

03966

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PARTICIPACION DE LOS RADICALES
LIBRES DE OXIGENO Y EFECTO
PROTECTOR DE LA VITAMINA E
Y SELENIO EN EL
SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

ANA ELENA AREVALO VAZQUEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1993



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.

RESUMEN

Se ha propuesto que los radicales libres de oxígeno son mediadores de daño en diversos modelos experimentales de enfermedades renales como el síndrome nefrótico (SN) inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP). En este trabajo se estudió el papel de los radicales libres de oxígeno mediante dos nuevos enfoques experimentales que permitieron evaluar su participación: 1) la determinación secuencial de los niveles de vitamina E (VE), actividad de glutatión peroxidasa (GPx) y lipoperoxidación (LPx) en riñón, hígado, corazón, pulmón, cerebro y testículo de ratas con SN inducido con ANP los días 1 a 6, 8, 10, 16 y 22 y 2) el efecto de diferentes dietas (altas y bajas) en VE y selenio (Se), sobre estos mismos parámetros y la función renal, los días 0 (control), 7 y 22 (nefrótico).

Los resultados del estudio secuencial mostraron que las ratas nefróticas disminuyeron su peso corporal y las proteínas séricas, y aumentaron el volumen urinario, la urea, la creatinina y la VE séricas, la excreción urinaria de proteínas, la LPx en todos los tejidos estudiados y la actividad de la GPx. La LPx aumentó en todos los tejidos desde el día 1 y/o 2, lo cual indica que el ANP tiene un efecto inmediato no solo sobre el riñón, sino sobre diferentes tejidos. En la segunda parte del trabajo, en donde se manipularon diferentes dietas con VE y Se, se observó que en las ratas control (día 0), las tres dietas no tuvieron efecto sobre la mayoría de las variables estudiadas (peso corporal, consumo de alimento, urea, creatinina y proteínas totales en suero, y proteínas totales en orina). Las dietas no indujeron ninguna

alteración histopatológica en los glomérulos renales, cuando se analizaron por microscopía de luz o electrónica en este mismo grupo, a pesar de que hubo diferencias significativas cuando se analizaron la actividad de la GPx y la LPx tisular: la LPx fué mayor y la actividad de la GPx fué menor en los tejidos de ratas con dieta baja, mientras que en las ratas con dieta alta se observó el efecto opuesto. Después de la inducción del SN con ANP, las ratas con dieta baja tuvieron alteraciones más profundas en la función y ultraestructura renal que las ratas con dieta normal, mientras que en las ratas con dieta alta estas alteraciones no se presentaron o fueron menos intensas. Las ratas alimentadas con dieta deficiente y normal excretaron mayor cantidad de proteínas por orina que las ratas alimentadas con una dieta en exceso, a pesar de que no hubo diferencias en el tipo de proteínas en los tres grupos el día 7. Después de la inyección del ANP las ratas alimentadas con dieta deficiente tuvieron un mayor aumento en la LPx renal que las ratas con dieta normal, por el contrario, las ratas alimentadas con dieta alta no presentaron aumento en la LPx renal. Todos estos resultados son compatibles con la hipótesis de que en SN inducido con ANP existe un gran estrés oxidativo ocasionado por radicales libres de oxígeno, sin embargo otros factores no estudiados en este trabajo pueden estar involucrados en la fisiopatología del SN inducido con ANP.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	i
I. INTRODUCCION	
1. Síndrome Nefrótico.....	1
2. Radicales libres.....	8
3. Mecanismos protectores contra radicales libres.....	13
4. Mecanismos de acción del selenio, la enzima glutatión peroxidasa y de la vitamina E en la protección contra radicales libres.....	14
II. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	18
III. HIPOTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS.....	20
V. MATERIALES Y METODOS	
1. Reactivos.....	21
2. Diseño experimental.....	21
3. Determinación de la lipoperoxidación por la cuantificación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.....	23
4. Determinación de la actividad de la enzima GPX.....	24
5. Determinación de vitamina E en plasma.....	24
6. Determinación de proteínas.....	25
7. Determinación de urea y creatinina.....	27

8. Electroforesis en geles de acrilamida	
8a. Principio.....	27
8b. Soluciones y procedimiento.....	28
9. Estudios histológicos.....	32
10. Análisis estadísticos.....	33
10a. Estudio Secuencial.....	33
10b. Estudio con diferentes dietas.....	34
VI. RESULTADOS	
I. Estudio secuencial.....	36
II. Efecto de las dietas normal, alta y baja de Se Y vitamina E.....	50
VII. DISCUSION.....	77
VIII. CONCLUSIONES.....	85
IX. REFERENCIAS.....	86

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ANDEVA	Análisis de varianza
ANP	Aminonucleósido de puromicina
ARNm	Acido ribonucléico mensajero
ASB	Albúmina sérica bovina
ATA	Acido tricloroacético
ATB	Acido tiobarbitúrico
CAT	Catalasa
DA-Ado	N ⁶ -dimetil-3' amino-3'desoxiadenosina.
DSS	Dodecil sulfato de sodio
EDTA	Acido etilendiamino-tetra-acético
Fig.	Figura
g	Gravedad
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación transferasa
4 HN	4-Hidroxinonenal
HSPG	Heparán sulfato proteoglicanos
kDa	Kilodaltones
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPx	Lipoperoxidación
MA-Ado	N ⁶ -metil-3' amino-3'desoxiadenosina
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
RSE	Resonancia de spin electrónico

Se

Selenio

SN

Síndrome nefrótico

SOD

Superóxido dismutasa

VE

Vitamina E

I. INTRODUCCION

1. SINDROME NEFROTICO

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad que se caracteriza por el aumento en la filtración de proteínas plasmáticas por el riñón (proteinuria), hipoproteinemia, disminución de la presión coloidosmótica, edema, ascitis, lípiduria, retención de sodio, hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia y alteración en la concentración de casi todas las proteínas plasmáticas (1-6).

Se piensa que todas las alteraciones sistémicas en el SN son consecuencia de la pérdida de proteínas por la orina. El aumento en la filtración de proteínas plasmáticas es secundaria a la alteración de la barrera de filtración glomerular que está compuesta de células endoteliales, membrana basal glomerular y células epiteliales, las cuales forman una barrera de carga y de tamaño. La barrera de carga está constituida por sialoproteínas y heparán sulfato proteoglicanos (HSPG) que le confieren una carga neta negativa. El sitio preciso de la barrera de tamaño no se conoce, pero es probable que sea la membrana basal glomerular (7). Las moléculas de un diámetro molecular menor a 2 nm pasan libremente mientras que aquellas mayores a 6 nm no pasan (1,2).

La hipoalbuminemia en el SN es secundaria a un aumento en el catabolismo y a la pérdida de albúmina por orina, y esto provoca:

a) Hiperlipidemia: Debido a una disminución en la presión oncótica, lo que a su vez, estimula la producción de lipoproteínas a nivel hepático. Este aumento, junto con la disminución en el catabolismo de las lipoproteínas, produce hiperlipoproteinemia.

b) Edema: La disminución en la presión oncótica, favorece el movimiento de fluidos del compartimiento vascular al intersticial causando edema y ascitis.

Por otra parte, otras consecuencias de las alteraciones en el metabolismo de las proteínas plasmáticas son:

a) Disminución en la inmunidad humoral: Esto es secundario a la disminución en el nivel de inmunoglobulinas producida por la pérdida de estas en la orina y a una disminución en su síntesis, y a que el factor B del complemento disminuye. Al alterarse la inmunidad humoral, se modifica la inmunidad celular debido a la interacción de ambos procesos, lo cual lleva a un aumento en la susceptibilidad a infecciones oportunistas que son causa de muerte en SN.

b) Deficiencias de elementos traza (Cu, Fe, Zn) que se pierden por orina.

c) Alteraciones en el metabolismo hormonal, pues se pierden por orina proteínas acarreadoras.

d) Deficiencia de calcio y vitamina D.

e) Un estado hipercoagulable, secundario a alteraciones en casi todos los factores de coagulación.

Esta enfermedad puede ser inducida experimentalmente para su estudio por la inyección de:

- 1) suero antirriñón (7,8)
- 2) aminonucleósido de puromicina (ANP) (9,10)
- 3) daunomicina (11)
- 4) adriamicina (12,13)

Debido a que el SN inducido en ratas con ANP se parece mucho al síndrome de lesiones mínimas encontrado en humanos, se ha

utilizado como un modelo para estudiarlo (2-6,9,10). Se han descrito dos variantes de la nefrosis inducida por ANP, el modelo agudo y el modelo crónico (7). El modelo agudo se induce por una o por varias inyecciones subcutáneas o intraperitoneales que van de 50 a 150 mg/kg de peso corporal total, estas inyecciones desencadenan una proteinuria masiva y SN al término de 7 a 14 días después de su aplicación; alrededor de las tres semanas la proteinuria disminuye y desaparece a las seis semanas; este modelo es reversible.

El modelo crónico se induce por una o por varias inyecciones intravenosas a bajas dosis (5 mg/ 100 g) y se encuentra asociado a proteinuria crónica y daño irreversible.

El ANP se produce por la hidrólisis del residuo p-metoxitiroxil que se encuentra unido al grupo amino del antibiótico puromicina (Fig. A); el ANP está relacionado estructuralmente a la adenosina. Hoyer y cols. (14,15) demostraron que es necesaria solo una exposición de tres minutos al ANP para producir daño renal. La toxicidad del ANP es especie-especifica, las ratas, humanos y monos son susceptibles a la acción nefrotóxica del ANP, pero no los perros, conejos, cobayos y ratones (7).

Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual el ANP causa daño renal, sin embargo, se piensa que los radicales libres del oxígeno y sus especies reactivas tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iones superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^{\cdot}), producidos durante el metabolismo del ANP son los responsables del daño celular (16-22). Se ha observado que el alopurinol (un inhibidor de la xantina oxidasa (XO) y por lo tanto de la generación de

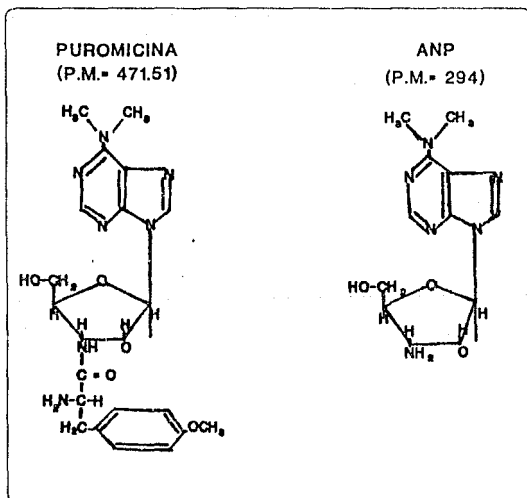


Fig. A ESTRUCTURA DE LA PUROMICINA Y DEL ANP.

radicales superóxido) y que la superóxido dismutasa (SOD) (que metaboliza al ión superóxido a peróxido de hidrógeno), disminuyen el daño renal en ratas tratadas con ANP (16,18).

Además Thakur y cols. (17) observaron un efecto protector de dos atrapadores de iones hidroxilo (dimetiltiourea y benzoato de sodio) y de un quelante de hierro (desferroxamina) en este modelo experimental.

Fishman y Karnovsky (23), describieron los efectos del ANP en células renales *in vitro*, y encontraron efectos directos sobre la membrana celular, presumiblemente, una desorganización proteico-lipídica asociada a desarreglos metabólicos, tales como el aumento de HSPG y una disminución de la glucosamina y sulfato en la superficie celular. Esto lleva a la hipótesis de que el ANP produce un desarreglo en la barrera de carga y de tamaño.

De todos estos datos, se sugiere que el ANP se convierte primero a hipoxantina en el riñón y que la conversión sucesiva a ácido úrico vía el sistema enzimático de la XO es la responsable en la generación de radicales libres del oxígeno (16) (Fig. B). Sin embargo, existe un número de aspectos sin resolver. Primero que todo, la vía metabólica de la transformación del ANP a hipoxantina en el glomérulo renal y su potencial nefrotóxico debe ser esclarecido, pues se ha observado que un aumento en esta vía metabólica no induce proteinuria (24). En segundo lugar, debido a la ignorancia acerca del metabolismo del ANP en el riñón no se puede llegar a una conclusión certera acerca del mecanismo de nefrotoxicidad de la droga (25).

Se han purificado y caracterizado dos metabolitos del ANP en

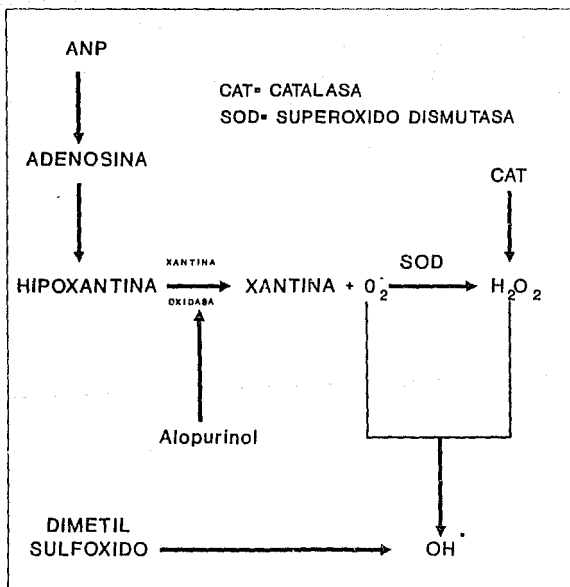


Fig. B ESQUEMA PROPUESTO DE LA DEGRADACION METABOLICA DEL ANP EN DONDE SE MUESTRA LA FORMACION DE RADICALES LIBRES DE OXIGENO VIA XANTINA OXIDASA.

la orina de rata: el N⁶-dimetil-3' amino-3'desoxiadenosina (DA-Ado) y su forma monometilada llamada N⁶-metil-3' amino-3'desoxiadenosina (MA-Ado) (25).

Ambos metabolitos son excretados 6 horas después de la inyección del ANP. Se comprobó, al menos in vitro, que el metabolismo del ANP y de sus productos, DA-Ado y MA-Ado, están involucrados en la vía de las purinas. La baja transformación del DA-Ado por glomérulos aislados y la ausencia de su metabolismo en cultivos de las células epiteliales glomerulares implica la presencia de enzimas desmetilasas en el glomérulo. El efecto citotóxico similar del ANP y de sus metabolitos sobre estas células, apoya el concepto de que un mecanismo diferente, en el cual no está involucrada la transformación de estos compuestos en el ciclo de las purinas hacia hipoxantina, que es responsable de la toxicidad glomerular in vitro (25).

Los siguientes puntos no apoyan la idea de que la producción de radicales libres se deba a la vía de degradación del ANP por el sistema de la XO:

- 1) Se ha observado in vivo que la inhibición de la N-desmetilasa microsomal (citocromo P-450) por alfa-naftilisotiocinato o SKF-525A no disminuye la proteinuria en las ratas tratadas con ANP (26).
- 2) El mecanismo de acción del ANP in vivo es muy rápido (14), mientras que in vitro la conversión de ANP a hipoxantina en el glomérulo requiere de varias horas.
- 3) La vía de la hipoxantina no es directamente citotóxica sobre cultivos de podocitos in vitro, sino hasta que se aplican grandes

dosis (25).

2. RADICALES LIBRES

Un radical libre es cualquier átomo o grupo átomos que poseen uno o más electrones desapareados. Los radicales libres pueden ser especies iónicas o eléctricamente neutras. La característica más común de casi todos ellos es una elevada reactividad química, relacionada con la tendencia de los electrones a encontrarse en forma de pares. Estas especies se producen normalmente en las células por diversas vías, por ejemplo durante el transporte electrónico en la mitocondria, en la oxidación de catecolaminas, en neutrófilos activados, etc. (Fig. C). Otros factores pueden contribuir a su generación, como la radiaciones de alta energía, sustancias químicas tóxicas o contaminantes atmosféricos (27). Los radicales libres no solo se han asociado al daño producido en el SN y enfermedades glomerulares experimentales (19-22), sino que están relacionados con otras enfermedades tales como efisema pulmonar, ataques cardíacos, apoplejías (28-31), en la iniciación y promoción del cáncer (32,33), y arterioesclerosis (27) (Tabla I).

El daño oxidativo a la membrana celular por acción de estos radicales, se debe a que los fosfolípidos membranales insaturados son más susceptibles a la oxidación, pues poseen ligaduras dobles de carbono (34-36). Los resultados de la peroxidación lipídica son alteraciones en las propiedades de la membrana, tales como fluidez, transporte iónico y actividades enzimáticas (36,37).

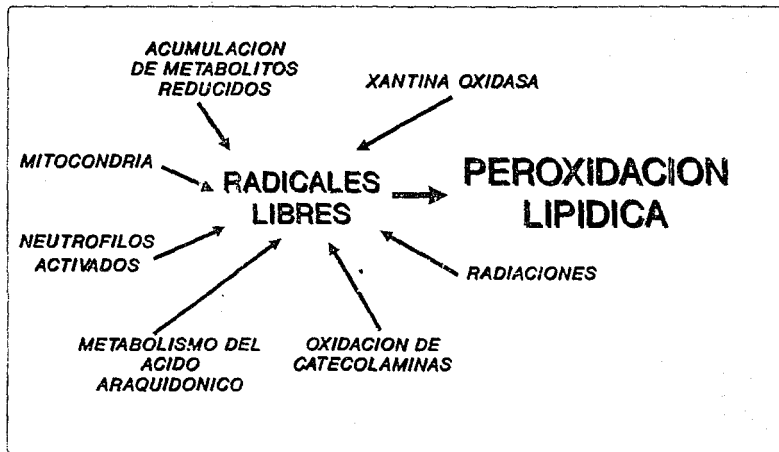


Fig. C FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA GENERACION DE RADICALES LIBRES.

TABLA I

LISTA DE PRODUCTOS LIBERADOS POR LA PEROXIDACION DE LIPIDOS,
 PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS Y SU POSIBLE CONTRIBUCION AL
 DESARROLLO DE CONDICIONES PATOLOGICAS

PROCESO OXIDATIVO	PRODUCTO	POSIBLE INFLUENCIA SOBRE LA CONDICION PATOLOGICA
PEROXIDACION DE LIPIDOS	Aldehidos Malondialdehido 4-Hidroxinonenal	Cambios estructurales en la membrana Reaccionan con proteinas y acidos nucleicos, puede ser mutagenico. Reaccionan con LDL, puede contribuir al desarrollo de la arteriosclerosis.
OXIDACION DE PROTEINAS	INACTIVACION POR OXIDACION DE ENZIMAS (glutamina sintetasa) Oxidacion de LDL Oxidacion del inhibidor de la proteasa alfa 1	Puede contribuir a la acumulacion de glutamato durante la apoplejia Puede contribuir a la arteriosclerosis Pueden quedar proteasas activas causando edema pulmonar.
OXIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS	Ruptura de hebras de ADN Alteracion de bases 8-Hidroxi guanina 5-Hidroxi metilo uracilo	Puede causar errores en la reparacion Pueden contribuir a la carcinogenesis

Los radicales libres pueden producir daño a las proteínas generando otros productos (31,33,35-37), algunos de los cuales son:

- 1) Productos de reacción cruzada con otros componentes celulares.
- 2) Productos fragmentados.
- 3) Lesiones en los sitios específicos de la estructura proteica que afectan la funcionalidad.

Además, los radicales libres pueden interaccionar con los ácidos nucleicos produciendo cortes y modificaciones a las bases (32,33).

Existen diversos métodos para detectar a los radicales libres oxigénicos, o bien estudiar el daño oxidativo a un tejido. La mayoría de estos métodos están basados en:

a) Análisis de los productos generados por la reacción de radicales libres con biomoléculas, tales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas. Por ejemplo, malondialdehído (MDA) generado durante la peroxidación lipídica, el cual puede ser detectado espectrofotométricamente por reacción con ácido tiobarbitúrico (ATB) (Fig. D) (38-40).

Otro ejemplo es el 4-hidroxinonenal (4 HN), el cual es el producto de la descomposición de ácidos grasos poliinsaturados y posee propiedades citotóxicas, hepatotóxicas y mutagénicas. El 4 HN genera a su vez otros aldehídos (alcanales, 2-alquenales, y aldehídos unidos a fosfolípidos y proteínas) altamente tóxicos. Los métodos frecuentemente usados para detectar aldehídos utilizan dinitrofenilhidrazina, de esta manera, los aldehídos libres forman compuestos estables con los derivados de la

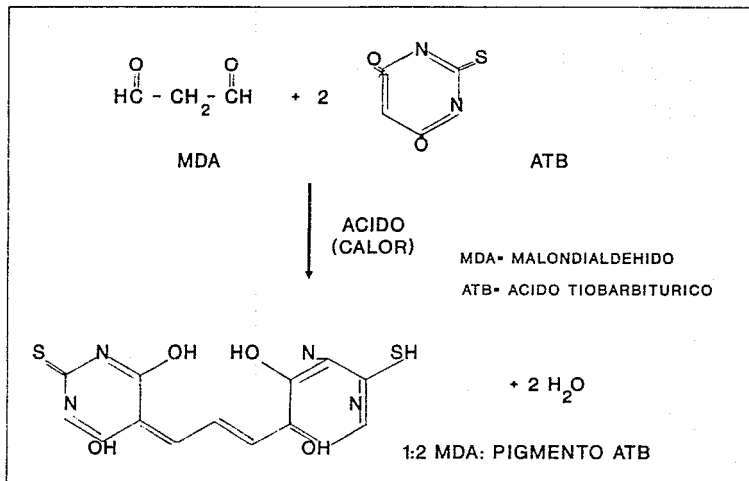


Fig. D Química estructural del MDA y reacción con ATB.

hidrazona y toman un color amarillo, que puede ser fácilmente leído en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 360-380 nm (41).

b) Por resonancia paramagnética electrónica, también denominada resonancia del "spin" electrónico (RSE). El fundamento de este método es que el "spin" de un electrón desapareado tiene asociado un momento magnético. El momento magnético puede tomar una o dos orientaciones en el campo magnético, tal como viene especificado por los números cuánticos magnéticos $\pm \frac{1}{2}$. Esto es conceptualmente similar a las dos orientaciones de spin de un núcleo de hidrógeno. Dado que la constante giromagnética del electrón es unas mil veces mayor que la del protón; los espectrómetros del RSE operan a frecuencias más elevadas que los instrumentos de resonancia magnética nuclear (42).

3. MECANISMOS PROTECTORES CONTRA RADICALES LIBRES

Existen diversos mecanismos que protegen a la célula de los radicales libres, estos mecanismos pueden ser enzimáticos y no enzimáticos (32). Los mecanismos enzimáticos involucran a las enzimas antioxidantes primarias y secundarias. Las enzimas antioxidantes primarias eliminan directamente los metabolitos activos del oxígeno y son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); las enzimas antioxidantes secundarias ayudan a desintoxicar los metabolitos activos del oxígeno, disminuyendo los niveles de peróxidos y/o manteniendo un flujo de intermediarios metabólicos tales como glutatión y NADPH para las enzimas antioxidantes primarias. Pertenecen a este grupo las enzimas glutatión reductasa (GR),

glutación transferasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6FD) (33) (Fig. E).

Otros autores han demostrado en estudios in vitro (43-46) e in vivo (47-49) que cierto tipo de células expuestas a sustancias oxidantes o antioxidantes pueden aumentar la expresión de una, o más, de las enzimas antioxidantes primarias.

Los mecanismos no enzimáticos incluyen los compuestos sulfhidrilo, bilirrubina, urato, butil-hidroxitolueno, dimetil-tiourea, vitamina A (37,43), vitamina B-12 (37), vitamina C (37,47,48), vitamina E (VE) (37,45-56), selenio (Se) (46,56-65), y zinc (37).

4. MECANISMOS DE ACCION DEL SELENIO, LA ENZIMA GLUTATION PEROXIDASA Y DE LA VITAMINA E EN LA PROTECCION A RADICALES LIBRES

La importancia nutricional del Se se reconoció en 1957, cuando Schwarz reportó que este mineral era el componente activo del factor 3 que evitaba la necrosis hepática en ratas alimentadas con una dieta baja en VE (62). Más tarde, numerosas investigaciones confirmaron que el Se prevenía algunos de los síntomas de la deficiencia de VE en una amplia variedad de animales experimentales (63).

En 1973 John Rotruck y cols. (64) descubrieron que la enzima GPx (E.C. 1.11.1.9) contenía Se. Este descubrimiento demostraba el papel bioquímico de este elemento traza. La distribución tisular del Se y las selenoproteínas depende del consumo de Se (65).

La VE es un compuesto liposoluble que se localiza en la bicapa lipídica de las membranas intracelulares y plasmáticas, en donde

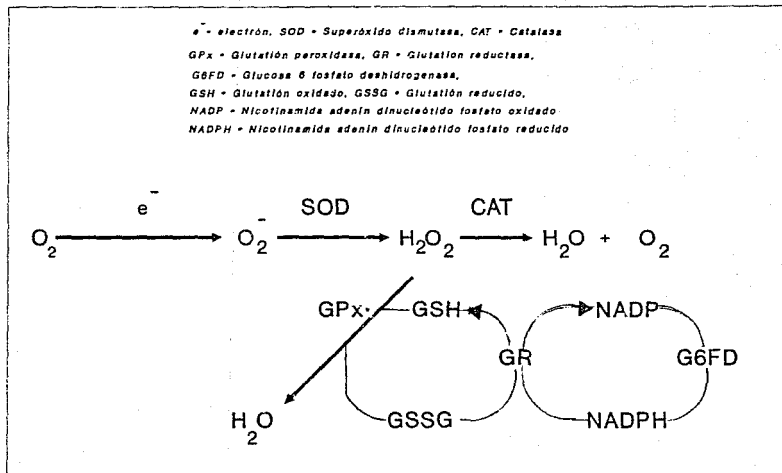


Fig. E MECANISMO ENZIMATICO DE ATRAPADORES DE RADICALES LIBRES DE OXIGENO.

bloquea la transferencia de electrones involucrados en la iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos (66,67) (Fig. F).

La peroxidación de lípidos puede ser disparada por peróxidos de hidrógeno y orgánicos, metabolitos celulares que son detoxificados por la enzima GPx (59). La actividad de la GPx depende fundamentalmente de Se (59-61). Además, el Se modifica la regulación de la GPx: ratas alimentadas con una dieta deficiente en Se tienen bajos niveles de ARNm de GPx (68). La deficiencia de Se limita la degradación de peróxidos de hidrógeno y otros peróxidos lipídicos por GPx y además promueve su acumulación (69). Además, la deficiencia de Se promueve la deficiencia de VE por aumento en la degradación de la VE de reserva (55,69). Por lo tanto, una dieta deficiente en VE y Se produce un estado prooxidante en el organismo: la deficiencia de Se promueve la acumulación de metabolitos reactivos de oxígeno y la deficiencia de VE magnifica los efectos celulares tóxicos de estas especies moleculares (56-58).

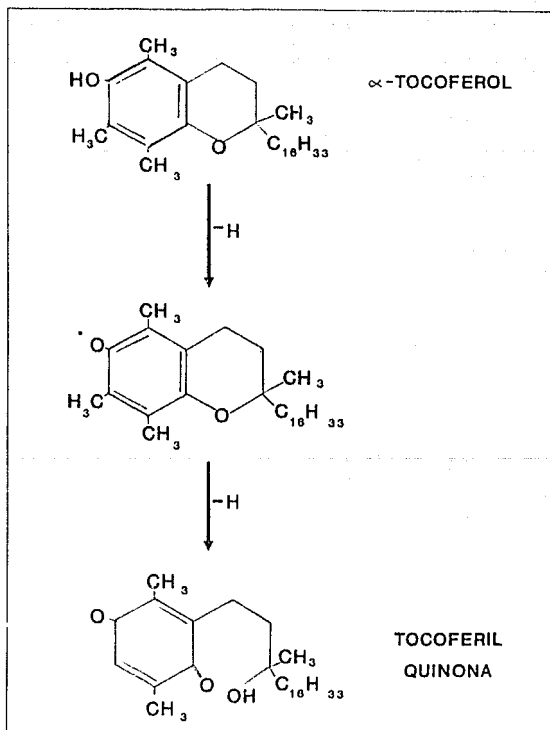


Fig. F VITAMINA E COMO ANTIOXIDANTE: FORMACION DE QUINONAS.

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

En ratas con síndrome nefrótico inducido con ANP se ha observado que:

1.- La administración del inhibidor de la enzima xantina oxidasa, alopurinol y, por lo tanto, la producción de iones hidroxilo, disminuye la proteinuria (16,18).

2.- La administración de catalasa y superóxido dismutasa disminuye la proteinuria (18).

3.- La administración de atrapadores de iones hidroxilo (dimetiltiourea y benzoato de sodio) y de un quelante de hierro (desferroxamina) disminuye la proteinuria (17).

4.- El uso de antinefróticos tal como el TJ-8014 disminuye la nefrosis inducida por el ANP debido a que aumenta a los mecanismos enzimáticos atrapadores de radicales libres de oxígeno (70).

5.- Se ha demostrado que el ANP adicionado a células epiteliales glomerulares in vitro, causa la producción de H_2O_2 (20).

6.- Además, la deficiencia de vitamina E y de Se exacerba el daño renal inducido por isquemia y reperfusión, el cual es otro modelo experimental que produce daño por estrés oxidativo (71).

III. HIPOTESIS

Si los radicales libres están involucrados en la génesis del SN inducido con ANP, entonces:

- a) La lipoperoxidación y la actividad de la GPx se elevarán.
- b) Los cambios en la cantidad de antioxidantes (VE y Se) en la dieta modificarán la intensidad del SN inducido con ANP.

IV. OBJETIVOS

Evaluar la participación de los radicales libres de oxígeno en ratas con SN inducido con ANP mediante:

1. La determinación secuencial de los niveles de vitamina E en suero, peroxidación lipídica y actividad de GPx en riñón, hígado, corazón, pulmón, cerebro y testículo los días 1 a 6, 8, 10, 16 y 22 después de la inyección del ANP.
2. El efecto de la ingestión de diferentes cantidades de antioxidantes (VE y Se) en la dieta, sobre estos mismos parámetros los días 0 (control), 7 y 22 (SN).

V. MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

El ANP, el dodecil sulfato de sodio (DSS), el ácido tiobarbitúrico (ATB), el NADPH, la glutatión reductasa y el glutatión reducido se compraron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., EUA). La dieta deficiente en VE y Se (número de catálogo 906449), el acetato de dl-alfa tocoferol y el selenito de sodio se compraron de ICN Biomedicals Inc (Costa Mesa, CA, EUA). Los demás reactivos fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar (Rattus norvegicus) de 100 g de peso para el estudio secuencial y se dividieron en 2 grupos: 1) normal (n=60) y 2) nefrótico (n=60), se colocaron en jaulas metabólicas y tenían acceso a alimento y agua ad libitum (3-5); el grupo nefrótico recibió una sola inyección de ANP (15 mg/100 g de peso corporal) y el control, una inyección de solución salina al 2%. Estas ratas se colocaron en jaulas metabólicas y se sacrificaron los días 1 a 6, 8, 10, 16 y 22 y se les recolectó orina de 24 h y sangre, además de los siguientes tejidos: riñón, hígado, corazón, pulmón, cerebro y testículos. Se sacrificaron 6 ratas de cada grupo por día de estudio. Las determinaciones de LPx y GPx en los tejidos de las ratas de éste estudio se realizaron simultáneamente para las controles y las nefróticas.

Para el estudio con diferentes dietas de antioxidantes (VE y

Se) se utilizaron ratas recién destetadas a las tres semanas de nacimiento (40 g de peso corporal) que se dividieron en tres grupos de acuerdo a la cantidad de Se y VE en la dieta: a) baja, b) normal y c) alta. Las dietas con cantidades normales y altas de VE y Se se prepararon por la adición de VE y Se en la dieta baja. Las dietas contenían cantidades idénticas de proteínas (aportada por levadura de torula, 300 g/kg y dl-metionina, 3 g/kg), grasas (aportada por grasa de cerdo, 50 g/kg) e hidratos de carbono (aportados por sacarosa, 590 g/kg). Las dietas contenían también una cantidad idéntica de minerales descrita por Hubbel-Mendel-Wakeman, 50 g/kg y la mezcla de vitaminas ICN, 10 g/kg.

La dieta baja en VE se obtuvo por la eliminación del dl-alfa tocoferol de la grasa de cerdo. La dieta baja se suplementó con dl-alfa tocoferol (250 U/g) en una proporción de 0.2 g/kg (50 U/g) para obtener una dieta normal (72) y con 4 g/kg para obtener una dieta alta (73,74). La deficiencia de Se se logró usando levadura de torula como fuente de proteínas (75), ya que este ingrediente, a diferencia de otros como la caseína, contiene cantidades muy bajas de Se. La dieta deficiente se suplementó con una mezcla de selenito de sodio con sacarosa (0.0445% de Na_2SeO_3) en una proporción de 1.24 g/kg (72) o de 12.4 g/kg (75,76) para obtener las dietas normal y alta en Se. La adición de estas cantidades de Se da como resultado una concentración de 0.25 y 2.5 mg/kg. Por lo tanto, estas dietas sólo difirieron en el contenido de VE y Se.

Las ratas se mantuvieron en estas dietas durante cuatro semanas (hasta que alcanzaron los 100 g de peso corporal) y al

término de estas se sacrificaron 10 animales por grupo y a los animales restantes (n=15 por grupo) se les indujo SN por una inyección subcutánea única de ANP (15 mg/100 g de peso corporal) al 2% en solución salina. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 horas y se sacrificaron 7 y 22 días después de la inyección del ANP. En estos días se obtuvieron sangre y los mismos tejidos del estudio secuencial.

3. DETERMINACION DE LA LIPOPEROXIDACION POR LA CUANTIFICACION DE LAS SUSTANCIAS QUE REACCIONAN CON EL ATB

Se empleó el método de Ohkawa et al. (38) para medir las sustancias que reaccionan con el ATB. Esta cuantificación constituye un índice de la peroxidación de lípidos. Los tejidos se lavaron con solución salina al 0.9% y se homogenizaron en un politrón (Brinkman, Westbury, N.Y., EUA) durante 40 segundos en 9 ml de una solución de KCl al 1.15%. El homogenado se filtró a través de una capa de gasas. Posteriormente se incubaron 0.1 ml del sobrenadante a 95°C durante 60 minutos con una mezcla de reacción de la siguiente composición: 0.2 ml de DSS 8.1%, 1.5 ml de ácido acético al 20% pH 3.5, 1.5 ml de ATB 0.8% y 0.7 ml de agua destilada. Después de la incubación, los tubos se enfriaron y a cada uno se les agregó 1 ml de agua destilada y 5 ml de una mezcla de n-butanol:piridina (15:1, vol/vol). La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 15 minutos a 2000 x g. La absorbencia de la capa orgánica (superior) se determinó espectrofotométricamente a 532 nm. El nivel de la

lipoperoxidación se expresó en nmoles de MDA (coef. de absorción molar del complejo formado es de 14.9×10^7) por mg de proteína (77).

4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GPx

Se empleó el método descrito por Lawrence y Burk (78). Los órganos se extrajeron y se lavaron con cloruro de sodio 1.14 M y se homogenizaron con 5 ml de sacarosa 0.25 M. Los homogenados se centrifugaron a 105,000 x g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:10 y 0.1 ml de esta dilución se mezclaron con 0.8 ml de la siguiente solución: fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0), EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 unidad de glutatión reductasa/ml y glutatión reducido 1 mM. Se preparó un blanco con la mezcla de reacción con agua destilada en el lugar del sobrenadante. Después de 5 minutos de incubación de la muestra con el buffer a temperatura ambiente, se agregaron 0.1 ml de H₂O₂ 0.25 mM a cada muestra, e inmediatamente se leyó la absorbencia a 340 nm cada minuto durante 5 minutos y la actividad de la GPx se determinó promediando las lecturas obtenidas de cada muestra y dividiendo éste promedio con el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm (6.22), posteriormente se dividieron entre los mg de proteína. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los resultados finales están expresados en micromoles de NADPH/min/mg de proteína.

5. DETERMINACION DE VITAMINA E EN PLASMA

Se empleó el método de Emerie-Engel, modificado por Tsen (79) para la determinación de tocoferol en plasma. A 0.6 mL de plasma se les agregaron 0.6 mL de etanol absoluto para precipitar proteínas. Un total de 1.2 mL de n-heptano se agregaron al

extracto de tocoferol, la mezcla se agitó y después se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. A 0.5 mL de la capa superior se les agregaron 0.1 ml de batofenantrolina 6.0 mM y 0.2 mL de etanol absoluto. Se protegieron de la luz con papel aluminio y se les adicionaron 0.1 mL de cloruro férrico 1.0 mM y 20 segundos más tarde 0.1 mL de ácido ortofosfórico 0.04 M. La absorbencia se determinó a 534 nm. Se preparó una curva estándar con alfa-tocoferol (Fig. G). Todas las muestras se determinaron por duplicado. El etanol absoluto se usó como solvente en la preparación de la batofenantrolina, cloruro férrico, ácido ortofosfórico y alfa-tocoferol y todos se prepararon el mismo día que se usaron. Los resultados se expresan en mg/dl.

6. DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas se midieron con el método de Lowry et al. (80), para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A. Carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%.

Solución B. Sulfato de cobre al 0.5%.

Solución C. Es una mezcla de 50 mL de solución A + 1 mL de solución B (se prepara al momento de usarse).

Solución D. Reactivo de Folin & Ciocalteu 1 N. Se preparó a partir de una solución concentrada 2 N.

Solución E. Albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 mg/mL. Se preparó una curva patrón con esta solución de 5 hasta 50 ug (Fig. H).

La solución de ASB o la muestra se colocaron en un volumen final de 0.2 mL. A todos los tubos se les agregó 1 mL de solución C, se agitaron y se dejaron reposar 10 min. Después se les agregó

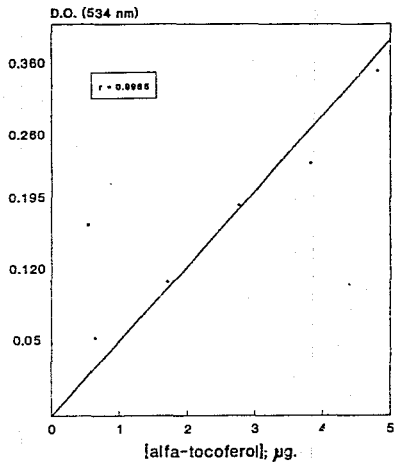


Fig. G Curva patrón para la determinación de alfa tocoferol.

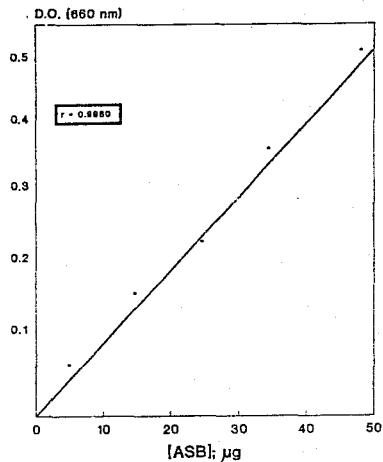


Fig. H Curva patrón para la determinación de proteínas

0.1 mL de solución D, mientras se estaban agitando vigorosamente.

Después de 30 min se leyó la densidad óptica (D.O.) a 660 nm.

Antes de cuantificar las proteínas urinarias, estas se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético (ATA) al 10%, mezclando 0.1 mL de orina y 1.9 mL de ATA, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos, se decantó y el precipitado se resuspendió en 2 mL de NaOH 0.1 M.

A los sueros se les hizo una dilución 1:400, y se tomaron 0.2 mL de esta dilución para cuantificar proteínas. A los tejidos (ya homogenizados y centrifugados) se les hizo una dilución previa: para hígado 1:1000 y para los tejidos restantes 1:100, y después se tomaron 0.2 mL para medir proteínas. Los resultados en orina se expresan en mg/24 horas, en suero mg/dL y en los tejidos mg/mL.

7. DETERMINACION DE UREA Y CREATININA

La urea y la creatinina se midieron por medio del método de la ureasa y del picrato alcalino con un autoanalizador (Analizador de creatinina 2 y Analizador BUN 2 de Beckman Instruments Co., Fullerton, CA, EUA).

8. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

Solamente se hicieron electroforesis a las muestras de orina del estudio con diferentes dietas de VE y Se, con el fin de determinar si había un cambio en el tipo de proteínas excretadas durante el SN (días 7 y 22) debido a las dietas.

8a. PRINCIPIO

Los geles de acrilamida se forman por la polimerización de la

acrilamida y bis-acrilamida. La reacción de polimerización se inicia por la adición de vinilo y un radical libre generado por el sistema, y el TEMED que actúa como acarreador de electrones para activar el monómero de la acrilamida. La elongación del polímero se da por la unión del monómero activado, estos se juntan al azar por la bis-acrilamida formando una cadena cerrada y un complejo "WEB" del polímero con una porosidad característica que depende de las condiciones de polimerización y de las concentraciones de acrilamida, temperatura y pH (81).

8b. SOLUCIONES Y PROCEDIMIENTO

i) Soluciones stock:

- 1) Solución del monómero (30% T, 27% bis)

Acrilamida..... 58.4 g

Bis-acrilamida..... 1.6 g

Aforar a 200 mL con agua destilada y se almacena a 4°C en la oscuridad.

- 2) Solución amortiguadora del gel de corrimiento 4X "running gel" (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris-HCl..... 36.3 g

Se ajusta el pH a 8.8 con HCl y se afora con 200 mL de agua destilada.

- 3) Solución amortiguadora del gel concentrador 4X "stacking gel buffer" (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris-HCl..... 3 g

Agua destilada..... aforar a 50 mL

Se almacena a 4°C.

- 4) Solución de SDS al 10%

- 5) Solución iniciadora (persulfato de amonio al 10%)
 Persulfato de amonio..... 0.5 g
 Aforar con agua destilada a 5 mL
- 6) "Running gel overlay"
 (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS)
 Tris-HCl..... 25 mL sol. # 2
 SDS..... 1 mL sol. # 4
 Agua destilada..... para 100 mL
- 7) Solución amortiguadora de tratamiento 2X
 (0.125 M tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS, glicerol al 20% y 2-
 mercaptoetanol al 10%)
 Tris-HCl..... 2.5 mL sol. # 3
 SDS..... 4 mL sol. # 4
 Glicerol..... 2 mL
 2-Mercaptoetanol..... 1 mL
 Azul de Bromofenol..... 0.015 mg
 Agua destilada..... aforar a 10 mL
 Dividir en alícuotas de 1 mL y refrigerar a -20°C, en la
 obscuridad.
- 8) Solución amortiguadora "TANK"
 (0.025 M Tris-HCl, pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%)
 Tris-HCl..... 12 g
 Glicina..... 57.6 g
 SDS..... 40 mL sol. # 4
 Agua destilada..... aforar a 4 litros
 No es necesario checar el pH de esta solución, el buffer de la
 cámara baja puede usarse de 4-5 corridas y el de la cámara

alta se descarta después de cada corrida.

9) Tinción con azul de Coomasie

(azul de Coomasie al 0.025%, metanol 40% y ácido acético al 7%)

Azul de Coomasie..... 0.5 g

Metanol..... 800 mL

Agitar y agregar:

Acido acético..... 140 mL

Agua destilada..... aforar a 2 litros

9.1) Solución para desteñir

Metanol al 10%

Acido acético al 7%

Preparar 4 litros con agua destilada.

9.2) Agua saturada con butanol

n-butanol..... 50 mL

Agua destilada..... 5 mL

10) Tinción con plata

En el caso de que se realice la tinción con plata, al terminar de correr los geles, estos se colocan en una solución fijadora que contiene alcohol metílico al 40% y ácido acético al 10%.

ii) Procedimiento para la preparación de los geles:

- 1) Ensamble el gel de placas verticales usando espaciadores de 1.5 mm.
- 2) En un frasco vacío de 125 mL se prepararon 60 mL de la mezcla del gel de separación (Tabla A), sin mezclar el persulfato de amonio y el TEMED.
- 3) Se tapó el frasco y se agitó.
- 4) Se añadió el TEMED y el persulfato de amonio, y se agitó con

cuidado para evitar la formación de burbujas.

- 5) Se agregó la mezcla a los vidrios empalmados para hacer el gel a un nivel cercano a los 3 cm del tope.
 - 6) Se colocó agua destilada con una jeringa.
 - 7) Se lavó la superficie de los geles con agua destilada.
 - 8) Se añadió cerca de 1 mL la solución de cubrimiento de gel "running gel overlay".
 - 9) Se dejó polimerizar aproximadamente 1 h
- ii) Preparación del gel concentrador:
- 11) En un frasco de 50 mL, mezclaron 20 mL del gel concentrador (Tabla A) y se agitó.
 - 12) Se añadió persulfato de amonio y TEMED y se agitó.
 - 13) Se agregó de 1-2 mL de esta solución a los vidrios para el gel con el peine insertado para formar los carriles de corrimiento y se dejó polimerizar.
 - 14) Se quitó el peine cuidando que no se formen burbujas.
 - 15) Se combinaron partes iguales de las proteínas de las muestras con la solución # 2.

TABLA A

	GEL DE SEPARACION AL 7.5%	GEL CONCENTRADOR
Acrilamida	3.75 mL	0.665 mL
Sol. (2)	3.75 mL	1.25 mL
DSS	150 µl	50 µl
Agua destilada	7.25 mL	3.05 mL
Persulfato de amonio	75 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2.5 µl

- 16) Se colocó la muestra en agua hirviendo durante 2 min.
- 17) Posteriormente, se enfriaron las muestras en hielo.
- 18) Se colocó 0.1 mL de las muestras (todas deben tener la misma cantidad de proteínas) de una en una en un carril, y acabar de llenar los carriles con solución amortiguadora "TANK".
- 19) Se llenaron las cámaras alta y baja con la sol. # 8.
- 20) Finalmente se conectó la fuente de poder y se ajustó a corriente constante (30 mA/1.5 mm).

Después de corridos los geles se ponen en la solución de tinción a 37°C durante una hora, después se colocan en una solución de ácido acético al 7% y metanol al 30% durante 12 h.

Por último se lee su densitometría y se calculan los pesos moleculares considerando el Rf.

2. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Fragmentos de tejido renal constituido por corteza y médula se fijaron con una solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos y se incluyeron en parafina. Cortes de 4 a 5 micras de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina para realizar estudios de microscopía de luz.

Para realizar el análisis ultraestructural, se obtuvieron pequeños fragmentos cúbicos de corteza renal que se fijaron con glutaraldehído al 4% en amortiguador de cacodilatos 0.01 M a temperatura ambiente durante 4 h, posteriormente se postfijaron con tetraóxido de osmio al 2%, se deshidrataron en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol y finalmente se incluyeron en resinas Epon. Se obtuvieron cortes ~~de~~ ~~resinas~~ y finos, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, con un

ultramicrotomo Sorval MT-6000. El estudio ultraestructural se realizó con un microscopio electrónico Zeiss M-10.

10. ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar. Todos los resultados (secuencial y con diferentes dietas) se sometieron a una prueba de Bartlett, con el fin de conocer si estos datos se distribuían normalmente, es decir, si existía o no una homogeneidad de varianzas. Esto significa que cuando la prueba daba una $P > 0.05$, los datos se consideraban dentro de una distribución normal; por otro lado, si daba una $P < 0.05$, significaba que los datos no tenían una distribución normal, y por lo tanto tenían que tratarse de otra manera (82,83).

10a. TRATAMIENTO ESTADISTICO PARA LOS DATOS DEL ESTUDIO SECUENCIAL

a) Datos normales:

Los grupos normal y nefrótico, se compararon día por día, por medio de una prueba paramétrica llamada "t" no pareada. Una $P < 0.05$ se consideró significativa.

b) Datos no normales:

Los grupos normal y nefrótico, también fueron comparados día por día, pero con una prueba no paramétrica, equivalente a la "t" no pareada llamada prueba de "U de Mann Whitney". Un límite de confianza mayor al 95% se consideró significativo.

10b. TRATAMIENTO ESTADISTICO PARA LOS DATOS DEL ESTUDIO CON
DIFERENTES DIETAS DE ANTIOXIDANTES (VE Y Se):

a) Datos normales:

Se realizaron análisis de una vía (ANDEVA), con el propósito de investigar si había grupos diferentes del control. Debido a que el ANDEVA solo indica si existe o no diferencia significativa entre los grupos, pero no señala a los grupos diferentes al grupo control, es necesario realizar otro análisis de comparación paramétrica llamado "método de Bonferroni" (83), el cual se basa en el uso de valores de "t" modificados; mediante estos valores se puede determinar qué grupo experimental difiere del grupo control. Una $P < 0.05$ se consideró significativa.

b) Datos no normales:

Se realizaron ANDEVAs no paramétricos, mediante la prueba de "Kruskall-Wallis", y posteriormente se realizó una comparación múltiple no paramétrica con prueba de Dunn.

Todos los ANDEVAs se realizaron de la siguiente manera:

- 1) ANDEVAs entre diferentes dietas por día, por ejemplo, se comparó la dieta normal del día 0 (control) contra la dieta deficiente del mismo día, y posteriormente dieta normal del día 0 (control) contra la dieta en exceso del mismo día. Las diferencias están representadas en las gráficas con asteriscos.
- 2) ANDEVAs entre la misma dieta por día, por ejemplo, dieta en exceso del día 0 (control) contra la dieta en exceso del día 7 (nefrótico), y después, dieta en exceso del día 0 (control) contra dieta en exceso del día 22 (nefrótico). Las diferencias se representan en las gráficas con letras....

3) Los datos obtenidos para el perfil de proteínas urinarias expresadas en mg de proteínas totales/ mg de creatinina total, se procesaron mediante un ANDEVA de comparaciones múltiples.

VI. RESULTADOS

I. ESTUDIO SECUENCIAL

Para evaluar la participación de los radicales libres de oxígeno en ratas con SN inducido con ANP se determinó secuencialmente el peso de las ratas, el volumen de orina excretado en 24 h, las proteínas totales en suero, la proteinuria, la urea y la creatinina séricas, así como la cantidad de VE en suero. Una vez comprobada la presencia de SN en las ratas experimentales se procedió a medir secuencialmente la LPx mediante la presencia del MDA y la actividad de la enzima GPx en riñón, hígado, corazón, pulmón cerebro y testículo los días 1 al 6, 8, 10, 16 y 22 después de la inyección con ANP.

Los resultados para corroborar la presencia de SN en las ratas tratadas con ANP demostraron lo siguiente:

a) Las ratas con SN inducido con ANP mostraron una ligera pero significativa disminución en el peso corporal (días 6-16), sin embargo para el final del estudio alcanzaron un peso similar a las controles, que duplicaron su peso al final del estudio (Fig. 1).

b) El volumen urinario aumentó los días 8-10 y regresó a valores control el día 12 (Fig. 2).

c) Las proteínas totales séricas disminuyeron en el grupo nefrótico los días 4-16 y regresaron a valores control el día 22 (Fig. 3).

d) La proteinuria se evidenció en las ratas nefróticas los días 3 al 16, siendo el pico mayor de proteínas excretadas los días 5 y 6, mientras que las ratas control se mantuvieron en valores cercanos a 0 (Fig. 4).

FIG. 1 PESO CORPORAL

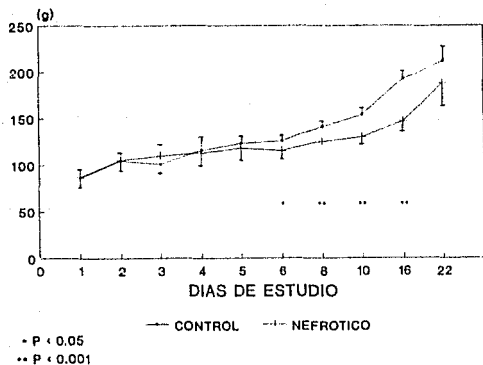


FIG. 2 VOLUMEN URINARIO

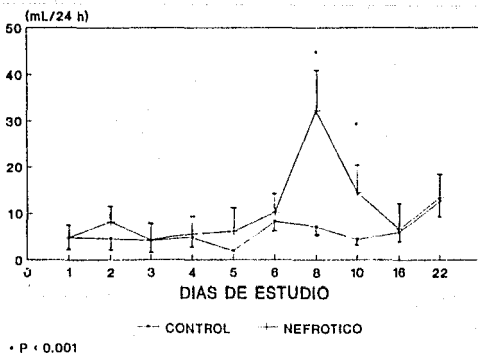
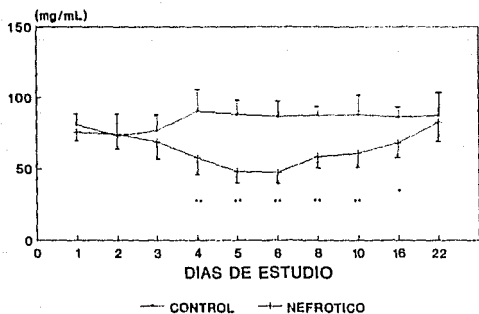
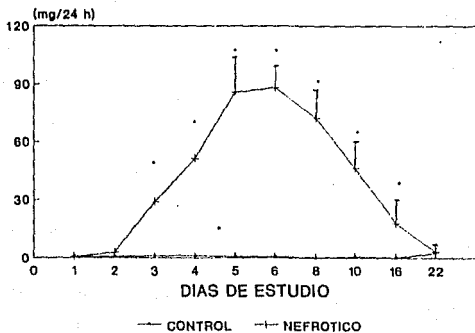


FIG. 3 PROTEINAS TOTALES
EN SUERO



• P < 0,005
•• P < 0,001

FIG. 4 PROTEINAS TOTALES EN ORINA



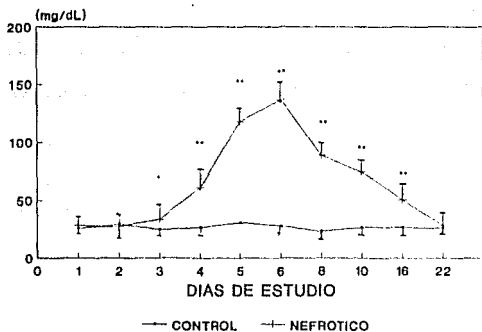
• P < 0,001

e) El grupo nefrótico presentó un aumento en la urea sérica los días 3 a 16 (Fig. 5), en donde se puede observar que el pico máximo fué en el día 6, para posteriormente regresar a valores control el día 22.

f) La creatinina en suero solamente se elevó un día en el grupo nefrótico (día 6) (Fig. 6).

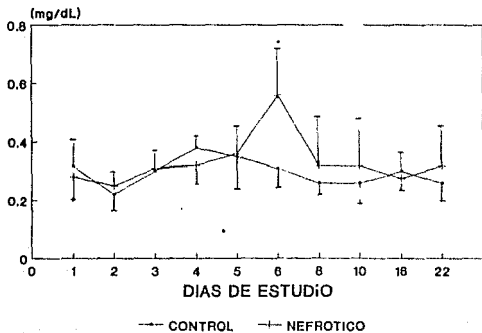
g) Los niveles de vitamina E en suero aumentaron en el grupo nefrótico los días 6 a 22 (Fig. 7), mientras que las ratas control se mantuvieron alrededor de 0.4 mg/dL durante todo el estudio.

FIG. 5 UREA EN SUERO



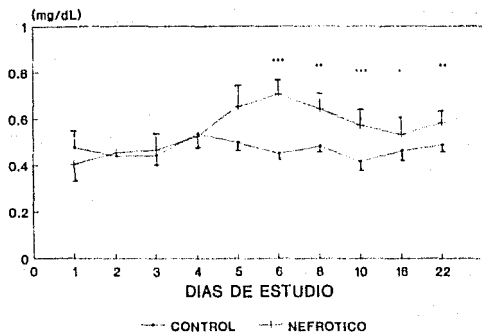
• P < 0.01
 ** P < 0.001

FIG. 6 CREATININA EN SUERO



• P < 0.02

FIG. 7 VITAMINA E EN SUERO



• P < 0.05 ** P < 0.005 *** P < 0.001

Ia. LIPOPEROXIDACION Y ACTIVIDAD DE GPx EN TEJIDOS:

Para demostrar la presencia de radicales libres en las ratas nefróticas se midieron los niveles de MDA (LPx) y la actividad de la GPx y se encontró que:

En todos los tejidos estudiados, la LPx se presentó antes de la proteinuria, lo cual sugiere que el estrés oxidativo se induce desde el primer día de la aplicación del ANP.

La LPx se mantuvo alta en el riñón desde el día 1 hasta el día 10 (Fig.8), siendo el pico máximo de LPx renal el día 2 (7 veces), mientras que la actividad de GPx renal se elevó solamente en el día 3 (2.2 veces) (Fig. 9).

La LPx en hígado aumentó los días 1, 2, 5 y 6 (Fig. 10), curiosamente el pico máximo fué también el día 2 (4.7 veces) como el riñón (Fig. 8), sin embargo, este tejido se recuperó nuevamente los días 3 y 4, y posteriormente a partir del día 8 hasta el 22.

La actividad de la GPx hepática aumentó los días 1-8, sin embargo solo alcanzó significancia estadística el día 3 (1.3 veces) (Fig. 11), nótese que fué el mismo día que se elevó en riñón (Fig. 9).

FIG. 8 LPx EN RIÑÓN

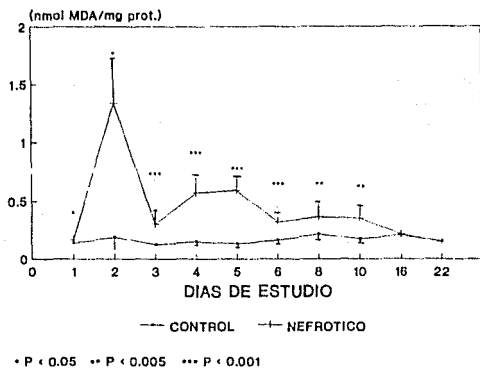


FIG. 9 ACTIVIDAD DE GPx EN RIÑÓN

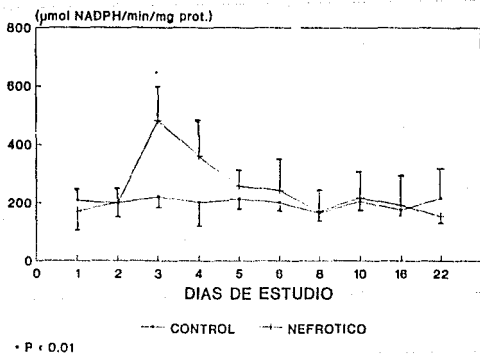


FIG. 10 LPx EN HIGADO

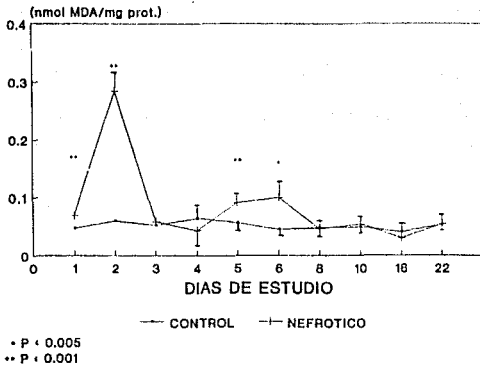
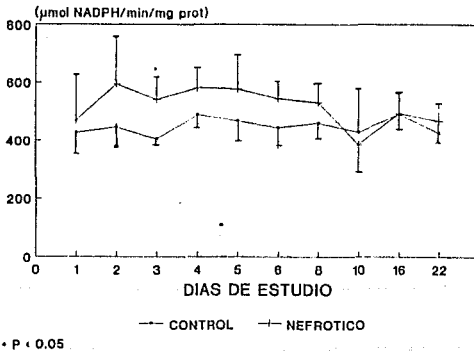


FIG. 11 ACTIVIDAD DE GPx EN HIGADO



En corazón la LPx aumentó los días 3 (5.4 veces) y 4 (2.4 veces), y disminuyó ligera pero significativamente los días 2, 5 y 16 (Fig. 12); la actividad de la GPx aumentó los días 3, 5, y 8, y disminuyó ligeramente el día 4 (Fig. 13). El pico máximo fué el día 5 (3.4 veces).

En pulmón, la LPx aumentó los días 1 al 5 y el día 10 (Fig. 14) siendo el pico máximo el día 3 (7.6 veces). La actividad de la GPx aumentó los días 5 y 6 (Fig. 15), siendo el pico máximo el día 5 (1.7 veces), lo cual puede explicar la disminución de la LPx los días 6 y 8. Como puede apreciarse en la figura 15 hubo una ligera disminución el día 8, aunque no significativa, lo cual puede explicar también el aumento en la LPx el día 10.

La LPx cerebral aumentó en los días 2 y 4-6. El pico máximo de LPx cerebral fué en el día 4 (2.5 veces) a partir del cual disminuyó hasta que regresó a valores control a partir del día 8 (Fig. 16). La actividad de la GPx se mantuvo baja los días 4-16 y solo alcanzó significancia estadística los días 5 y 8 (Fig. 17).

En testículo, la LPx aumentó los días 1, 3, 5 y 10, (Fig. 18), siendo el pico máximo de LPx el día 10 (4.1 veces); la actividad de la GPx aumentó solamente los días 3, 4 y 5 (Fig. 19) siendo el pico de máxima actividad el día 3 (2.6 veces).

Fig. 12 LPx EN CORAZON

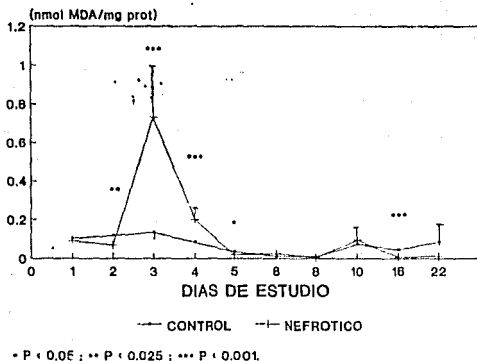


Fig. 13 ACTIVIDAD DE GPx EN CORAZON

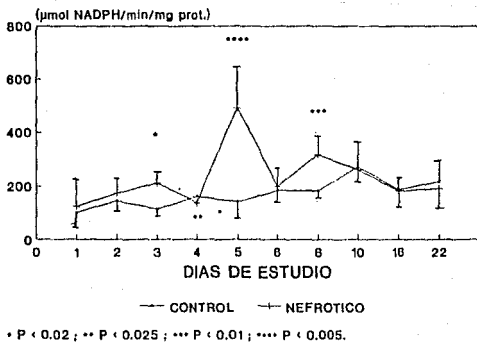


Fig. 14 LPx EN PULMON

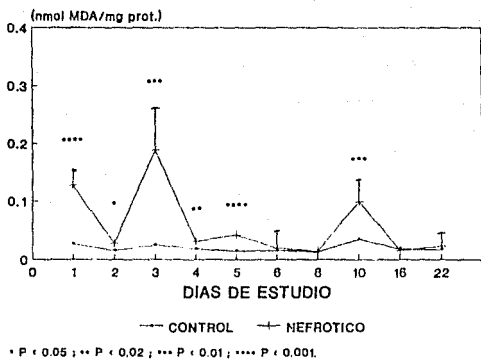


Fig. 15 ACTIVIDAD DE GPx EN PULMON

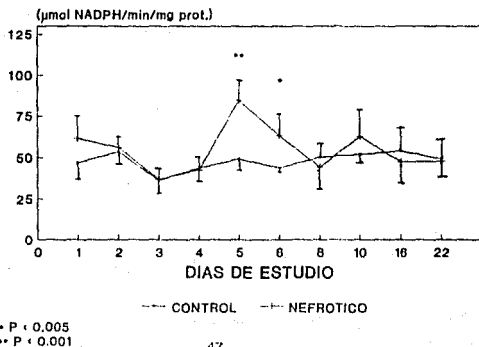


Fig. 16 LPx EN CEREBRO

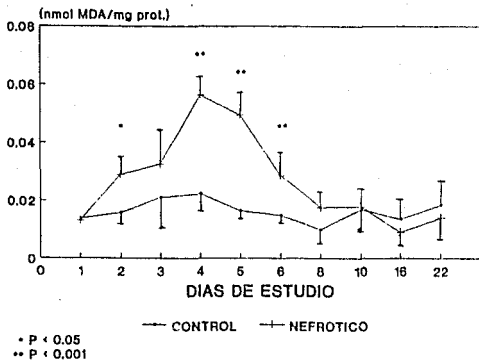


Fig. 17 ACTIVIDAD DE GPx EN CEREBRO

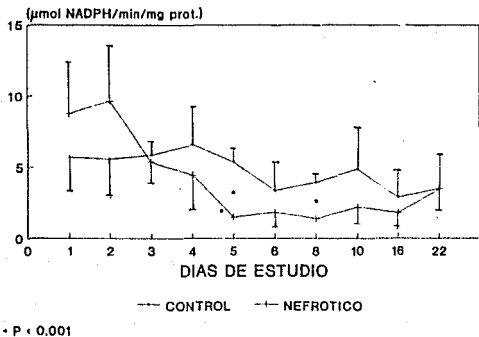
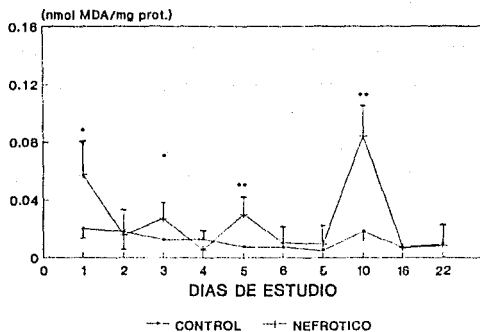
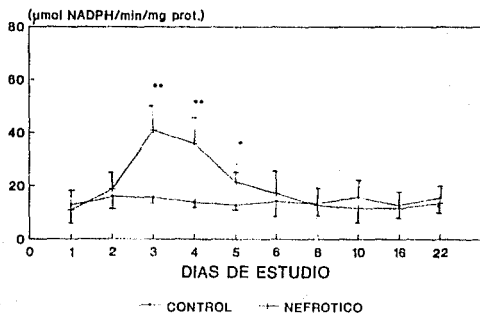


Fig. 18 LPx EN TESTICULO



* P < 0.005
 ** P < 0.001

Fig. 19 ACTIVIDAD DE Gpx EN TESTICULO



* P < 0.005
 ** P < 0.001

II. EFECTO DE LAS DIETAS NORMAL, ALTA Y BAJA DE Se Y VITAMINA E:

Para cumplir con el segundo objetivo de evaluar el efecto de la ingestión de diferentes cantidades de antioxidantes (VE y Se) en la dieta, se midieron las mismas variables en los mismos tejidos del estudio anterior (secuencial), en las ratas con las tres dietas con diferente cantidad de VE y Se, evaluándose así las 4 semanas con dieta sin inducción de SN (grupo control), y posteriormente los días 7 y 22 después de la inyección del ANP (grupo nefrótico).

IIa. DATOS ENCONTRADOS EN LAS RATAS ALIMENTADAS DURANTE 4 SEMANAS CON LAS DIFERENTES DIETAS DE VE Y Se SIN SN (CONTROL)

En el grupo control, las tres dietas experimentales no tuvieron efecto sobre el peso corporal, la urea, la creatinina y proteínas séricas, la proteinuria, además de que consumieron la misma cantidad de alimento (Tabla I). Las dietas bajas y altas en VE y Se no indujeron ninguna alteración histopatológica en los glomérulos renales cuando estos se analizaron por microscopía de luz (datos no presentados) y por microscopía electrónica (Fig. 20). Por el contrario, sí hubo diferencias significativas cuando se analizaron la LPx en riñón, hígado, corazón, pulmón, cerebro y testículo (Tabla II). Como era de esperarse la LPx aumentó (de 1.3 veces en testículo a 8.87 veces en corazón) en los tejidos de las ratas alimentadas con dieta deficiente y disminuyó (de 0.06 veces en pulmón a 0.51 veces en riñón) con la dieta alta.

TABLA I

Datos de las ratas control después de 4 semanas con diferentes dietas.

	NORMAL	DEFICIENTE	EXCESO	P
PESO CORPORAL (g)	102.7 ± 19.7	94.9 ± 17.2	103.9 ± 24.9	NS
CONS. ALIM. (g/dia)	8.76 ± 0.66	8.86 ± 0.89	8.64 ± 0.71	NS
UREA (mg/dL)	8.20 ± 1.48	6.40 ± 2.67	6.33 ± 2.74	NS
CREATININA (mg/dL)	0.49 ± 0.12	0.45 ± 0.10	0.51 ± 0.11	NS
PROTEINURIA (mg/24 h)	1.092 ± 0.73	1.182 ± 0.85	1.969 ± 0.64	NS
PROTEINAS SERICAS (mg/dL)	85.54 ± 11.2	85.67 ± 6.52	84.80 ± 6.59	NS

n = 7-15 ratas por grupo.



Fig. 20 Capilar glomerular de una rata control después de las cuatro semanas de la dieta normal. La estructura subcelular es normal. X 8,000.

TABLA II

Datos de lipoperoxidación en tejidos de ratas control
después de 4 semanas con diferentes dietas.
(nmol MDA/mg de prot.)

	NORMAL	DEFICIENTE	EXCESO	P
RÍSON	0.141 ± 0.045	0.220 ± 0.058 [*] (1.58)	0.072 ± 0.0069 (0.51)	** 0.05
HIGADO	0.109 ± 0.013	0.148 ± 0.011 [*] (1.37)	0.061 ± 0.022 ^{**} (0.58)	** 0.02 ** 0.003
CORAZON	0.00577 ± 0.00005	0.05198 ± 0.007 [*] (8.97)	0.00109 ± 0.0004 (0.19)	** 0.001
PULMON	0.0154 ± 0.0023	0.04288 ± 0.011 ^{**} (2.78)	0.00098 ± 0.00014 [*] (0.06)	** 0.01 ** 0.001
CEREBRO	0.00678 ± 0.0008	0.02 ± 0.0046 [*] (2.95)	0.00044 ± 0.00005 (0.11)	** 0.001
TESTICULO	0.0116 ± 0.0012	0.0154 ± 0.0047 [*] (1.32)	0.0013 ± 0.0004 (0.11)	** 0.001

n = 7-15 ratas por grupo.

Entre paréntesis se coloca el cociente deficiente/normal y
exceso/normal, respectivamente.

Por el contrario, la actividad de la GPx en tejidos (Tabla III), disminuyó con la dieta deficiente (de 0.20 veces en corazón a 0.79 veces en cerebro) y aumentó con la dieta alta (de 1.15 en testículo a 2.43 veces en pulmón). Estos datos confirman claramente el tipo de alimentación que estaban recibiendo.

Los niveles de VE en suero también fueron diferentes de acuerdo a la ingesta de antioxidantes (Tabla IV). Las ratas control con dieta baja mostraron niveles bajos de VE sérica, y las ratas con dieta alta mostraron niveles elevados de VE en suero.

Todos estos datos indican que las ratas con dieta deficiente tienen un estado prooxidante y las ratas con dieta en exceso tienen un estado de oxidación basal menor.

TABLA III

Datos de la actividad de GPx en tejidos de ratas control
después de 4 semanas con diferentes dietas.
($\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ de prot.)

	NORMAL	DEFICIENTE	EXCESO	P
RIÑON	136.42 \pm 27.23	50.132 \pm 5.813 (0.37)	250.47 \pm 36.73 (1.86)	* * 0.001
HIGADO	130.63 \pm 32.24	50.13 \pm 8.56 (0.38)	298.51 \pm 113.40 (2.28)	* * 0.05
CORAZON	50.46 \pm 15.63	10.21 \pm 4.76 (0.20)	78.86 \pm 33.23 (1.56)	* * 0.02
PULMON	61.82 \pm 20.88	46.05 \pm 6.70 (0.74)	150.24 \pm 28.68 (2.43)	* * 0.001
CEREBRO	6.77 \pm 1.07	5.37 \pm 1.47 (0.79)	11.97 \pm 2.61 (1.77)	* * 0.001
TESTICULO	23.93 \pm 7.83	17.87 \pm 2.31 (0.74)	27.41 \pm 7.82 (1.15)	NS

n = 7-15 ratas por grupo

Entre paréntesis se coloca el cociente deficiente/normal y
exceso/normal, respectivamente.

TABLA IV

Cantidad de VE en las ratas control después de 4 semanas
con diferentes dietas.
(mg/dL)

	NORMAL	DEFICIENTE	EXCESO	P
VE	0.475 ± 0.003	ND *	2.54 ± 0.01 (5.34) *	** 0.001

n = 5-10 ratas por grupo.

ND= No detectable.

IIb. EFECTO DEL ANP SOBRE LA FUNCION Y LA ESTRUCTURA RENAL EN LAS RATAS ALIMENTADAS CON LAS 3 DIETAS DE VE Y Se (DIAS 7 y 22).

Cuando en estas ratas se indujo el SN por la inyección del ANP desarrollaron proteinuria (Fig. 21) e hipoproteinemia (Fig. 22) en el día 7. En éste día el grupo tratado con ANP tuvo diferencias significativas con las diferentes dietas. Las ratas con dieta deficiente tuvieron mayor proteinuria e hipoproteinemia que las ratas con dieta normal. Las ratas con dieta alta tuvieron menor proteinuria e igual concentración de proteínas totales que el grupo con dieta normal. Al analizar el perfil de proteínas urinarias (Fig. 23), las ratas deficientes y normales tuvieron niveles más altos de proteínas excretadas que las ratas alimentadas con una dieta en exceso de VE y Se. A pesar de que la cantidad de proteínas totales fué diferente entre los grupos, el análisis electroforético (Fig. 24) y los densitométricos (Fig. 25) revelaron que no hubo diferencias en el tipo de proteínas excretadas.

El aumento en la urea (Fig. 26) en suero fué mayor en las ratas nefróticas alimentadas con dieta deficiente en el día 7. Además, la creatinina (Fig. 27) en suero también aumentó en las ratas con SN del día 7 alimentadas con dieta deficiente.

Fig. 21 PROTEINAS EN ORINA

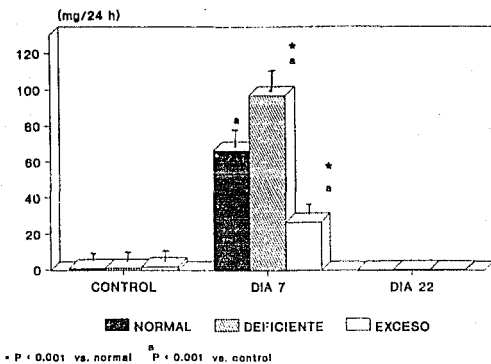


Fig. 22 PROTEINAS EN SUERO

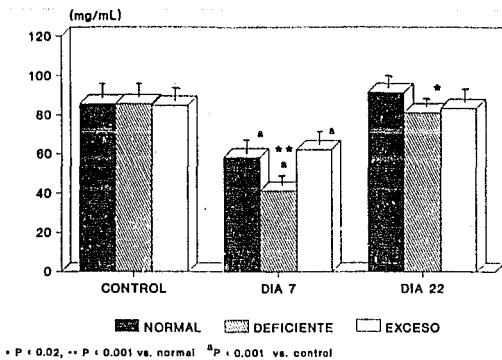
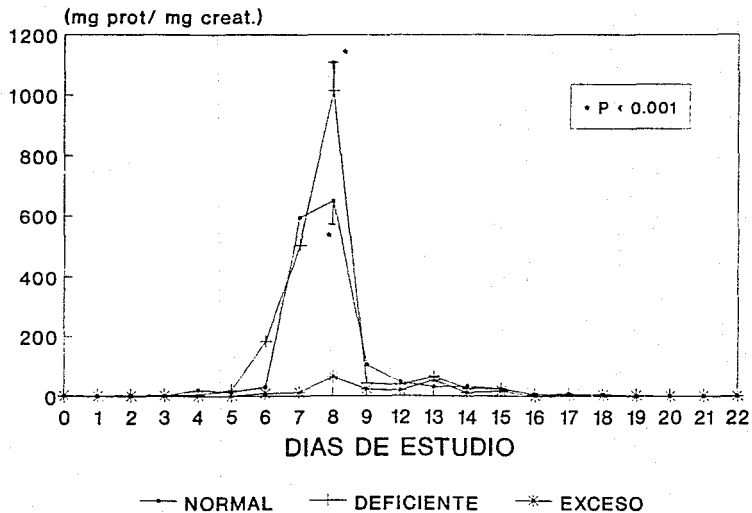


Fig. 23 PROTEINAS EN ORINA



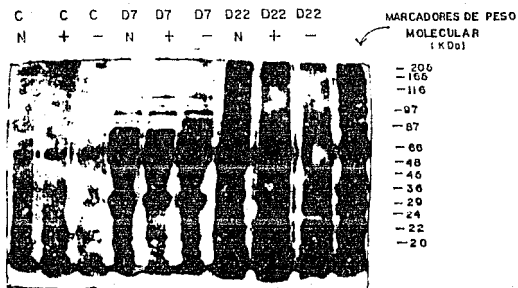


Fig. 24 Electroforesis en gel de acrilamida de diferentes muestras de orina de los grupos normal (N), deficiente (-) y en exceso (+) de los días control (C), 7 (D7) y 22 (D22).

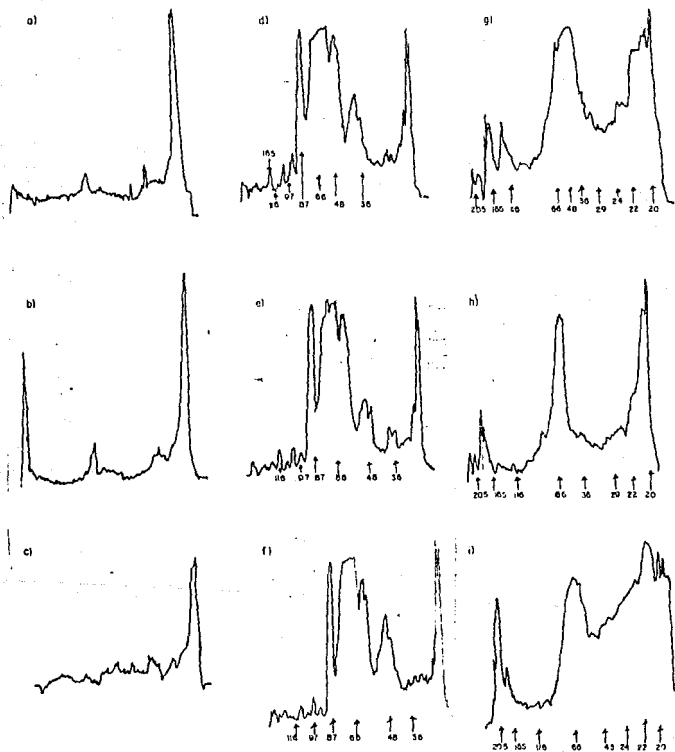
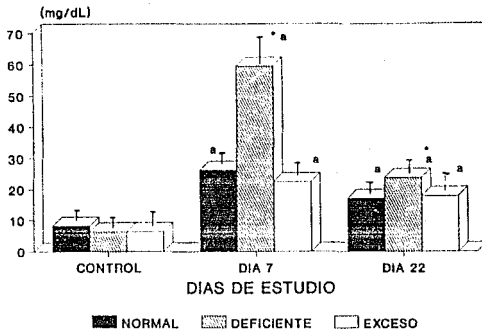


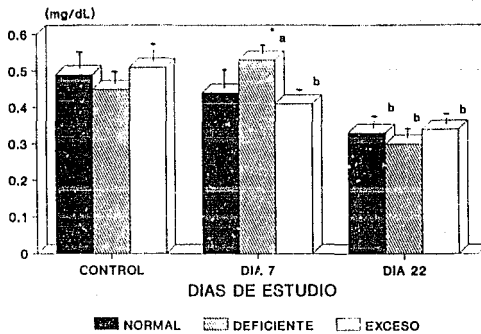
Fig. 25 Análisis densitométrico de la fig. 40, grupo control: a) normal, b) exceso, c) deficiente; grupos con SN d) día 7 normal, e) día 7 exceso, f) día 7 deficiente, g) día 22 normal, h) día 22 exceso, i) día 22 deficiente.

Fig. 26 UREA EN SUERO



* P < 0.001 vs. normal; a = P < 0.001 vs control

Fig. 27 CREATININA EN SUERO



* P < 0.05 ; a = P < 0.05, b = P < 0.001

Estas alteraciones funcionales están apoyadas por los hallazgos histológicos renales en estas ratas. Los glomérulos renales de las ratas con SN (día 7) con las tres dietas mostraron diferencias; las ratas con dieta deficiente mostraron pérdida completa de los procesos pedicelares de las células del epitelio visceral (fusión pedicelar), gotas lipídicas y transformación microquística y microvellosa de los podocitos (Fig. 28). En las ratas alimentadas con dieta normal se observó fusión universal de los procesos pedicelares y transformación microvellosa del epitelio visceral (Fig. 29). En el grupo experimental tratado con dieta alta en VE y Se se observaron menos alteraciones ya que solo se observó fusión parcial de pedicelos sin vacuolación en el citoplasma de podocitos (Fig. 30).

En cambio los niveles de VE fueron significativamente más elevados en las ratas con dieta en exceso que los otros 2 grupos de ratas con dietas normal y deficiente (Fig. 31).

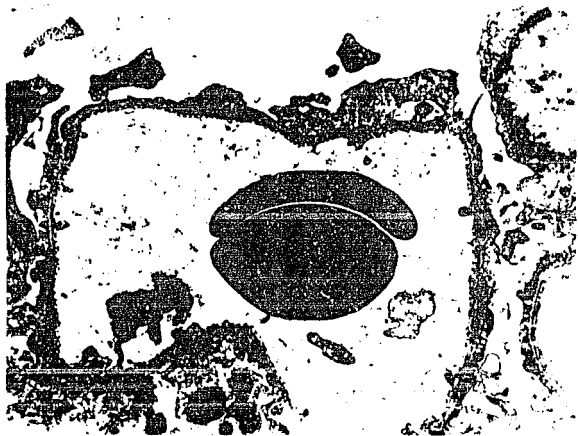


Fig. 28 Capilar glomerular de una rata alimentada con dieta deficiente en VE y Se y sacrificada 7 días después de la administración de ANP. Se observa fusión total de pedicelos y gotas de lípidos en el citoplasma de una célula del epitelio visceral. X 4,000.



Fig. 29 Capilar glomerular de una rata alimentada con dieta normal en VE y Se durante 4 semanas, inyectada con ANP y sacrificada 7 días después. Existe fusión de pedicelos y transformación microvellosa del epitelio visceral. X 10,000.

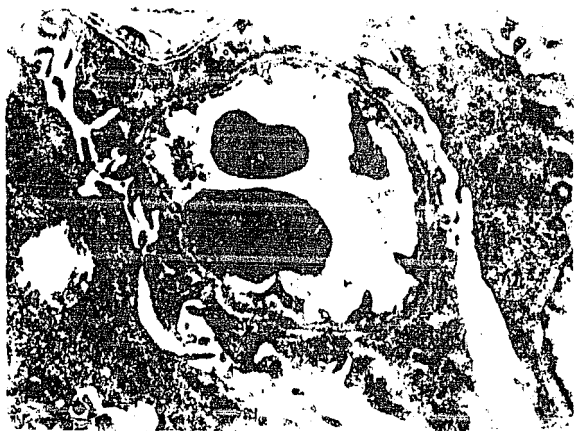
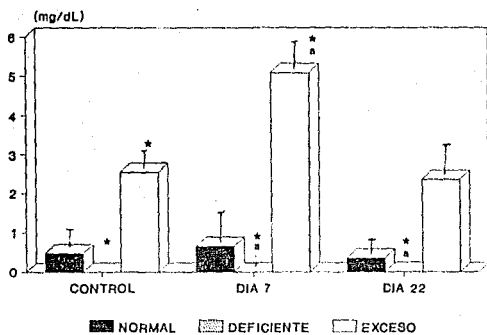


Fig. 30 Aspecto ultraestructural de un capilar glomerular de una rata nefrótica alimentada con una dieta en exceso de VE y Se y sacrificada 7 días después de la administración de ANP. Se observa fusión de pedicelos con leve transformación microvellosa de las células epiteliales viscerales. X 8,000.

FIG. 31 VITAMINA E EN SUERO



El ANP indujo un aumento en la LPx renal significativamente mayor en el grupo con dieta deficiente el día 7 (3.6 veces). En el grupo con dieta normal también aumentó la LPx en los días 7 (3 veces) y 22 (1.9 veces), pero este aumento fué menor que el grupo con dieta deficiente. El grupo con dieta en exceso mantuvo los valores control durante el SN (Fig. 32).

El ANP indujo un aumento de la GPx renal en las ratas con dieta deficiente en el día 7 (1.65 veces) y en las ratas con dieta normal los días 7 (2.16 veces) y 22 (2.38 veces). El ligero aumento de la GPx en las ratas con dieta en exceso los días 7 y 22 no fueron diferentes del control (Fig. 33).

El ANP no indujo aumento en la LPx hepática en ninguno de los 3 grupos. Sin embargo, esta disminuyó en los grupos con dieta normal y deficiente el día 22 (Fig. 34).

La actividad de la GPx hepática fué siempre mayor en el grupo en exceso y se mantuvo constantemente baja en el grupo deficiente, el grupo normal no tuvo cambios durante todo el estudio (Fig. 35).

Fig. 32 LPx EN RIÑON

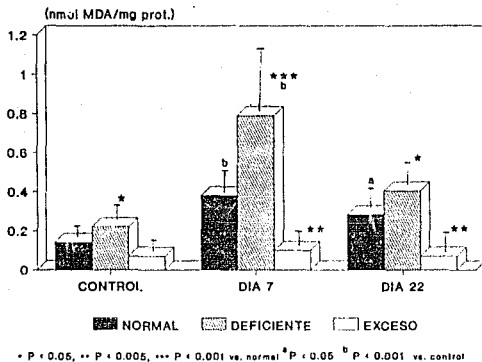


Fig. 33 ACTIVIDAD DE GPx EN RIÑON

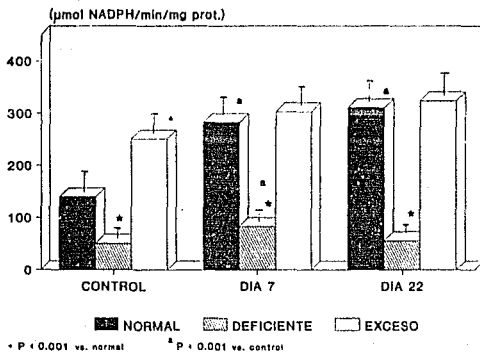


Fig. 34 LPx EN HIGADO

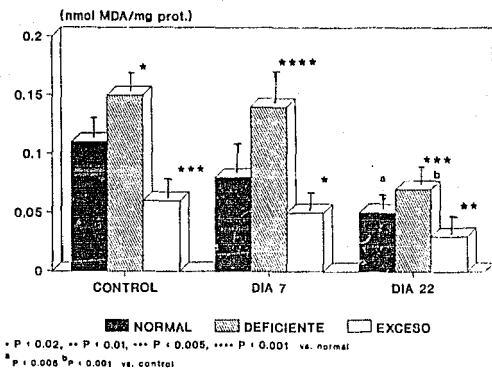
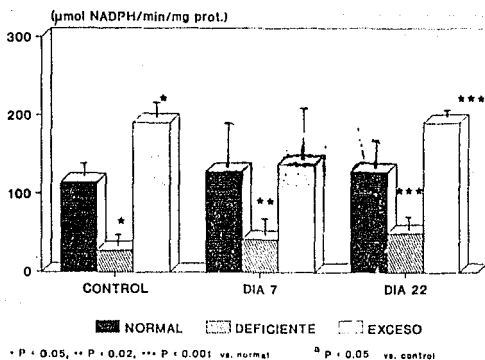


Fig. 35 ACTIVIDAD DE GPx EN HIGADO



La LPx en corazón fué mayor en el grupo deficiente (Fig. 36).

En el grupo en exceso la LPx en corazón aumentó solamente el día 7 (4 veces), mientras que los grupos normal y deficiente no mostraron cambios.

La actividad de la GPx en corazón aumentó en el grupo deficiente el día 7 (5.4 veces), sin embargo a pesar de este aumento, fué el grupo con menor actividad de GPx (Fig. 37), mientras que el grupo con exceso de antioxidantes tuvo la mayor actividad de la GPx durante SN, siendo significativamente mayores que el control los días 7 (1.5 veces) y 22 (1.5 veces). El grupo normal no presentó cambios.

La LPx en pulmón se elevó 2 veces en el día 7 en los tres grupos experimentales (Fig. 38). Los tres grupos regresaron a valores control el día 22.

La actividad de la GPx en pulmón se mantuvo baja en el grupo deficiente en el día 7, y disminuyó significativamente el día 22 (0.32 veces); el grupo en exceso al principio mostró una elevada actividad de la GPx (Fig. 39, control), y el día 7 disminuyó su actividad (Fig. 39 día 7) hasta llegar a los niveles del grupo normal en ese mismo día, sin embargo, aumentó significativamente el día 22 (1.6 veces), siendo el grupo con mayor actividad enzimática para ése día (Fig. 39, día 22).

Fig. 36 LPx EN CORAZON

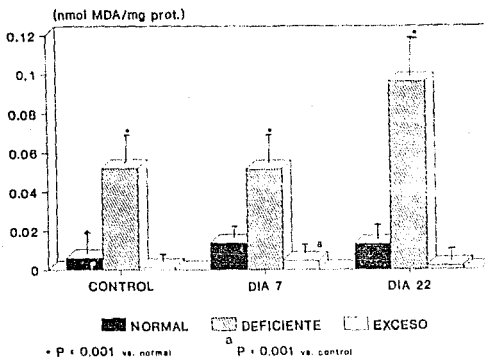


FIG. 37 ACTIVIDAD DE GPx EN CORAZON

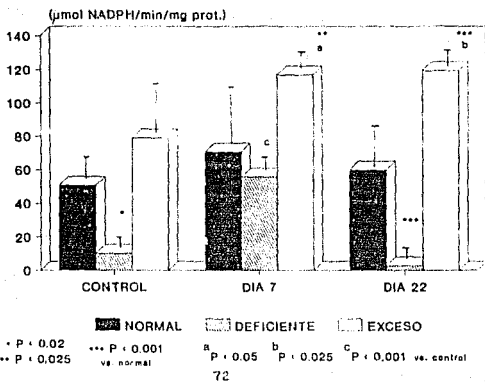


Fig. 38 LPx EN PULMON

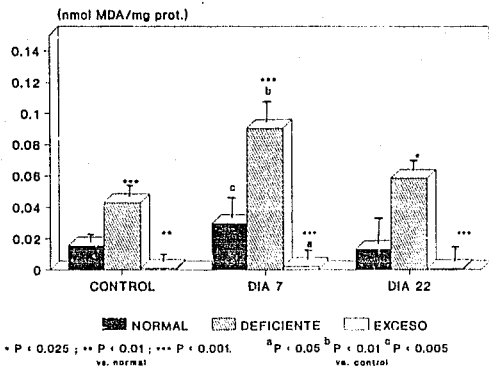
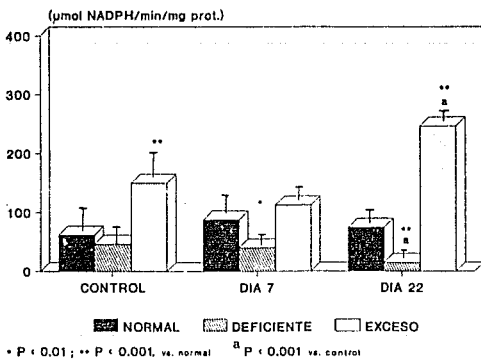


Fig. 39 ACTIVIDAD DE GPx EN PULMON



La LPx en cerebro se elevó en el grupo deficiente antes de la inyección del ANP (Fig. 40, control); después de la inyección de ANP, la LPx se elevó en los grupos deficiente (2.1 veces) y normal (2.1 veces) en el día 7 (Fig. 40, día 7), mientras que el grupo con exceso se mantuvo en niveles muy bajos, durante todo el estudio (Fig. 40).

Como se puede apreciar en la figura 41, la GPx cerebral se mantuvo elevada en el grupo en exceso a lo largo del estudio; en el día 7 los tres grupos disminuyeron significativamente: normal (0.55 veces), deficiente (0.59 veces) y exceso (0.39 veces). El día 22 no fueron diferentes del control.

La LPx en testículo en los grupos normal y en exceso se mantuvieron en niveles control en los días 7 y 22. La LPx en testículo fué más alta en los grupos con dieta normal y deficiente, y menor en el grupo en exceso (Fig. 42).

La actividad de la GPx en testículo, no fué diferente entre los tres grupos antes de inducir el SN con ANP (Fig. 43, control), sin embargo los valores de GPx disminuyeron en los grupos normal (0.54 veces) y deficiente (0.42 veces) en el día 7.

En el día 22 no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control.

Fig. 40 LPx EN CEREBRO

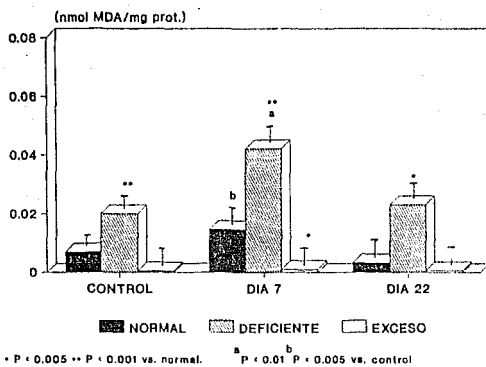


Fig. 41 ACTIVIDAD DE GPx EN CEREBRO

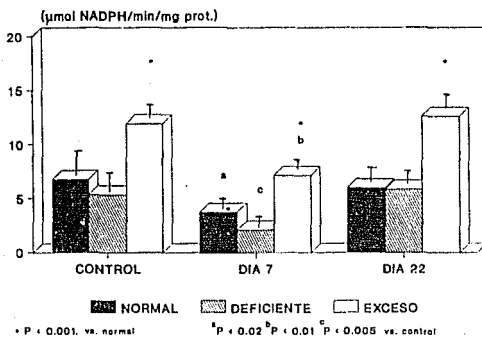


Fig. 42 LPx EN TESTICULO

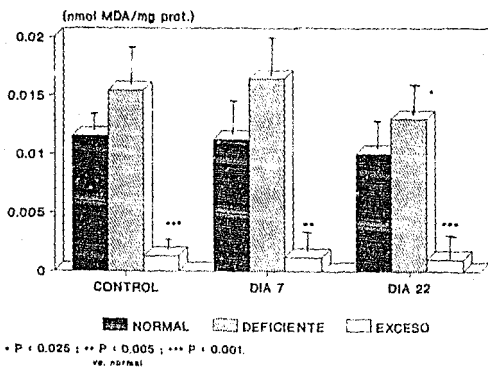
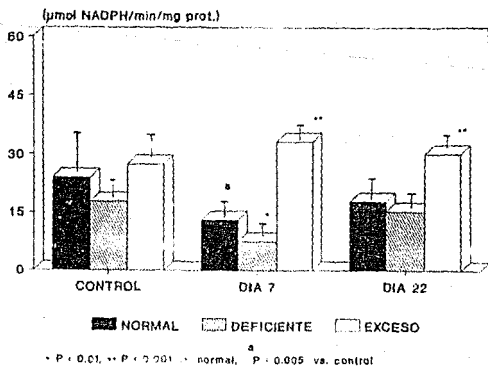


Fig. 43 ACTIVIDAD DE GPx EN TESTICULO



VII. DISCUSION

I. ESTUDIO SECUENCIAL

Los datos encontrados en este trabajo muestran que durante el SN inducido con ANP, existen cambios en la LPx y en la actividad de la GPx en los tejidos estudiados, así como en los niveles de VE en suero.

Se pudo observar que antes de la aparición de la proteinuria (día 3), todos los tejidos estudiados mostraron un aumento de la LPx, lo cual sugiere que el estrés oxidativo se inicia a partir de la inyección del ANP (día 1).

Cabe señalar, que el tejido que se mantuvo constantemente bajo el estrés oxidativo, fué el riñón (aumento de la LPx los días 1-10); éste hecho apoya la idea de que este órgano es el principal blanco de la oxidación.

El hecho de que la GPx renal aumentara en el día 3, puede ser consecuencia de que los niveles de LPx renal se elevaron el día 2; sin embargo, aunque se esperaba que los niveles de GPx renal se mantuvieran altos debido al constante estrés oxidativo en este órgano, esto no sucedió, lo cual puede deberse a que los niveles de Se disminuyeran debido a la proteinuria. Otro hecho que apoya esta idea es que los niveles de LPx hepática aumentaron principalmente en el día 2 lo que indujo que la actividad de la GPx se disparara en el día 3, pero una vez más la actividad de la GPx regresó a valores normales en el día 4, al igual que la actividad de la GPx renal.

El aumento de la LPx en corazón en los días 3 y 4, probablemente se debe a una caída en la actividad de la GPx en el día 4, lo cual también puede explicar la disminución de la

LPx del día 5, ya que existe un aumento en la actividad de la GPx en ese mismo día.

La LPx en pulmón se mantuvo constantemente alta de los días 1-5, y posteriormente el día 10, estos cambios parecen deberse a que los niveles de GPx no aumentaron sino hasta el día 5 y 6 logrando así una disminución del estrés oxidativo los días 6 y 8, sin embargo la actividad de GPx cayó a valores normales en el día 8 hasta el final del estudio, y, al parecer el estrés oxidativo no se eliminó totalmente ya que la LPx aumentó nuevamente el día 10.

Es probable que los elevados valores de la LPx en cerebro se puedan explicar debido a la baja actividad de la GPx en los días 5 y 8.

En el testículo es posible que los altos niveles de LPx induzcan el aumento de los niveles de GPx, sin embargo, nuevamente decaen los niveles de la GPx a pesar de que los niveles de LPx son altos.

Se sabe que existen numerosos factores que en un momento dado pueden contribuir a un aumento o a una disminución de la LPx. Estos pueden ser:

- 1) La regulación diferencial de las enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo como se demostró en células epiteliales del tracto respiratorio (84).
- 2) La distribución tisular de las enzimas antioxidantes (85-88).
- 3) La cantidad de productos generados por la oxidación, que pueden activar o suprimir a los mecanismos enzimáticos antioxidantes (88).

4) La relación entre la expresión de las enzimas antioxidantes y la edad del organismo (89).

5) El efecto de la restricción de los alimentos sobre la expresión de las enzimas antioxidantes (90,91).

En base a los resultados de este trabajo, la variación en el comportamiento de la LPx y en la actividad de la GPx pueden deberse a:

a) La regulación diferencial de las enzimas antioxidantes que, a pesar de que solamente se midió la actividad de la GPx, se pudo apreciar una actividad diferencial en cada tejido, esto es riñón \geq hígado $>$ pulmón \geq corazón $>$ testículo $>$ cerebro, lo cual concuerda con los datos reportados por Behne y Wolters (92) en donde muestran las mismas proporciones de actividad enzimática en condiciones normales.

b) La distribución tisular de las enzimas antioxidantes. Por ejemplo, se sabe que la actividad de la CAT es menor en el cerebro que en otros tejidos, así como una actividad moderada de GPx y SOD, lo cual hace a este órgano el más susceptible al daño oxidativo (93).

c) La disposición de elementos necesarios para que el sistema antioxidante responda. Por ejemplo, la producción de glutatión reductasa (GR), glucosa- ϵ -fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), NADPH, etc., para la enzima GPx ya que los niveles de estas enzimas o elementos aumentan bajo estrés oxidativo (91); también la distribución de Se como fuente primordial para la actividad de la GPx, que aunque no se conoce con exactitud si durante el SN se pierde este compuesto, es probable que así sea por la gran proteinuria que se presenta, ocasionando un descenso en la

actividad de la GPx, así como una disminución en los elementos de retroalimentación de este mecanismo antioxidante enzimático.

d) La cantidad de VE presente tanto en tejidos como en sangre antes y durante el estrés oxidativo.

e) Se sabe que durante el SN los eritrocitos presentan anomalías lipídicas que pueden ocasionar una sensibilidad anormal a la lipoperoxidación (94) debido a un aumento en la viscosidad celular (95).

f) Otro punto importante es que los organismos mantienen seguros a iones tales como Fe y Cu firmemente unidos en proteínas de almacenaje para esos iones, o en proteínas de transporte (96).

Los iones de Fe unidos a la transferrina no pueden estimular la LPx o la formación de radicales OH'. De igual manera pasa con los iones de Cu, ya que están unidos a proteínas que circulan en el plasma tales como la ceruloplasmina o la albúmina (97).

La importancia de la capacidad de secuestro de estos iones se ha estudiado en pacientes que sufren de diabetes, daño hepático y otros problemas, y se ha demostrado que esta capacidad es una importante defensa antioxidante (97-100).

g) El efecto per se del ANP que en estudios anteriores se ha sugerido que produce radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno durante su degradación (16-18).

Además, este trabajo apoya al menos la presencia de la especie reactiva H₂O₂, ya que los niveles de actividad de GPx se elevan, sugiriendo que esta especie puede desempeñar un papel muy importante en el daño tisular inducido por el ANP (100).

II. ESTUDIO CON DIFERENTES DIETAS DE ANTIOXIDANTES:

Los datos presentados en el estudio con diferentes dietas de VE y Se demuestran que la deficiencia y el exceso de estos antioxidantes en la dieta modifican sustancialmente la intensidad del SN inducido por ANP en ratas. La dieta baja aumentó y la dieta en exceso disminuyó el daño renal en estas ratas. Estos resultados son posiblemente consecuencia de los cambios en el estado basal de la oxidación renal y por lo tanto la capacidad antioxidante como se demuestra en los cambios de la actividad de la GPx y de la lipoperoxidación, como consecuencia de las diferencias en la ingestión de VE en las dietas. A pesar de los cambios en la actividad de la GPx y de la LPx renal en las ratas sin ANP (ratas control) la histología renal, la proteinuria y las proteínas en suero así como la urea y la creatinina séricas, no fueron diferentes. Estos datos indican que la función y la estructura renal basal no se alteran con los diferentes contenidos de VE y Se en la dieta, al menos durante las cuatro semanas en que los animales recibieron estas dietas. Estos datos concuerdan con los de Nath et al. (72) quienes no encontraron alteraciones funcionales ni estructurales renales a las cuatro semanas de dieta baja en VE y Se, sino que estas se presentaron solo después de 9 semanas.

Las diferencias en la estructura y función renal se hicieron evidentes sólo en las ratas nefróticas. Estos datos indican que la inyección del ANP constituye un retc oxidante al tejido renal probablemente debido al aumento en la producción de radicales libres de oxígeno como sugieren otros autores (16-22). De hecho, la LPx tisular aumentó en las ratas nefróticas con dieta normal o

deficiente, pero no en las ratas alimentadas en exceso. Nath y Paller (71) encontraron recientemente que la insuficiencia renal inducida por isquemia y reperfusión aumenta por la deficiencia de VE y Se en la dieta. Este modelo de isquemia y reperfusión se caracteriza por un reto oxidante al tejido renal.

El análisis electroforético de las proteínas urinarias demostró que no hubo diferencias cualitativas pero sí cuantitativas lo que sugiere que tanto la VE como el Se protegieron al riñón. Nagase, Kumagin y Honda (101), reportaron que la proteinuria se puede suprimir con dipiridamol en la nefrosis con ANP, ya que esta sustancia suprime la excreción de albúmina; de una manera diferente, pero análoga, la VE y el Se al proteger al riñón, disminuyeron la cantidad de proteínas excretadas, lo cual incrementó la protección en los tejidos de las ratas con dieta en exceso.

Se ha observado que el uso de antinefríticos tales como el TJ-8014 disminuye la nefrosis inducida por el ANP (70) debido a que esta medicina aumenta la actividad de enzimas atrapadoras de radicales oxigénicos, lo cual deja sin lugar a dudas que durante la metabolización del ANP se generan gran cantidad de radicales libres.

Los hallazgos reportados en este trabajo enfatizan la importancia de los constituyentes de la dieta en la respuesta al ANP. Estudios anteriores han demostrado que la disminución de las proteínas en la dieta (102,103) y el consumo de aceite de pescado (104,105) protegen, mientras que la dieta alta en colesterol (106) aumenta el daño renal en la nefrosis experimental. Este

estudio señala que otras modificaciones en la dieta, como la cantidad de Se y VE, son en parte determinantes del deterioro funcional y estructural de la respuesta al ANP en ratas.

El hecho de que a pesar de que la dieta alta en VE y Se protegió a las ratas de la LPx tisular, pero no desapareció totalmente la proteinuria, puede deberse a que la VE suprime la formación de 4 HN aunque no tanto la formación de MDA (107). Por otra parte, el transporte de VE se altera ya que como es transportado por las lipoproteínas y durante SN existe una hiperlipoproteinemia, la VE se eleva en sangre y puede perderse por orina lo que a su vez ocasiona una incorrecta distribución en los tejidos (108) aumentando de esta manera el riesgo del ataque por radicales libres a las células pobres en VE, de manera parecida a las células sanguíneas (94,95). La presencia de VE antes y durante el estrés oxidativo es muy importante, ya que de ello depende que el tejido sufra en mayor o menor grado un daño oxidativo. También la capacidad de retención por parte del tejido es vital. Se ha observado que el contenido de VE aumenta en diversos tejidos bajo una exposición al ozono, lo cual puede explicar en parte también el aumento de VE en suero en las ratas con SN (109).

El hecho de que en la mayoría de los tejidos de las ratas alimentadas con una dieta en exceso de antioxidantes hayan tenido niveles bajos de LPx en la mayoría de los tejidos estudiados, puede deberse a que:

- 1) La VE y el Se actuaron atrapando radicales formados por el ANP.
- 2) La VE y el Se indujeron que las ratas perdieran menos cantidad

de albúmina, por lo tanto, independientemente de la cantidad de VE y de Se que ingirieron, al perder menos albúmina y otras proteínas transportadoras de sustancias antioxidantes (Cu), aumentaron la capacidad defensiva del organismo contra estos radicales libres generados por el ANP (96).

Esto se hizo evidente, al analizar cortes de riñón al microscopio electrónico de estas ratas, pues las ratas alimentadas con una dieta en exceso de VE y Se, tuvieron menos alteraciones estructurales que las ratas alimentadas con una dieta normal o con dieta deficiente.

Todos estos hallazgos justifican la realización de más estudios con VE y Se más otros elementos antioxidantes que de alguna manera logren atrapar y metabolizar rápidamente los radicales generados por el ANP, sin alterar a gran escala el metabolismo normal del organismo pero sí de las defensas antioxidantes; por ejemplo la investigación de los niveles de ceruloplasmina en ratas con las tres dietas u otras proteínas transportadoras de sustancias antioxidantes.

En resumen los hallazgos de este trabajo son compatibles con la hipótesis de que los radicales libres de oxígeno están involucrados en la patogénesis del síndrome nefrótico inducido con aminonucleósido de puromicina.

VIII. CONCLUSIONES

1. El principal blanco del estrés oxidativo en SN experimental inducido con ANP en ratas es el riñón, sin embargo otros tejidos también muestran estrés oxidativo después de la inyección del ANP.
2. Los niveles de LPx y la actividad de la GPx aumentan en varios tejidos, incluyendo el riñón, en este modelo experimental.
3. Los datos demuestran que la deficiencia de VE y Se en la dieta aumenta el deterioro funcional y estructural observado en las ratas con SN inducido por ANP con un incremento simultáneo en la LPx renal.
4. Las ratas alimentadas con exceso de antioxidantes tienen menores alteraciones funcionales y estructurales renales y no presentan elevación en la LPx.
5. Las manipulaciones en el contenido de antioxidantes tales como VE y Se en la dieta limitan (dieta baja) o aumentan (dieta alta) la capacidad atrapadora de oxidantes del riñón y hace al órgano más vulnerable o resistente al daño por ANP.
6. Este trabajo apoya el papel de las especies reactivas de oxígeno en el SN inducido con ANP y justifica la investigación de dietas con diferente contenido de antioxidantes en otros modelos experimentales de daño renal, esto puede ser con vitamina A y C + VE y Se.

IX. REFERENCIAS

1. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: Pathophysiology and complications. En: The nephrotic syndrome, editado por Brenner y Stein. Churchill, Livingstone 1982;9:85-114.
2. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En Tratado de Nefrología, Martínez-Maldonado M, Rodicio-Díaz JL, Herrera-Acosta J. eds. Capítulo 39, Ediciones Norma, Madrid, España, 1993.
3. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodium retention. Rev Invest Clin 1990;42:29-38.
4. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. In vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. Rev Invest Clin 1990;42:120-126.
5. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on proteinuria and sodium retention. Rev Invest Clin 1990;42:210-216.
6. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. Clin Chim Acta 1990;191:175-184.
7. Hoedemaeker PJ. Experimental glomerulonephritis. En Nephrology, editado por Davidson AM, Cambridge University Press 1988;1:424-426.
8. Marsh BJ, Drabkin DL. Metabolic channeling in experimental nephrosis. Lipid metabolism. J Biol Chem 1955;212:633-639.
9. Frenk S, Antonowics VM, Craig JM, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolytes composition. Proc Soc Exp Biol Med 1955;89:424-427.
10. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. J Lab Clin Med 1957;50:437-446.

11. Moriasaki N, Mastsuola N, Saito Y, Kumagal A. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism* 1984;33:405-410.
12. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB. Adriamycin induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982;46:16-23.
13. Weening JJ, Rennke HG. Glomerular permeability and polianion in adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney Int* 1983;24:152-159.
14. Hoyer JR, Ratte J, Potter AH, Michael AF. Transfer of aminonucleoside nephrosis by renal transplantation. *J Clin Invest* 1972;51:2777-2780.
15. Hoyer JR, Maver SM, Michael AF. Unilateral renal disease in the rat, clinical, morphological and glomerular mesangial functional features of the experimental model produced by renal perfusion with aminonucleoside. *J Lab Clin Med* 1975;85:756-768.
16. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986;29:478-483.
17. Thakur V, Walker D, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int* 1988;34:494-499.
18. Beaman M, Birtwistle R, Howie AJ, Michael J, Adu D. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 1987;73:329-332.
19. Diamond JR. The role of reactive oxygen species in animal models of glomerular disease. *Am J Kid Dis* 1992;3:292-300.
20. Kawaguchi M, Yamada M, Wada H, Okigaki T. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury in vitro caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology* 1992;72:329-340.
21. Shah SV. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 1989;35:1093-1106.
22. Baud L, Ardailou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 1986;251:F756-F776.
23. Fishman JA, Karnovsky MJ. Effects of aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells *in vitro*. *Am J Pathol* 1985;118:398-407.

24. Ginevri F, Gusmano R, Oleggini R, Acerbo S, Bertelli S, Perfumo F, Cercignani G, Allegrini S, D'Allegrri F, Ghiggeri GM. Renal purine efflux and xanthine oxidase activity during experimental nephrosis in rats: difference between puromycin aminonucleoside and adriamycin nephrosis. *Clin Sci* 1990;78:283-293.
25. Ghiggeri GM, Cergignani G, Ginevri F, Bartelli R, Zetta L, Greco F, Candiano G, Trivelli A, Gusmano R. Puromycin aminonucleoside metabolism by glomeruli and glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1991;40:35-42.
26. Derr RF, Loechler DK, Alexander CS, Nagasawa HT. Inhibition of rat liver microsomal N-demethylase by alpha-naphthylisothiocyanate: Studies with puromycin aminonucleoside. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;126:844-849.
27. Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 1987;235:529-531.
28. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-514.
29. Grishman MB, McCord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. En: *Physiology of oxygen radicals*. Taylor AM, Matalon S, Ward P, eds. American Physiological Society: Bethesda, 1986:1-18.
30. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Davis conference: oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-545.
31. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol* 1990;186:1-88.
32. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Rad Biol Med* 1990;8:583-599.
33. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1990;4:2587-2597.
34. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91:3C,14S-3C,18S.
35. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991;126:104-105.
36. Albano E, Bellomo G, Parola M, Carini R, Dianzani U. Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1991;1091:310-316.

37. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991;91:1-8.
38. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
39. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1990;9:515-540.
40. Tamura H, Shibamoto T. Antioxidant activity measurement in lipid peroxidation with malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *JAACS* 1991;68:941-943.
41. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 186:407-421, 1990).
42. Rosen GM, Halpern HJ. Spin trapping biologically generated free radicals: correlating formation with cellular injury. *Meth Enzymol* 186:611-621, 1990.
43. Smokyszyn VM, Marnett LJ. Inhibition of liver microsomal lipid peroxidation by 13-cis-retinoic acid. *Free Rad Biol Med* 1990;8:491-496.
44. Shaffer BJ, Treanor CP, Del-Vecchio PJ. Expression of bovine and mouse endothelial cell antioxidant enzymes following TNF-alpha exposure. *Free Rad Biol Med* 1990;8:497-502.
45. Purewall M, Wang YM. Effect of dietary vitamin E on the activities of rat hepatic quinone reductase, xantine oxidase and glutathione (GSH)-transferase. *Nutritional Ass St III* 1985;4:840.
46. Assayama K, Kooy NW, Burr IM. Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J Lab Clin Med* 1986;107:459-464.
47. Rose CR. Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals: a radiation model. *Biochem Biophys Res Comm* 1990;169:430-436.
48. Rose CR. Ascorbic acid (AA) metabolism in protection against radioactive damage. *Water Soluble Vitamins II* 1985;2:820.
49. Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA, Cannon JG, Morrow FD, Blumberg JB. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1990;52:557-563.
50. Kline K, Sanders B. Modulation of immune suppression and enhanced tumorigenesis in retrovirus tumor challenged chickens treated with vitamin E. *In vivo* 1989;3:161-166.

51. Kline K, Cochran GS, Sanders B. Growth inhibitory effects of vitamin E succinate on retrovirus-transformed tumor cells in vitro. *Nutr Cancer* 1990;14:27-41.
52. Elsayed NM. Influence of vitamin E on polyamine metabolism in ozone exposed rat lungs. *Arch Biochem Biophys* 1987;255:392-399.
53. Hennig B, Boissonneault GA, Chow CK, Wang Y, Matulionis DH, Glauert HP. Effect of vitamin E on linoleic acid mediated induction of peroximal enzymes in culture porcine endothelial cells. *J Nutr* 1990;120:331-337.
54. Doni MG, Falanga A, Delaini F, Vicenzi E, Tomasiak M, Donati MB. The effect of vitamin E or selenium on the oxidant-antioxidant balance in rats. *Br J Exp Pathol* 1984;65:75-80.
55. Fischer WC, Whanger PD. Effects of selenium deficiency on vitamin E metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1977;23:273-280.
56. Combs GF, Noguchi T, Scott ML. Mechanism of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Fed Proc* 1975;34:2090-2095.
57. Hoekstra WG. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed Proc* 1975;34:2083-2089.
58. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage. Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987;1:441-445.
59. Burk RF. Biological activity of selenium. *Ann Rev Nutr* 1983;3:53-70.
60. Sunde RA. Molecular biology of selenoproteins. *Ann Rev Nutr* 1990;10:451-474.
61. Stadman TC. Selenium biochemistry. *Ann Rev Biochem* 1990;59:111-127.
62. Shwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor J against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957;79:3292-3293.
63. Spallholz JE. Anti-inflammatory immunologic and carcinostatic attributes of selenium in experimental animals. *Adv Exp Med Biol* 1981;135:43-62.
64. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role of a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588-590.

65. Behne D, Hofer-Bosse T. Effects of a low selenium status on the distribution and retention of selenium in the rat. *J Nutr* 1984;114:1289-1296.
66. McCay PB. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 1985;5:323-340.
67. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetic, and bioavailability. *Ann Rev Nutr* 1990;10:357-382.
68. Yoshimura S, Takekoshi S, Watanabe K, Fujii-Kuriyama Y. Determination of nucleotide sequence of cDNA coding rat glutathione peroxidase and diminished expression of the mRNA in selenium deficient rat liver. *Biochim Biophys Res Commun* 1988;154:1024-1028.
69. Hill KE, Burk RF. Influence of vitamin E and selenium on GSH dependent protection against microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1982;2:678.
70. Hattori T, Ito M, Suzuki Y. Studies on antinephritic effect of TJ-8014, Syo-saiko-to-Kyo-shyokyo-Ka-ouren-bukuryou: effects on puromycin aminonucleoside nephrosis and its mechanism. *Japan J Pharmacol* 1991;56:465-473.
71. Nath KA, Paller MS. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. *Kidney Int* 1990;38:1109-1117.
72. Nath KA, Salahudeen AK. Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *J Clin Invest* 1990;86:1179-1192.
73. Elsayed NM. Influence of polyamine metabolism in ozone exposed rat lungs. *Arch Biochem Biophys* 1987;255:392-399.
74. Yoshida S, Busto R, Watson BD, Santiso M, Ginsberg MD. Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: modification by dietary vitamin E. *J Neurochem* 1985;44:1593-1601.
75. Burk RF. Production of selenium deficiency in the rat. *Meth Enzymol* 1987;143:307-313.
76. Alho H, Koistinha J, Laaksonen HM, Hermonen A. Effects of lifelong selenium and vitamin E deficiency or supplementation on pigment accumulation in rat peripheral tissues. Lipofuscin and ceroid pigments. Porta EA, ed. Plenum Press: N. York, 1990:143-156.
77. Drapper HH, Hadley H. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1990;186:421-431.
78. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-958.

79. Tsien CC. An improved spectrophotometric method of determination of tocopherols using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *Anal Chem* 1961;33:849-851.
80. Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:267-275.
81. Merrill CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 1981;211:1437-1440.
82. Glantz SA. Biostatistics; how to detect, correct, and prevent errors in the medical literature. *Circulation* 1980;61:1-7.
83. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Cir Res* 1980;47:1-9.
84. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JF, Mossman BT. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266 1991;36:24398-24403.
85. Mariucci G, Ambrosini MV, Colarieti L, Bruscellini G. Differential changes in Cu, Zn and Mn superoxide dismutase activity in developing rat brain and liver. *Experientia* 1990;46:753-755.
86. Mezzetti A, Di Ilio C, Calafiore AM, Aceto A, Marzio L, Frederici G, Cuccurullo F. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery vein and heart. *J Mol Cel Cardiol* 1990;22:935-938.
87. Behne D, Sheid S, Kyriakopolous A, Hilmert H. Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1990;1933:219-225.
88. Jakoby WB, Ziegler DM. The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* 1990;265:20715-20718.
89. Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ageing Develop* 1990;53:217-227.
90. Rao G, Xia E, Richardson A. Effect of dietary restriction and aging on the expression of antioxidant enzymes. *Mol Biol Aging* 1990;12:391-404.
91. Semsei I, Rao G, Richardson A. Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:620-625.
92. Behne D, Wolters W. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 1983;113:456-461.

93. Gutteridge JMC. Free radicals and metal ions in human disease. *Free Rad Res Commun* 1986;1:173.
94. Clemens MR, Bursa-Zanetti Z. Lipid abnormalities and peroxidation of erythrocytes in nephrotic syndrome. *Nephron* 1989;53:325-329.
95. Jain SK, Ross JD, Levy GJ, Duett J. The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells. *Biochem Med Met Biol* 1990;44:37-41.
96. Halliwell B. Albumin, an important extracellular antioxidant?. *Biochem Pharmacol* 1988;37:569-571.
97. Auroma OI, Halliwell B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin promoters of hydroxyl-radical generation?. *Biochem J* 1987;241:273-278.
98. Grootveld M, Bell JD, Halliwell B, Auroma OI, Bomford A, Sadler PJ. Non-transferrin bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and magnetic nuclear resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1989;264:4417-4422.
99. McLaren GD, Muir WA, Kellermeyer RW. Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1983;19:205-266.
100. Flohe L. Glutathione peroxidase brought into focus, en Pryor WA (ed): *Free radicals in Biology* (vol 5) New York, Academic, 1982:223-254.
101. Nagase M, Kumagi H, Honda N. Suppression of proteinuria by dipyrindamole in rats with aminonucleoside nephropathy. *Renal Physiol* 1984;7:218-226.
102. Diamond JR, Karnovsky MJ. Ameliorative effects of dietary protein restriction in chronic aminonucleoside nephrosis. *J Lab Clin Med* 1987;109:538-544.
103. Remuzzi G, Zoja C, Remuzzi A, Rossini M, Battaglia C, Brogгинi M, Bertani T. Low protein diet prevents glomerular damage in adriamycin-treated rats. *Kidney Int* 1985;28:21-27.
104. Ito Y, Barcelli U, Yamashita W, Weiss M, Thomposon B, Kashyap M, et al. Dietary fat in experimental nephrotic syndrome: beneficial effects of fish oil on serum lipids and, indirectly, on the kidney. *Life Sci* 1987;40:2317-2324.
105. Ito Y, Barcelli U, Yamashita W, Weiss M, Giss-Greenwalt P, Pollak VE. Fish oil has beneficial effects on lipids and renal disease of nephrotic rats. *Metabolism* 1988;37:352-357.

106. Diamond JR, Karnovsky MJ. Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol supplementation. *Kidney Int* 1987;32:671-677.

107. Tamura H, Shibamoto T. Antioxidative activity measurement in lipid peroxidation systems with malonaldehyde and 4-hidroxy nonenal. *JAOCS* 1991;68:941-943.

108. K kocglu E, Ulakoglu E. The transport of vitamin E in plasma and its correlation to plasma lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Practice* 1991;14:175-182.

109. Elsayed NM, Mustafa MG, Mead JF. Increased vitamin E content in the lung after ozone exposure: a possible mobilization in response to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1990;282:263-269.

110. Ryan GB, Karnovsky MJ. An structural study of mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8:219-232.