediatr.*, 32: 269-286, 1985.
31. Charest, P.M. and Roth, J.: Localization of sialic acid in kidney glomeruli; regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 82: 8508-8512, 1985.
32. Kerjaszki, D., Vernillo, A.T. and Farquhar, M.G.: Reduced sialylation of podocalyxin -the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus- in aminonucleoside nephrosis. *Am. J. Pathol.*, 118: 343-349, 1985.
33. Lelongt, B., Makino, H. and Kanwar, Y.S.: Status of glomerular proteoglycans in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*, 31: 1299-1310, 1987.
34. Reineck, H.J.: Mechanisms of edema formation in the nephrotic syndrome. In: *The Nephrotic Syndrome, Contemporary Issues in Nephrology*, vol. 9. Brenner, B.M. and Stein, J.H. (Eds.). Churchill Livingstone, New York, 1984, p.p. 31-46.
35. Dorhout-Mees, E.J., Roos, J.C., Boer, P., Dei, H.I. and Simatupang, T.A.: Observations on edema formation in the nephrotic syndrome in adults with minimal lesions. *Am. J. Med.*, 67: 378-384, 1979.

36. Brown, E.A., Markandu, N.D., Sagnella, G.A., Squires, M., Jones, B.E. and MacGregor, G.A.: Evidence that some mechanism other than renin system causes sodium retention in nephrotic syndrome. *Lancet*, 2: 1237-1240, 1982.
37. Ichikawa, I., Rennke, H.G., Hoyer, J.R., Bard, K.F., Schor, N., Troy, J.L., LeChene, C.P. and Brenner, B.M.: Role of intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 71: 91-103, 1983.
38. Marsh, B.J. and Drabkin, D.L. Metabolic channeling in experimental nephrosis. *Lipid metabolism. J. Biol. Chem.*, 212: 633-639, 1955.
39. Caulfield, J.P. and Farquahr, M.G.: Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.*, 39: 505-512, 1978.
40. Bertani, T., Poggi, A., Pozzoni, R., Delaini, F., Sacchi, G., Thoua, Y., Mecca, G., Remuzzi, G. and Donati, M.B.: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Lab. Invest.*, 46: 16-23, 1982.
41. Morisaki, N., Mastuoka, N., Saito, Y. and Kumagal, A.: Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism*, 33: 405-410, 1984.
42. Grond, J., Weening, J.J. and Elöma, J.D.: Glomerular sclerosis in nephrotic rats. *Lab. Invest.*, 51: 277-285, 1984.
43. Hoedemaker, J.: Experimental glomerulonephritis. In: *Nephrology Baillière Tindall London Proceedings of the Xth International Congress of Nephrology. Alex, M. and Davidson (Eds.), 1988, p.p. 424-426.*
44. Hoyer, J.R., Ratte, J., Potter, A.H. and Michael, A.F.: Transfer of aminonucleoside nephrosis by renal transplantation. *J. Clin. Invest.*, 51: 277-2780, 1972.
45. Wilson, S.G.F., Hackel, D.B., Horwood, S., Nash, G. and Heymann, W.: Aminonucleoside nephrosis in rats. *Pediatr.*, 21: 963-973, 1958.
46. Baker, B.R., Joseph, J.P. and Williams, J.H.: Puromycin synthetic studies. VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, 76: 2838, 1954.
47. Porter, J.N., Hewitt, R.I., Hesseltine, C.W., Krupka, G., Lowery, J.A., Wallace, W.S., Bohonos, N. and Williams, J.H.: Achromycin, a new antibiotic, having trypanocidal properties. *Antibiot. Chemother.*, 2: 409-410, 1952.

48. Wilson, S.G.F., Heymann, W. and Goldthwait, D.A.: Studies on the mechanism of production of a nephrotic syndrome in rats by a nucleoside. *Pediatr.*, 25: 228-241, 1960.
49. Hutchings, B.L.: Puromycin. In: *Chemistry and Biology of Purines*. Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, C.M. (Eds.), Little, Brown, Boston, Massachusetts, 1957, p.p. 177-191.
50. Borowsky, B.A., Kessner, D.M. and Recant, L.: Structural analogues of puromycin in production of experimental nephrosis in rats. *P.S.E.B.M.*, 97: 857-860, 1958.
51. Ryan, G.B. and Karnovsky, M.J.: An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*, 8: 219-232, 1975.
52. Derr, R.F., Alexander, C.S. and Nagasawa, H.T.: Metabolism of puromycin aminonucleoside in the normal, "pre-nephrotic", and nephrotic rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125: 248-252, 1967.
53. Nagasawa, H.T., Swingle, K.F. and Alexander, C.S.: Metabolism of aminonucleoside- $8-^{14}C$ in the rat and guinea pig. *Biochem. Pharmacol.* 16: 2211-2219, 1967.
54. Alexander, C.S., Nagasawa, H.T. and Filbin, D.: Distribution and excretion of aminonucleoside- $8-^{14}C$ in normal and nephrotic rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111: 521-526, 1962.
55. Shibouta, Y., Terashita, Z.I., Imura, Y., Shino, A., Kawamura, M., Ohtsuki, K., Ohkawa, S., Nishikawa, K. and Fujiwara, Y.: Involvement of thromboxane A_2 , leukotrienes and free radicals in puromycin nephrosis in rats. *Kidney Int.*, 39: 920-929, 1991.
56. Fishman, J.A. and Karnovsky, M.J.: Effects of aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am. J. Pathol.*, 118: 398-407, 1985.
57. Sibley, J.A. and Lehninger, A.L.: Determination of aldolase in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 177: 859-872, 1949.
58. Rappaport, F., Fischl, J. and Pinto, N.: An improved method for the estimation of cholinesterase activity in serum. *Clin. Chim. Acta*, 4: 227-230, 1959.
59. Martinek, R.G., Berger, L. and Broida, D.: Simplified estimation of leucine aminopeptidase (LAP) activity. *Clin. Chem.*, 10: 1087-1092, 1964.
60. King, J.: Isocitrate dehydrogenase. Colorimetric assay. In: *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2. Bergmeyer, H.U. (Ed.), New York, Academic Press, 1974, p.p. 627-629.
61. Karmen, S.A.: A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, 34: 131-135, 1955.

62. Wróbleski, F. and LaDue, J.S.: Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91: 569-571, 1956.
63. Howel, B.F., McClure, S. and Schaffer, R.: Lactate-to-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: re-examination. Clin. Chem., 25: 269-272, 1979.
64. Elliot, B.A. and Wilkinson, J.H.: Alfa-hydroxybutiric dehydrogenase in myocardial infraction and in liver disease. Lancet, 1: 698-699, 1961.
65. Rosalki, S.B.: An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. J. Lab. Clin. Med., 69: 696-705, 1967.
66. Bessey, O., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: Method for the determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem., 164: 321-329, 1946.
67. Naftalin, L., Sexton, M., Whitaker, J.F. and Tracey, D.: A routine procedure for estimating serum gamma-glutamyl transpeptidase activity. Clin. Chim. Acta, 26: 293-296, 1969.
68. Doumas, B.T. and Biggs, H.G.: Determination of serum albumin. In: Standard Methods of Clinical Chemistry, Vol. 7. Cooper, G.R. (Ed.), New York, Academic Press, 1972, p.p. 175-188.
69. Lowry, O.A., Rosenbrought, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-272, 1951.
70. Nathans, D. and Neidle, A.: Structural requirements for puromycin inhibition of protein synthesis. Nature, 197: 1076-1077, 1963.
71. Steines, W.J. and Mehl, J.W.: The elevation of alfa 2-macroglobulin and trypsin-binding activity in nephrosis. J. Lab. Clin. Med., 67: 559-565, 1966.
72. Pedraza-Chaverri and Huberman, A.: Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin-mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats. Nephron, 59: 648-650, 1991.
73. Zimmerman, H.J. and Henry, J.B.: Clinical enzymology. In: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, vol. I. Henry, J.B. (Ed.); Todd, Sanford. Davidsohn. Saunders, Philadelphia, 1979, p.p. 347-384.
74. Vorhaus, L.J. and Kark, R.M.: Serum cholinesterase in health and disease. Am. J. Med., 14: 707-719, 1953.

75. Van Der Vijgh, W.J.F. and Van Der Poort, J.S.E.M.: Morphometric study of myocardial changes during puromycin aminonucleoside induced nephropathy in rats. *Anticancer Res.*, 7: 11-1116, 1987.
76. Lewin, P.K. and Moscarello, M.A.: Liver ultrastructural and biochemical changes in the prenephrotic stage of aminonucleoside nephrosis. *Exp. Mol. Pathol.*, 8: 21-33, 1968.
77. Katona, E. and Moscarello, M.A.: Early effects of aminonucleoside on enzymes in the Golgi apparatus of rat liver. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 33: 549-554, 1975.
78. Fasman, G.D.: CRC Practical handbook of biochemistry & molecular biology. Boca Raton, CRC Press, 1990.
79. Venkatachalam, M.A., Cotran, R.S. and Karnovsky, M.J.: An ultrastructural study on glomerular permeability in aminonucleoside nephrosis using catalase as tracer protein. *J. Exp. Med.*, 142: 1168-1180, 1970.
80. Price, R.G. and Ellis, B.G.: Urinary enzyme excretion in aminonucleoside nephrosis in rats. *Chem. Biol. Interactions*, 13: 353-358, 1976.
81. Scott, T. and Egelson, M.: Concise encyclopedia of biochemistry. Berlin, Walter de Gruyter, 1988.
82. Tsuji, A., Matsuda, Y. and Katunuma, N.: Characterization of human serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chim. Acta*, 104: 361-366, 1980.