

03086
10
24

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado
Centro de Neurobiología

EFFECTO DEL SINDROME NEFROTICO CRONICO INDUCIDO POR AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD OSEA METABOLICA EN RATAS

T E S I S
Que para obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
p r e s e n t a
ROSA ISABEL SIERRA AMOR

México, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EFFECTO DEL SINDROME NEFROTICO CRONICO
INDUCIDO POR AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICINA
SOBRE LA ACTIVIDAD OSEA METABOLICA EN RATAS**

Tesis de Doctorado: M en C Rosa Isabel Sierra Amor

**Tutor: Dr. José Pedraza Chaverrí
Departamento de Biología
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México**

**Cotutores: Dr. Manuel Salas Alvarado
Centro de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México**

**Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera
Centro de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México**

Ciudad Universitaria, México, D.F.

INDICE

	PÁGINA
SUMMARY	1
RESUMEN	2
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Remodelamiento óseo	4
1.2 Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo	8
1.3 Contenido mineral y densidad de la masa ósea	11
1.4 Síndrome nefrótico	14
1.5 Síndrome nefrótico experimental	18
2 ANTECEDENTES	19
3 HIPÓTESIS	25
4 OBJETIVOS	26
5 MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Animales y diseño experimental	27
5.2 Procedimientos analíticos	28
5.3 Análisis estadístico	36
6 RESULTADOS	37
7 DISCUSIÓN	57
8 CONCLUSIONES	66
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Esta Tesis se realizó en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, y en el Laboratorio de Investigación en Metabolismo Mineral del Departamento de Pediatría de la Universidad de Cincinnati-Children's Hospital Medical Center, bajo la dirección del Dr. José Pedraza-Chaverrí.

Agradezco a las siguientes personas el haber apoyado en todos aspectos la realización de esta Tesis:

DR. JOSÉ PEDRAZA-CHAVERRI, Departamento de Biología, Facultad de Química, U.N.A.M.

DR. MANUAL SALAS ALVARADO y DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, Centro de Neurobiología. U.N.A.M.

DRA. BONNY L. SPECKER, Centro de Investigación en Pediatría Ósea. Departamento de Pediatría. Children's Hospital-University of Cincinnati Medical Center.

PERSONAL del Laboratorio del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, y del Laboratorio de Investigación en Metabolismo Mineral del Departamento de Pediatría, Children's Hospital-University of Cincinnati Medical Center.

PERSONAL Académico y Administrativo de la Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades. U.N.A.M.

Dedico esta Tesis con mucho cariño a mis sobrinos: Cristina Eugenia, Mariana, Adriana, Francisco y Ernesto, deseándoles sinceramente que logren alcanzar siempre las metas profesionales y espirituales que se tracen en sus vidas.

A mis PADRES, por su amor y dedicación.

Al Dr. Juan Farill[†] y al Dr. Leonardo Zamudio, dos ejemplos de profesionalismo y dedicación en el tratamiento de la poliomielitis.

SUMMARY

The human nephrotic syndrome (NS) is accompanied by important alterations of the mineral and bone metabolism. The purpose of the present study was to examine the bone metabolism in rats with experimental NS and normal creatinine clearance, and to evaluate the reversibility of this alteration. NS was induced by three injections of puromycin aminonucleoside (PAN) on days 0, 21 and 35 (10, 5 and 5 mg/100 g body weight), respectively.

The biochemical markers of bone formation (osteocalcin and alkaline phosphatase) and bone resorption (hydroxyproline and pyridinoline), bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) determined by dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA), were studied on days 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 and 112. In serum, osteocalcin (OC) concentration increased ($p < 0.001$), and alkaline phosphatase (ALP) decreased ($p < 0.002$). In urine, hydroxyproline increased ($p < 0.001$), but urinary pyridinoline was not different from the control group throughout the study. Increased serum parathyroid hormone concentration and decreased levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxyvitamin D were found since day seven. During the intense proteinuria, bone resorption predominates and decreased BMC and BMD ensues in PAN-nephrotic rats. PAN-nephrotic rats showed low BMC and BMD compared to control group ($p < 0.001$). At the end of the study when proteinuria persisted but total serum protein returned to control values, the biochemical bone markers, BMC, and BMD returned to normal. In conclusion, PAN-nephrotic rats had reversible bone alterations that were related to the magnitude of proteinuria, and the concentration of total serum protein.

VoBo



D. José Pedraza Chaverri

RESUMEN

El síndrome nefrótico (SN) en seres humanos se acompaña de importantes cambios en el metabolismo mineral y óseo. El propósito del presente estudio fue examinar el metabolismo óseo en ratas con SN experimental y con depuración de creatinina normal, así como evaluar si esta alteración es reversible. El SN se indujo mediante tres inyecciones de aminonucleósido de puromicina (ANP) los días 0, 21 y 35 (10, 5 y 5 mg/100 g de peso corporal), respectivamente.

Los marcadores bioquímicos de formación ósea (osteocalcina y fosfatasa alcalina) y de resorción ósea (hidroxiprolina y piridinolina), el contenido mineral óseo (CMO) y la densidad de la masa ósea (DMO) determinadas por densitometría de doble energía de rayos X, se estudiaron los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112, después de la primera inyección de ANP. La proteinuria estuvo presente a lo largo de todo el estudio. La hipoproteinemia se observó los días 7, 28, 42, y 56 regresando a valores control los días 84 y 112. En el suero, la concentración de osteocalcina aumentó ($p < 0.001$), y la fosfatasa alcalina disminuyó ($p < 0.002$). En la orina, la hidroxiprolina aumentó ($p < 0.001$), pero la piridinolina urinaria no fue diferente del grupo control a lo largo del estudio. El aumento en la concentración de hormona paratiroidea en suero y la disminución de los niveles de 25-hidroxi y 1,25-dihidroxitamina D se observó a partir del día siete. Los datos anteriores, nos indican que las ratas con SN muestran un aumento de la actividad osteoclástica y osteoblástica. Durante la proteinuria masiva, la resorción ósea predominó y condujo a la disminución del CMO y la DMO en ratas con SN inducido con ANP ($p < 0.001$).

Al final del estudio, cuando la proteinuria persistió pero la concentración de proteínas en suero regresó a valores control, los marcadores bioquímicos óseos, el CMO y la DMO también regresaron a valores control. En conclusión, las ratas con SN inducido por ANP, tienen alteraciones óseas reversibles que se relacionan con la magnitud de la proteinuria, y con la concentración de la proteínas totales en suero.

1 INTRODUCCION

1.1 REMODELAMIENTO ÓSEO. El hueso es un tejido complejo y está en constante proceso de remodelamiento. El crecimiento óseo durante la infancia y la adolescencia tiene lugar a nivel de la epífisis y de la metáfisis; posteriormente se forma el cartilago, se calcifica y da lugar al hueso de "nueva formación" (hueso largo).

El proceso de remodelamiento del hueso está sujeto a la influencia de cambios fisiológicos y mecánicos. Este es el proceso biológico más largo que tiene lugar en la vida del ser humano (proceso de resorción y formación). La formación de hueso (formación del osteoide) tiene lugar inmediatamente después de la resorción ósea, lo que favorece el depósito de capas nuevas de hueso sobre la matriz ósea existente, y da lugar al proceso completo de mineralización ósea. El remover calcio del hueso (viejo) y liberarlo a la circulación sanguínea, permite mantener y satisfacer las necesidades metabólicas de este ion en el organismo. Este proceso (resorción-formación) constituye la base del remodelamiento óseo, y los productos de degradación que se producen se utilizan como marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo.

El esqueleto consta de dos tipos diferentes de hueso: el hueso *cortical*, el cual predomina en los huesos largos de las extremidades; y el hueso *concellous*, conocido anteriormente como hueso *trabecular*, el cual predomina en las vértebras y en la pelvis. El hueso está constituido por unidades de "remodelamiento óseo" (URO), localizadas en diferentes áreas y niveles de la estructura ósea. (Figura 1).

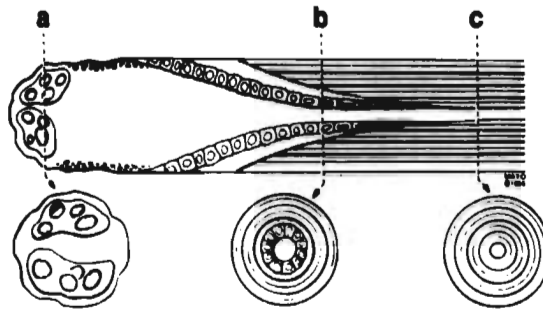


FIGURA 1 ACTIVIDAD DE LA UNIDAD DE REMODELAMIENTO ÓSEO (URO) EN EL HUESO CORTICAL. (a): Corte en "túnel" por los osteoclastos. (b) Formación de hueso "nuevo". (c) Estructuras ósea de nueva formación.

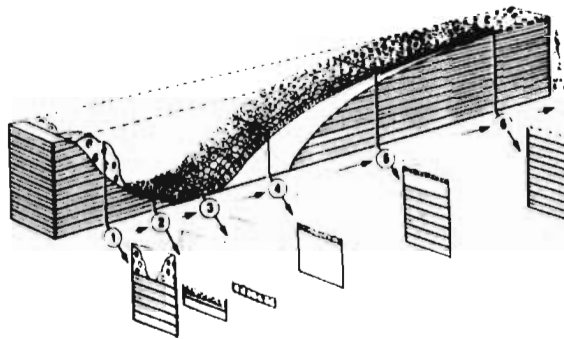


FIGURA 2 ACTIVIDAD DE LA UNIDAD DE REMODELAMIENTO ÓSEO (URO) EN EL HUESO TRABECULAR. (1) Resorción osteoclastica. (2) Resorción mononuclear. (3) Migración de los preosteoblastos y diferenciación en osteoblastos. (4) Matriz osteoblástica de nueva formación (osteóide). (5) Mineralización y (6) Estructuras ósea de nueva formación. (Eriksen, E.F., et al., 1994).

La función y el reacomodo de estas pequeñas unidades, las cuales están en continuo remodelamiento, son la base de los cambios que ocurren en la masa ósea y en su estructura; estos cambios aumentan con la edad y en las enfermedades óseas metabólicas.

Cada ciclo de remodelamiento óseo se inicia al activarse los precursores osteoclastícos, los cuales son transformados en osteoclastos multinucleados e inician así, la resorción ósea. Una vez terminado este proceso, el área se cubre de preosteoblastos que se diferencian posteriormente en osteoblastos. Esta capa de hueso nuevo se mineraliza durante el proceso de "mineralización osteoblástica". Por lo tanto, el remodelamiento óseo se describe como: el proceso de *actividad-resorción-formación* (A-R-F), que a su vez, se define como la "duración de la secuencia completa de remodelamiento", y se divide en dos períodos: el período de erosión (PE) y el período de formación (PF) (Eriksen, E.F. et al., 1994) (Figura 2). En sujetos con un metabolismo óseo normal, el ciclo de remodelamiento óseo tiene una duración de aproximadamente 100 días a nivel del hueso cortical y, de 200 días en el hueso *concellous*.

Los *osteoblastos* constituyen la línea celular responsable de la formación de la matriz ósea, y tienen un papel muy importante en el proceso de calcificación ósea. La membrana plasmática del osteoblasto es rica en fosfatasa alcalina y tiene receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitamina D y para estrógenos, pero no para calcitonina (Baron, R. 1990).

Los *osteoclastos*, por su parte, son los responsables de la resorción ósea. El osteoclasto es una célula multinucleada gigante localizada en la superficie del hueso y dentro de la laguna de Howship (Baron, R. 1990). La actividad osteoclástica está influenciada por tres hormonas: hormona paratiroidea (PTH), vitamina D [1,25(OH)₂D₃] y calcitonina (CT). Las dos primeras tienen un potente efecto estimulador sobre la actividad resortiva (Mundy, G. 1990) y no así la CT, la cual es un fuerte inhibidor de la actividad osteoclástica, aunque su efecto es relativamente de corta duración (Werner, J.A., et al., 1972).

La pérdida de hueso se observa en la mayoría de las enfermedades óseas y se traduce como el cambio en el remodelamiento y el balance óseo a nivel de las URO. En el hiperparatiroidismo secundario, por ejemplo, hay aumento del recambio óseo; el hueso *concellous* sufre resorción en "túnel", asociada con fibrosis medular. En algunas enfermedades que se acompañan de hiperparatiroidismo secundario, como es el caso del síndrome posgastrointestinal, se ha observado disminución de la densidad ósea. La osteoformación y la osteoresorción, son mecanismos íntimamente involucrados en los procesos normales y anormales del metabolismo óseo (Deftos, L.J. 1984). El conocimiento de estos procesos por separado ayuda al mejor entendimiento de las enfermedades óseas, tales como la osteoporosis, la osteomalacia, la enfermedad de Paget y la osteítis fibrosa quística; de igual forma en las enfermedades que se acompañan de hiperparatiroidismo primario y secundario, como en el caso del SN (Malluche, H.H., et al, 1979).

1.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELAMIENTO ÓSEO. Los marcadores bioquímicos de la formación ósea más utilizados en la actualidad son: la fosfatasa alcalina (FA), la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (IFA), la osteocalcina (OC), también conocida como proteína GLA, (ácido gamma-carboxi-glutámico) (Azria, M. 1989), y los péptidos de la procolágena tipo I: el fragmento carboxilo terminal (PICP) y el fragmento amino terminal (PINP) (Ebeling, P.R. et al., 1992). Así mismo, los marcadores de resorción ósea utilizados actualmente son la hidroxiprolina urinaria (OHpr) y los enlaces de la colágena ósea: piridinolina (P) y deoxipiridinolina (DP), que son excretados en la orina (Delmas, P. D. et al., 1990; Deftos, L. J. 1991; Demisux, B. et al., 1992 y Hanson, D.A. et al., 1992).

Debido a que el hueso es rico en FA, su determinación se ha utilizado como marcador de la formación osteoblástica, a pesar de considerarse el menos sensible y específico de los marcadores bioquímicos. Un aumento significativo en los niveles séricos de FA se presenta en los pacientes con osteodistrofia renal, hiperparatiroidismo primario y secundario, hipertiroidismo, cáncer óseo, osteomalacia y durante el restablecimiento de fracturas óseas. A pesar de ello y debido a que en algunos casos este aumento es ligero, el apoyo que puede dar a la interpretación clínica es relativamente escaso (Deftos, L. J., 1991). Actualmente, la determinación de la isoenzima de FA resulta ser un mejor indicador del origen del aumento de FA en sangre. Sin embargo, los ensayos relativamente nuevos para medir la concentración de la isoenzima de FA no han permitido comparar su utilidad con otros marcadores de formación ósea, como es la OC.

Teóricamente, la determinación de OC es un arma útil para evaluar la mineralización ósea y no parece tener las limitaciones que presenta la FA. La OC es un polipéptido de cadena sencilla con un peso molecular de 5800 daltones, con tres residuos de aminoácidos en las posiciones 17, 21 y 24, también conocido como ácido alfa-gamma-carboxi-glutámico (GLA), y es dependiente de la vitamina K. Estos residuos favorecen la unión de la proteína a la hidroxiapatita y al calcio, principal constituyente de la fase mineral del osteoide. La OC es la proteína más abundante de tipo no colágeno que se sintetiza en los osteoblastos, y es un marcador específico de la formación y del remodelamiento óseo. Los niveles de OC se encuentran elevados en una variedad de enfermedades metabólicas. En la rata, la OC se elimina principalmente por filtración renal; se ha visto que su aumento en la sangre llega a ser hasta de 8 veces más cuatro horas después de la nefrectomía (Delmas, P. et al., 1983). Sin embargo, esto no significa que en los pacientes con función renal disminuida, el aumento en sangre se explica solo por la disminución de la filtración renal de este polipéptido, sino que también puede estar aumentada la actividad osteoblástica. El aumento en la concentración de OC correlaciona bien con el crecimiento longitudinal del hueso en el metacarpo y a nivel de la metafisis, posiblemente porque refleja un aumento de la actividad osteoblástica, proceso que ocurre durante la osificación endocondrial.

De los aminoácidos principales derivados de la degradación de la colágena, la hidroxiprolina (OHpr) y la hidroxilisina (OHi), se han utilizado como marcadores de la resorción ósea.

Cerca del 90% de la OHpr total que se metaboliza es filtrada y reabsorbida casi totalmente por los túbulos renales. A pesar de que la concentración de OHpr en la orina refleja principalmente el remodelamiento óseo, también representa del 5 al 10% de la excreción de proteínas de tipo no colágeno. En el plasma, la OHpr circula en varias formas: unida a proteínas, a péptidos y en forma libre. En enfermedades óseas caracterizadas por un aumento del desdoblamiento de la colágena, los cambios en la concentración de OHpr en orina y en sangre, se usan como indicadores bioquímicos de la actividad colagenolítica y por lo tanto, de la resorción ósea.

Los enlaces de la colágena tipo I, la piridinolina y la deoxipiridinolina son los productos estables que se originan al degradarse la colágena de tipo I. Estos enlaces están formados por fibrillas de colágena extracelular, que se encuentran estabilizando las cadenas de colágena. Su excreción en la orina se origina a partir del rompimiento de la matriz de colágena madura, y no a partir de la colágena de nueva formación. Se piensa que la deoxipiridinolina es específica de colágena de tipo I. La piridinolina y la deoxipiridinolina se excretan en dos formas en la orina: libre y unida a proteínas. La forma libre se puede medir directamente, mientras que la forma unida a las proteínas tiene que ser liberada por hidrólisis antes de ser analizada. La determinación de la concentración de los enlaces de piridinolina presenta varias ventajas con relación a la determinación de hidroxiprolina: estos compuestos son derivados de la colágena ósea exclusivamente, no son metabolizados previamente a su excreción en la orina, y su concentración no está influenciada por la absorción intestinal de la colágena de la dieta (por ejemplo, de la carne o de la gelatina) (Gerrits, M.I. et al., 1995).

1.3 CONTENIDO MINERAL Y DENSIDAD DE LA MASA ÓSEA POR DENSITOMETRIA. Para que las determinaciones bioquímicas del remodelamiento óseo tenga validéz clínica debe compararse con otras formas de medición directa de la formación y resorción ósea, como son el *contenido mineral óseo* (CMO) y la *densidad de la masa ósea* (DMO). La cuantificación de la masa ósea se realiza mediante la densitometría ósea (DO) conocida como densitometría de doble energía de rayos X (DEXA).

Debido a que la fuente de poder de los rayos X tiene un flujo de radiación de mayor alcance, este método tiene mejor precisión (aproximadamente 1%), mejora la resolución de la imagen (< 1 mm) y, los rastreos son más rápidos y en menor tiempo (5 a 10 veces) al compararse con la fuente de un solo poder (SPA) (Masses, R.B. et al., 1990). La dosis de radiación es menor debido a que el colimador está optimizado para medir el contraste del hueso.

La ventaja de esta tecnología, es que permite medir el contenido de calcio en la periferia del hueso, por regiones y en el cuerpo entero. Debido a la baja dosis de radiactividad, el corto tiempo de exposición y la alta precisión en la medición del contenido y la densidad ósea, esta técnica se está usando ampliamente en la investigación clínica, así como en el seguimiento a largo plazo en niños y adultos con enfermedades óseas metabólicas y en animales de experimentación (Sierra-Amor, R.I. 1992 y Griffin, M.G. et al., 1993) (Figura 3).

En el caso del hiperparatiroidismo secundario, enfermedad renal o mala absorción intestinal, la cuantificación del CMO y de la DMO es de gran utilidad (Johnston, C.C. et al., 1991).

El CMO se expresa en gramos y la DMO en unidades de masa corregidas por el área cuantificada (gramos/cm²).

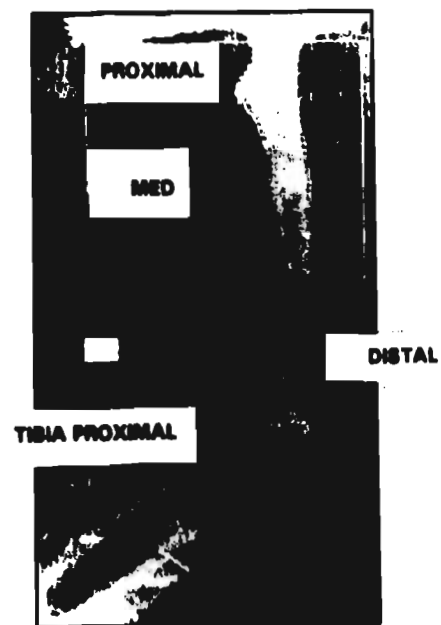


FIGURA 3. IMAGEN DEL FEMUR Y TIBIA PROXIMAL DE LA RATA MEDIANTE DENSITOMETRIA DE DOBLE FOTON DE RAYOS X (DEXA) (Griffin, M.G. et al., 1993).

1.4 SÍNDROME NEFROTICO (SN): El SN se caracteriza por la coexistencia de proteinuria, hipoproteinemia e hiperlipidemia (Figura 4). Algunos investigadores aceptan que la sola presencia de proteinuria mayor a 3.5 g/24 h/1.73 m² basta para establecer el diagnóstico de SN, ya que la hipoproteinemia solamente se presenta si la pérdida de proteínas por orina es desproporcionadamente mayor a la capacidad hepática para sintetizar albúmina (Amato, D. et al., 1993).

Clásicamente se ha considerado que la mayor parte de las manifestaciones del SN son secundarias a la hipoalbuminemia, y que ésta, a su vez, se debe a la albuminuria. La retención del sodio y agua y el edema se han considerado como una respuesta fisiológica normal a la contracción del volumen intravascular por la disminución de la presión oncótica (Santos-Atherton, D. 1982).

Se ha obtenido evidencia de que la retención de sodio puede presentarse antes de que se inicie la proteinuria (Pedraza-Chaverrí, J. et al., 1990), y de que la hipoalbuminemia no necesariamente se debe a la pérdida de la albúmina por la orina (Olbricht, C. J. et al., 1987). El mecanismo que explica la proteinuria está mediado por los factores que determinan el paso de las moléculas por la barrera de filtración, los cuales son: el tamaño, la deformabilidad, la carga eléctrica, y la configuración molecular, así como la hemodinámica glomerular.

En el SN existe un aumento en la permeabilidad al paso de macromoléculas cuyo mecanismo no está dilucidado. La lesión renal característica del SN idiopático es la fusión de los procesos podocíticos, la cual parece deberse a la pérdida de la carga negativa de su superficie.

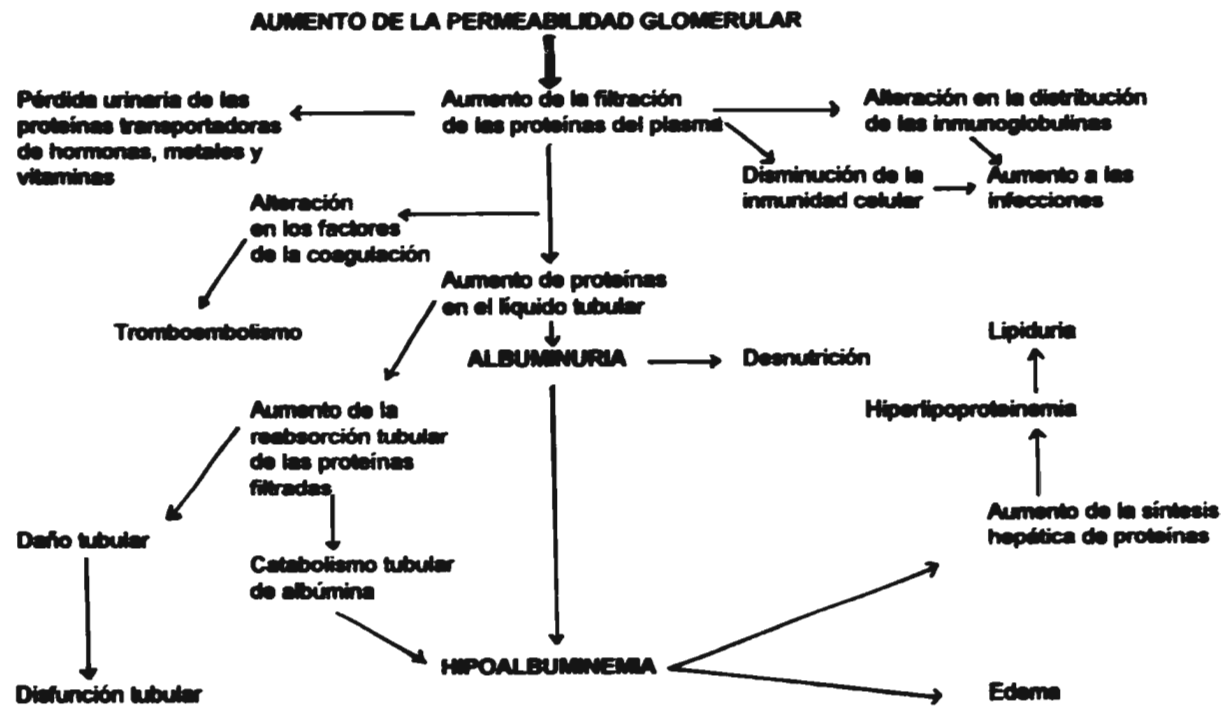


FIGURA 4 PATOFISIOLOGIA DEL SINDROME NEFROTICO (Bernard, D.B. 1988).

Lo anterior se apoya en el hecho de que administración de policationes al riñón produce proteinuria y fusión de podocitos (Hunsicker, L. G. et al., 1981).

En el SN, sólo una fracción de las proteínas filtradas aparece en la orina, el resto se reabsorben y metabolizan en el túbulo proximal (Olbricht, C. J. et al, 1987; Ketz, J. et al, 1964). Esto produce pérdida de proteínas del espacio intravascular mucho mayor que la esperada por la magnitud de la proteinuria. El resultado es un incremento importante en el catabolismo de las proteínas que la síntesis hepática no alcanza a compensar (Yamauchi, A. et al, 1988), lo que trae como consecuencia la hipoalbuminemia.

En el SN están elevadas prácticamente todas las fracciones de lípidos y lipoproteínas séricas, incluyendo el colesterol y todas sus fracciones (total, libre y esterificado). La causa principal de la hiperlipoproteinemia en el SN humano parece ser el aumento de la síntesis hepática de proteínas, entre ellas las lipoproteínas, en respuesta a la disminución de la presión oncótica causada por la hipoalbuminemia (Appel, G.B. et al, 1985). Otro factor que contribuye a la hipercolesterolemia del SN es el aumento en la síntesis de colesterol inducido por la elevación del ácido mevalónico, que a su vez se debe a la disminución en su catabolismo renal (Golper, T. A. y Schwart, S.H. 1982).

En los niños, la frecuencia y distribución de la lesión es diferente a la de los adultos (Ponticelli, C. y Passerine, P., 1991). En ellos se presentan más comúnmente el SN de cambios mínimos (SNCM), que es la segunda causa más frecuente de enfermedad del parénquima renal en niños menores de 15 años (Tabla 1).

	INCIDENCIA RELATIVA (%)	
	NIÑOS	ADULTOS
<i>Síndrome nefrótico primario</i>	79	24
Síndrome nefrótico de cambios mínimos (SNCM)		
SNCM con depósitos de IgM		
Hiperplasia mesangial		
Glomerulonefritis segmental focal (GSF)		
<i>Síndrome nefrótico asociado con</i>		
Glomerulopatía idiopática	13	52
Glomerulonefritis membranosa		
Glomerulonefritis membrana-proliferativa		
Glomerulonefritis proliferativa		
Otras		
<i>Glomerulopatía secundaria</i>	7	24
Lupus eritematoso sistémico		
Diabetes Mellitus		
Amiloidosis		
Otros		
<i>Otras enfermedades</i>	<1	<1
Síndrome nefrótico congénito		
Esclerosis mesangial difusa		
Otros		

TABLA 1. ALGUNAS CAUSAS DE SÍNDROME NEFRÓTICO Y SU FRECUENCIA EN POBLACIONES PEDIÁTRICA Y ADULTA (Schneper, H. y Robson, A.M., 1993).

1.5 SN EXPERIMENTAL. El SN se indujo experimentalmente con la potente droga nefrotóxica aminonucleósido de puromicina (ANP) (Pedraza-Chaverri, J. et al., 1990; Sierra Amor, R.I. 1992; Cruz, C. et al., 1994; Pedraza-Chaverri, J. et al., 1996), cuyo nombre genérico es la 6-dimetil-aminopurina, 3-amino-d-ribosa. La puromicina es un antibiótico que se obtiene a partir del "*Actinomyces albonigers*", compuesto del cual se deriva el aminonucleósido (Fiegelson, E.B. et al., 1957).

En la rata, la enfermedad que se presenta al inducir el SN con ANP es muy similar a la que ocurre en el ser humano, por lo que es un modelo ideal para estudiar las alteraciones metabólicas y óseas que se presentan en este síndrome.

Se sabe también que el ANP puede producir daño renal crónico (Frenk, S. et al., 1955; Borowsky, B.A. et al., 1961; Diamond, J.R. y Karknovsky, M.J. 1986). El daño renal ocurre una vez que el ANP es administrado por inyección intravenosa, o recidivar una vez que se administra nuevamente la dosis.

Otros investigadores, utilizaron dos series de inyecciones del ANP demostrando que la lesión glomerular es progresiva e irreversible (Feldman, J.D. y Fisher, E.R. 1961).

ANTECEDENTES

Hasta hace algunos años, las alteraciones del metabolismo mineral en el SN se atribuían principalmente a la deficiencia de vitamina D como consecuencia de la hipoalbuminemia (Goldstein, D.A. et al., 1977; Barragry, J.M. et al., 1977; Schmidt-Gayk, H. et al., 1977; Malluche, H.H. et al., 1979 y Goldstein, D.A. et al., 1981). Sin embargo, se ha demostrado que el calcio ionizado o libre también se encuentra disminuido y regresa a sus niveles basales al corregirse el defecto (Lim, P. et al., 1976; Goldstein, D.A. et al., 1977 y Sierra-Amor, R.I. 1992).

Se ha postulado también que la absorción intestinal de calcio se encuentra disminuída (Lim, P. et al., 1977 y Goldstein, D.A. et al., 1981) y esto conduce al aumento brusco de la hormona paratiroidea (PTH) en sangre, a hiperfunción de las glándulas paratiroides y por consiguiente a hiperparatiroidismo secundario y osteomalacia (Malluche, H.H. et al., 1979). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la absorción intestinal de calcio en el SN no disminuye, lo que se encuentra disminuída es la concentración de la proteína transportadora de vitamina D, la cual se pierde por orina substancialmente, y ésta es la causa principal de deficiencia de vitamina D en sangre en el SN (Khamiseh, G. et al., 1991).

La vitamina D y sus metabolitos circulan en el plasma unidos a una proteína conocida como "proteína transportadora de vitamina D (PT-D)" con un peso molecular de 65 kdaltones. En el SN, esta proteína se excreta por la orina, y por consiguiente, los metabolitos de la vitamina D (Haddad, J.C. y Walgate, J. 1976; Barragry, J.M. et al., 1977; Schmidt-Gayk, H. et al., 1977 y Koenig, K.G. et al., 1992).

La pérdida de 25-hidroxivitamina D (25-OHD) por la orina, ejerce un efecto directo sobre la disminución del metabolito biológicamente activo de la vitamina D, la 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D]. Esta deficiencia puede deberse a la falta de sustrato o a un defecto en la hidroxilación de 1,25(OH)₂D en el túbulo renal, a pesar del aumento de PTH en sangre, la cual, en condiciones normales, estimula la producción de la 1-alfa-25-hidroxilasa renal. En estudios recientes se ha demostrado que la velocidad máxima (V_{max}) de esta enzima disminuye en ratas con SN inducido con ANP (Mizokuchi, M. et al., 1992), lo que sugiere que las alteraciones del metabolismo del calcio y la vitamina D en el SN se pueden atribuir principalmente a dos mecanismos: la pérdida por orina de los metabolitos de la vitamina D y a un defecto en la hidroxilación de 25-OHD a nivel del túbulo renal. Por esta razón, la concentración de 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D], también se encuentra disminuida, a pesar de que se especula que la fracción libre (no unida a la PT-D) es la que represente mejor la acción biológica de esta hormona (Auwerx, J. et al., 1986). Aunque la mayoría de los estudios han demostrado que los niveles circulantes de 25-OHD están bajos en el SN, no es así con respecto a 1,25(OH)₂D; ésto se ha atribuido en parte, a que los métodos para medir este metabolito, detectan tanto la fracción libre como la unida a albúmina y, es por ello que resulta difícil llegar a una conclusión definitiva, sobre todo si son los niveles de 1,25(OH)₂D libre los que tienen importancia fisiológica y se han encontrado en concentraciones normales (Auwerx, J. et al., 1986; Koenig, K.G. et al., 1992), ó aumentados en pacientes con SN (Koenig, K.G. et al., 1992), a pesar del aumento en la excreción de PT-D por la orina.

Por otro lado, la administración de sustrato (25-OHD) a ratas nefróticas, aumenta la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, lo que sugiere que la disminución en sangre de este metabolito se debe en parte, a la baja concentración de sustrato (Mizokuchi, A. et al., 1991). Lo anterior está de acuerdo con el trabajo de otros investigadores, en donde los pacientes recibieron tratamiento con 25-OHD, y observaron un aumento en la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en los pacientes con filtración glomerular normal (Haldimann, B. y Trechsel, U. 1983).

El consenso general sobre el efecto que las alteraciones del metabolismo del calcio, vitamina D y PTH tienen en el esqueleto humano en este padecimiento no son del todo claras. Se han informado de casos de osteomalacia e hiperparatiroidismo en los niños con SN (Malluche, H.H. et al., 1979; Tessitore, N. et al., 1984; Freundlinch, M. et al., 1985 y Alon, U. y Chan, J.C.M. 1983). En 1945, mediante la técnica de rayos X, se observó descalcificación generalizada en pacientes con SN (Emerson, K. y Beckman, W. W. 1945) y osteoporosis (Jones, J.H. et al., 1967) en el esqueleto de estos pacientes. En niños con SN después de un mes de evolución, se han descrito la presencia de fracturas óseas, y en algunos otros raquitismo, durante el primer año de vida (Stickler, G.B. et al., 1960). En este estudio, una de cada 7 biopsias de hueso de pacientes con SN revelaron osteoporosis ligera (Lim, P. et al., 1977). Otros investigadores encontraron evidencias de osteomalacia y de mineralización defectuosa del osteoide en 6 pacientes estudiados con SN (Malluche, H.H. et al., 1979), y en otros casos, no se mostró ninguna alteración histológica (Korkor, A. et al., 1983).

En ratas con SN inducido con suero nefrotóxico no se encontró diferencia en la densidad ósea, en el contenido de calcio y fósforo del fémur, en la histomorfometría ósea de la metáfisis de la tibia, ni tampoco se observó osteomalacia después de 8 semanas de evolución de la enfermedad (Chan, Y-K. et al., 1983).

La proteinuria masiva, característica del SN, así como la disminución en sangre de los metabolitos de la vitamina D, ejercen un efecto importante sobre la concentración de calcio ionizado o libre, sobre el aumento de los niveles de PTH y sobre la reabsorción de calcio por el túbulo renal. Por consiguiente, la disminución de los metabolitos de la vitamina D y el aumento de PTH originan cambios en la estructura ósea. Una vez que la fase aguda ha pasado, las alteraciones del metabolismo del calcio se normalizan casi en su totalidad (Sierra-Amor, R.I. 1992).

Se ha visto que, en humanos con SN, el tratamiento con una sola dosis de 25-OHD, metabolito precursor de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, restablece los niveles de éste en la circulación sanguínea en un lapso de 48 horas (Haldimann, B y Trechsel, U. 1983). En otros casos, se ha encontrado que la concentración de calcio ionizado o libre afecta la concentración de PTH (Korkor, A. et al., 1983; Lambert, P.W. et al., 1982).

Cabe mencionar que otros factores pudieran estar relacionados con el curso de la enfermedad, como son la edad, la duración del padecimiento, el tratamiento con corticosteroides, el deterioro de la función renal y la concentración de albúmina en la orina (Alon, U. y Chan, J.C.M. 1983).

En el modelo experimental de SN agudo en la rata, posterior a la inyección de una dosis única de ANP (Sierra Amor, R.I. 1992), se presentó el cuadro clásico de las alteraciones metabólicas características de este síndrome: proteinuria, hipoproteinemia, hipocalcemia e hipercolesterolemia. Lo anterior desencadenó un desequilibrio en la homeostasis mineral y, del sistema endocrino que regula este mecanismo. El aumento de PTH en sangre, dio origen a hiperparatiroidismo secundario. Por consiguiente, el efecto resortivo de esta hormona desmineralizó el osteoide, como se mostró a través de la disminución del CMO (Sierra Amor, R. I., 1992). Por otro lado, el aumento de PTH no estimuló la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. En este caso, la deficiencia de sustrato (25-OHD) pudo ser la causa principal, aunque se especula también que pueda deberse a una alteración enzimática, esto es, a que la 1,25 hidroxilasa renal se encuentre disminuida (Mizokuchi, M. et al., 1992). La excreción urinaria de OHpr aumentó al degradarse la colágena ósea. La actividad osteoblástica (OC) también aumentó el día 7 del estudio; este aumento se debió tanto a la disminución de la filtración de esta proteína por el riñón, como a un aumento de la actividad osteoblástica (Sierra Amor, R.I., 1992). En base a estas observaciones, el desarrollo de un modelo experimental de SN crónico resulta ser *ad hoc* para estudiar las alteraciones del metabolismo mineral y su efecto en hueso.

Actualmente no se conoce si las alteraciones que se presentan en el SN posterior a una segunda y tercera dosis de ANP, ejercen también efecto resortivo sobre el hueso, y si la magnitud del cambio es reversible una vez que se restablecen las condiciones basales.

Este modelo podría ser utilizado para estudiar el posible efecto benéfico de estimuladores del remodelamiento óseo.

HIPOTESIS

La serie de alteraciones metabólicas que se presentan durante el SN crónico tienen como consecuencia un cambio en el remodelamiento bioquímico del esqueleto, y por lo tanto dan lugar a una disminución del contenido mineral y al deterioro de la masa ósea.

4

OBJETIVO

Estudiar las posibles alteraciones del metabolismo óseo en ratas con SN experimental crónico y con depuración de creatinina normal y evaluar si las alteraciones encontradas son reversibles.

El metabolismo óseo se estudiará determinando:

- 1) Los marcadores bioquímicos de formación ósea (osteocalcina y fosfatasa alcalina).
- 2) Los marcadores bioquímicos de reabsorción ósea (hidroxiprolina y los enlaces de piridinolina).
- 3) El contenido mineral óseo mediante densitometría de doble fotón de energía de rayos X.
- 4) La densidad de la masa ósea mediante densitometría de doble fotón de energía de rayos X.

5 MATERIAL Y METODOS

5.1 ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

En este protocolo se usaron ratas Wistar macho de 200 a 250 gramos de peso, las cuales se alimentaron con una dieta estándar (Purina chow) y agua *ad libitum*.

Se utilizaron 96 ratas, 48 controles y 48 con SN. El SN crónico se indujo con tres inyecciones subcutáneas de ANP al 2% disuelto en solución salina al 0.9%. El día 0 la dosis fue de 10 mg/100 g y los días 21 y 35 fue de 5 mg/100 g (Borowsky, B. et al., 1961). Los grupos de ratas pareadas por peso, se colocaron en jaulas metabólicas cada semana del estudio para recolectar la orina de 24 horas. El día del sacrificio, una vez recolectada la orina en frasco de poliestireno, las ratas se anestesiaron con éter y su sangre se obtuvo por punción cardíaca. Las ratas se sacrificaron los días 0,7,14,28,42,56,84 y 112 del estudio. El suero se obtuvo por centrifugación a 4°C y se congeló a -70°C hasta la realización de las determinaciones. La muestra de orina se centrifugó a temperatura ambiente por 15 minutos a 2500 rpm. Una vez centrifugada, la muestra de orina se decantó en un tubo cónico graduado en mL para medir el volumen. Una alícuota de la orina se congeló a -20°C para realizar las determinaciones analíticas. Los fémures se disecaron y se colocaron en frascos con agua bidestilada, manteniéndose a temperatura ambiente hasta la determinación del contenido mineral óseo (CMO) y densidad mineral ósea (DMO).

En suero y orina, se determinaron proteínas totales (PT), fósforo (P), creatinina (Cr) y calcio (Ca). En suero, se determinaron el calcio ionizado (libre) (Ca_i), la fosfatasa alcalina (FA), la osteocalcina (OC), la molécula intacta de hormona paratiroidea (PTH) y los metabolitos de la vitamina D [25-OHD y 1,25(OH)₂D]. En orina se determinó la hidroxiprolina total (OHpr), y los enlaces de piridinoline libre.

El contenido mineral óseo (CMO) y la densidad de la masa ósea (DMO) se determinaron en los fémures de las ratas control y con SN mediante densitometría ósea (DO) de doble fotón utilizando un densitómetro Hologic QDR-1000 y empleando un programa de alta resolución para medir estos parámetros en animales de experimentación.

5.2 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.

5.2.1 Absorción Atómica.

5.2.1.1 Calcio: (Manual del espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, Modelo 3030). La determinación de calcio (Ca) total en suero y en orina se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, Modelo 3030. El suero y la orina se diluyeron 1:100 con cloruro de lantano al 1%, para evitar interferencias por la presencia de proteínas o aniones en la muestra. Se empleó una lámpara catódica e una longitud de onda de 422.7 nm. La curva estándar se preparó con las siguientes concentraciones de carbonato de calcio: 5, 10, 15 mg/dL.

5.2.2 Análisis colorimétricos.

5.2.2.1 Creatinina: (Jaffé, J. 1966). La determinación de creatinina (Cr) en suero y en orina se realizó en un autoanalizador Abbott, V.P Super System. La Cr presente en la muestra se combina con el ácido pícrico en presencia de iones hidroxilo, formando un complejo rojizo. Las muestras de suero u orina (0.1 mL) se colocan en una celdilla de plástico de 0.5 mL de capacidad en la unidad de transporte. Las muestras de orina se diluyen 1:20 con agua bidestilada. El autoanalizador está programado para determinar Cr utilizando la reacción de punto final. Automáticamente se agregan a las correspondientes celdillas de reacción, un blanco de agua, tres concentraciones del estándar de Cr (2, 6 y 8 mg/dL), dos controles externos (alto y bajo) y las muestras; inmediatamente después el reactivo de Cr. Las lecturas de las absorbencias correspondientes a las muestras analizadas en suero u orina se reportan en mg/dL o mg/vol, respectivamente.

La filtración glomerular (FG) se calculó en base a la depuración de Cr usando la siguiente fórmula:

Depuración de Cr: $\frac{\text{Creatinina urinaria (mg/dL)} \times \text{Flujo urinario (mL/min)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dL)}}$

Flujo urinario: $\frac{\text{Volumen urinario de 24 h (mL)}}{1440 \text{ min}}$

5.2.2.2 Fósforo: (Chen, P.S. Jr. y Toribara, H.W. 1956). La determinación de fósforo (P) en suero y en orina se llevó a cabo en un autoanalizador Abbott V.P. Super System. El P inorgánico presente en los líquidos corporales, forma fosfomolibdato con el molibdato de sodio. Por reducción del ácido ascórbico, el fosfomolibdato se transforma en azul de molibdeno coloidal, que se mide espectrofotométricamente. Las muestras de suero u orina (0.1 mL) se colocan en celdillas de plástico de 0.5 mL de capacidad en la unidad de transporte. Las muestras de orina se diluyen 1:20 con agua bidestilada. El autoanalizador está programado para determinar P por la reacción de punto final. Se pipetea un blanco de agua, tres concentraciones del estándar de P (4, 6 y 10 mg/dL), cuatro controles externos (dos altos, un normal y un bajo) en la celdilla de reacción. El reactivo de P se agrega a continuación automáticamente. Las lecturas de las absorbencias correspondientes a las muestras analizadas en suero u orina se reportan en mg/dL o mg/vol respectivamente.

5.2.2.3 Hidroxiprolina: (Pridenphan, J. et al., 1984). La determinación de hidroxiprolina (OHpr) se llevó a cabo en orina de 24 horas. La muestra se somete a hidrólisis con hidróxido de bario; el complejo formado es oxidado a pirrol por acción de la cloramina T, y posteriormente se une al p-dimetilaminobenzaldehído. La interferencia por cromóforos se elimina mediante una reacción ácido-base con subsecuente precipitación del complejo insoluble. La OHpr se extrae con tolueno y ácido clorhídrico. La muestra se centrifuga inmediatamente para obtener la correcta separación de las fases orgánica y acuosa.

Las absorbencias de las muestras se calculan contra una curva estándar con concentraciones de OHpr de 6, 12.5, 25, 50 y 100 mg/L.

5.2.2.4 Proteínas totales: (Lowry, O.A. et al., 1951). Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con los iones de Cu (II) en solución alcalina y, en un segundo paso, el reactivo fosfomolibdato fosfotúngstico es reducido. La absorbencia del color desarrollado se mide espectrofotométricamente a 540 nm. La curva estándar se prepara con las siguientes concentraciones de albúmina sérica bovina: 5, 10, 15, 25, 35 y 50 $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$.

5.2.3 Análisis cromatográficos.

5.2.3.1 Vitamina D (25-OHD): (Horst, R.L. et al., 1990). La 25-OHD se determinó en suero por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La muestra (0.5 mL) se extrae con acetonitrilo (0.5 mL) y se centrifuga a 2500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se equilibra con 0.5 mL de amortiguador de fosfatos (pH 10.5) durante 10 minutos. La muestra se agrega inmediatamente a cartuchos de sílice C-18 (Millipore/Waters de E.U.) previamente activados (metanol y agua al 70%) y se extrae con 3 mL de acetonitrilo. La muestra se evapora en un baño de agua a 50°C y bajo atmósfera de nitrógeno (N_2); posteriormente se reconstituye con 1.5 mL de diclorometano y se agrega a cartuchos de sílice (Si) previamente activados (metanol y agua al 70%) donde se separa de acuerdo a su polaridad por elución mediante solventes orgánicos (hexano:isopropanol:diclorometano). Para ello, se utiliza un sistema de separación al vacío (Vac-Elut-System de Varian) a 20 psi.

La muestra recolectada se lleva a sequedad nuevamente y se reconstituye en 0.155 mL de hexano:diclorometano:isopropanol (50:50:1.5); se inyecta en el cromatógrafo y se separa de acuerdo a su polaridad en una columna de sílice (0.5 μ m, 15 x 25 mm). La concentración de 25-OHD, se calcula contra un estándar de vitamina D (25-OHD₃) (BIOMOL Laboratories, E.U.) con una concentración de 16 ng y con un tiempo de retención (RT) de 0.65/área. Una vez inyectada la muestra se colecta automáticamente en un colector de fracciones (Isco Laboratories, E.U.), se lleva a sequedad bajo atmósfera de N₂ y se le agregan 5 mL de líquido de centelleo (Fisher, Co. E.U.) para contarse en un contador de radiaciones beta (Packard Co. E.U.) por 10 minutos. La concentración final de 25-OHD se calcula con respecto al estándar (área) y se corrige por la recuperación porcentual de la misma.

5.2.4 Análisis enzimáticos e inmunoenzimáticos.

5.2.4.1 Fosfatasa alcalina (Tietz, N.W. 1994). La determinación de fosfatasa alcalina (FA) en suero se llevó a cabo en un autoanalizador Abbott, V.P. Super System. Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. Para determinar la FA se utiliza como sustrato el p-nitrofenilfosfato. La variación observada en el valor de extinción por unidad de tiempo es proporcional a la velocidad de transformación del sustrato y por lo tanto, a la actividad enzimática. La muestra de suero (0.1 mL) se coloca en celdillas de plástico de 0.5 mL de capacidad en la unidad de transporte. El autoanalizador está programado para determinar la concentración de FA por la reacción de punto final.

Automáticamente se agregan a las celdillas de plástico de 0.5 mL de capacidad en la unidad de transporte, un blanco de agua, dos concentraciones del estándar de FA (100 y 500 UI/L), dos controles externos (alto y bajo) y las muestras.

5.2.4.2 Enlaces de piridinolina en orina: (Manual de Metra Biosystems, Inc. Mountain View, CA. E.U.). La determinación de los enlaces de piridinolina libre se efectúa por análisis inmunoenzimático (ELISA). La reacción se lee en un lector de placa para ELISA (INCSTAR Co. Stillwater, MN, E.U.). La placa de ELISA está cubierta con anticuerpo monoclonal anti-piridinolina donde se agregan 0.050 mL de la muestra de orina diluida 1:10 con agua. La piridinolina presente en la muestra compete con el complejo de piridinolina-fosfatasa alcalina por el anticuerpo adherido a la placa; la reacción se detecta con el sustrato de para-nitrofenolfosfato que reacciona con la fosfatasa alcalina que está unida al anticuerpo. La reacción se detiene con NaOH. La curva estándar se construye con concentraciones de piridinolina de 0 a 300 nM. Los resultados se expresan como nM de piridinolina por mM de creatinina (nMP/mMCr).

5.2.5 Ion selectivo.

5.2.5.1 Calcio ionizado o libre: (Manual del Radiometer ICA, Radiometer Laboratories, Copenhague, Dinamarca). El calcio ionizado o libre (Cai) se determinó en suero (0.25 mL) utilizando un electrodo ion selectivo para Ca ionizado o libre. La muestra se debe mantener en atmósfera de CO₂ para evitar cambios en el pH de la muestra. El analizador de ión selectivo se calibra con un estándar de Cai comercial a una concentración de 5 mg/dL (1.25 mmol/L). La concentración de la muestra se corrige a pH 7.4, y se expresa como mg/dL.

5.2.6 Radioinmunoanálisis.

5.2.6.1 Osteocalcina: (Gundberg, C.M. et al., 1985). La osteocalcina (OC), también conocida como proteína GLA, se determinó en suero por radioinmunoanálisis (Biomedical Technologists Inc. E.U.). La muestra de suero se diluye (1:50) con amortiguador de fosfatos (pH 7.4) y se incuba con el antisuero (0.1 mL) a 4°C durante 18 horas en agitación constante. El antígeno radiactivo (^{125}I) se agrega y se incuba nuevamente a 4°C durante 18 horas en agitación constante. La separación del complejo formado se lleva a cabo utilizando un segundo antisuero diluido en amortiguador de fosfatos y en polietilenglicol (3%), posteriormente al cual se incuba el ensayo por 2 horas a 4°C en agitación constante y se centrifuga por 15 minutos a 2500 rpm y en frío. El precipitado se cuenta en un contador para radiaciones gamma (Multi-Prism 4, Packard Co. E.U.).

5.2.6.2 Hormona paratiroidea: (Calvo, M.S. et al., 1991). La determinación de hormona paratiroidea (PTH) en suero se realizó mediante el análisis inmunoradiométrico de doble anticuerpo (técnica del sandwich). Los antisueros, producidos en la cabra son específicos para la región N-terminal de la molécula (1-34) del suero de la rata. Uno de los antisueros se fija a esferas de poliestireno y el otro se marca con ^{125}I . La muestra problema se incuba simultáneamente con los dos antisueros. Los fragmentos amino y carboxilo terminal de la muestra son "fijados" por ambos antisueros y el exceso se elimina por medio de lavados con amortiguador de fosfatos. El complejo radiactivo unido a la esfera de poliestireno se cuenta en un contador para radiación gamma (Multi-Prism 4, Packard Co. E.U.).

5.2.6.3 Vitamina D [1,25(OH)₂D]: (Horst, R.L. et al., 1990). La 1,25(OH)₂D se determinó en suero por análisis de unión al receptor. La muestra (0.5 mL) se extrae con acetonitrilo (0.5 mL) y se centrifuga a 2500 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se equilibra con 0.5 mL de amortiguador de fosfatos (pH 10.5) durante 10 minutos. Inmediatamente se agrega a cartuchos de sílice C-18 (Millipore/Waters, E.U.) previamente activados (metanol y agua al 70%) y se extrae con 3 mL de acetonitrilo. La muestra se lleva a sequedad en un baño de agua a 50°C y bajo atmósfera de nitrógeno (N₂); posteriormente se reconstituye con 1.5 mL de diclorometano y se agrega a cartuchos de sílice (Si) previamente activados (metanol y agua al 70%) donde se separa por elusión de acuerdo a su polaridad mediante solventes orgánicos (hexanos:isopropanol:diclorometano). Para ello se utiliza un sistema de evaporación al vacío (Vac-Elut System, Varian E.U.) a 20 psi. La muestra recolectada se lleva a sequedad nuevamente y se reconstituye con 0.130 mL de etanol. A continuación, se pipetea 50 µL de la muestra y de los controles en tubos de ensayo, conjuntamente con un blanco de etanol y concentraciones seriadas del estándar (60, 15, 7.5, 4.0, 2.0 y 1.0 pg/50 µL); y por último, se adicionan 0.5 mL del receptor (timo de la cabra) para 1,25(OH)₂D. Los tubos se incuban en baño de agua a 20°C durante 1 hora y en la oscuridad. El complejo (unido/libre) se separa al adicionar 0.2 mL de la solución de carbón-dextrán. Al cabo de 20 minutos de incubación en hielo, los tubos se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos y a 4°C. El sobrenadante se decanta en frescos de poliestireno de 20 mL, con 5 mL de líquido de centelleo y se cuentan en un contador de radiación beta (Packard Co. E.U.).

5.2.7 Determinación del contenido mineral y de la densidad de la masa ósea: (Manual del densitómetro óseo Hologic QDR-1000) (Griffin, M.G. et al, 1993). El contenido mineral óseo (CMO) y la densidad de la masa ósea (DMO) se midieron en los fémures derechos de las ratas control y con SN crónico. Estas determinaciones se llevaron a cabo utilizando un densitómetro Hologic QDR-1000, que emplea un colimador integrado a un programa de alta resolución para animales de experimentación, el cual calcula el CMO en gramos y la DMO en gramos/cm².

Los fémures se disacaron y se colocaron en frascos de poliestireno con agua bidestilada hasta su determinación. La medición del CMO y de la DMO se realizó colocando el fémur en una caja Petri con agua, previa calibración del densitómetro contra un estándar sintético de tejido óseo. Cada medición se realizó 3 veces y el resultado final se expresó como el promedio de las lecturas para cada uno de los fémures analizados.

5.3 Análisis estadístico (Wallenstein, S. et al., 1980).

Todos los resultados se expresaron como promedio \pm la desviación estándar del número de animales. Los datos se analizaron empleando el método de análisis de varianza de dos factores (ANOVA). Las diferencias entre los grupos control y nefrótico se compararon entre sí y con sus respectivos basales.

6 RESULTADOS

Síndrome nefrótico: Las ratas correspondientes al grupo con SN desarrollaron proteinuria masiva ($p < 0.001$) (Figura 5), la cual se presentó a partir del día 7, con un pico máximo el día 28, disminuyó al día 84, pero al día 112 alcanzó valores comparables a los del día 28.

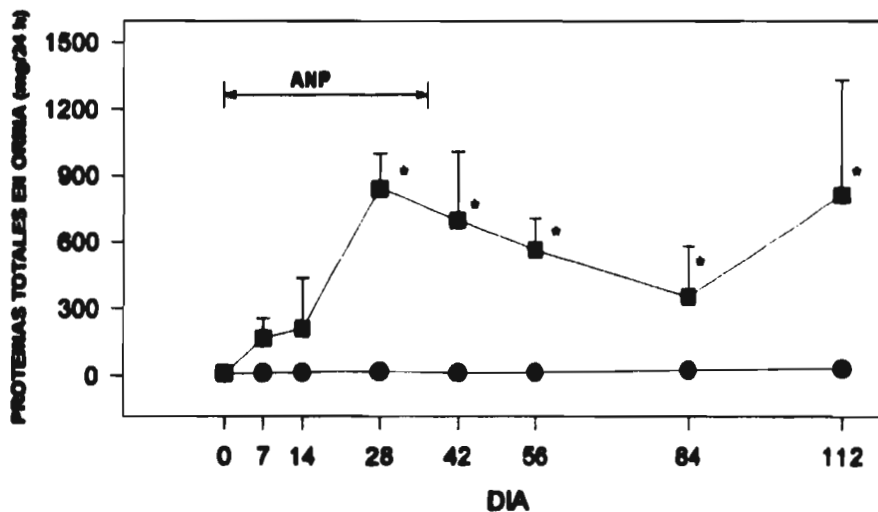


FIGURA 5 Proteínas totales en orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

La concentración de las proteínas del plasma disminuyó significativamente el día 7 del estudio; regresó a valores controlas el día 14 y disminuyó nuevamente el día 28 después de la segunda inyección de ANP; disminuyendo el día 42 al inducirse el SN nuevamente ($p < 0.001$). Las concentraciones de proteínas séricas regresan a concentraciones basales a partir del día 84 del estudio (Figura 6).

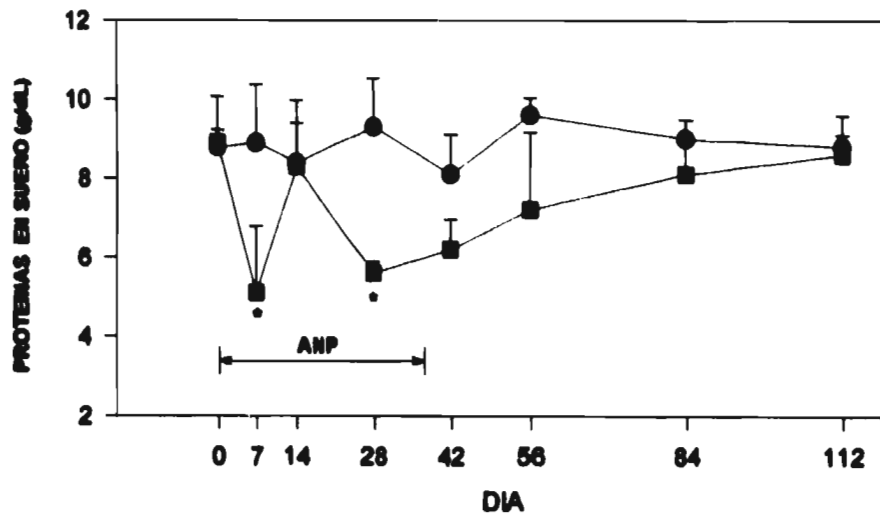


FIGURA 6 Proteínas en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

La hipercolesterolemia, característica de este síndrome, se presentó a partir del día 7 y hasta el día 56 ($p < 0.001$) (Figura 7).

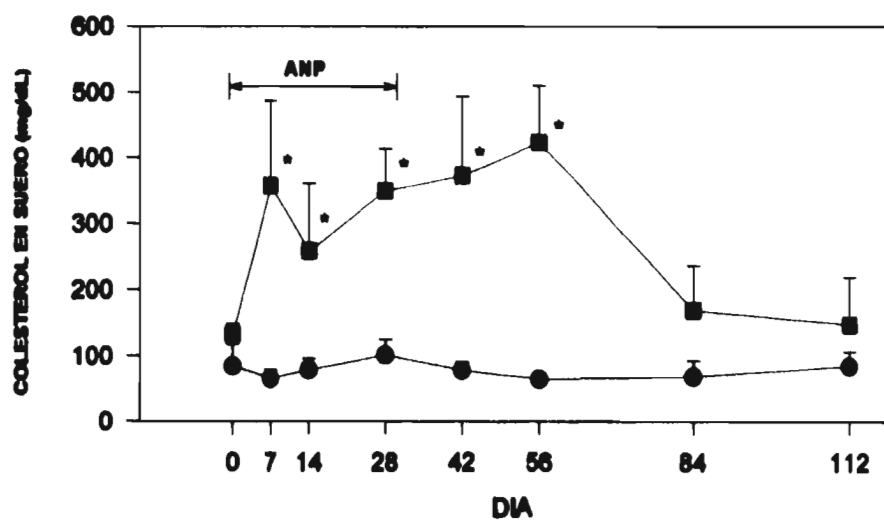


FIGURA 7 Colesterol en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

Hubo disminución significativa del peso corporal los días 56 y 84 del estudio en el grupo con SN ($p < 0.001$) (Figura 8). Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el consumo de alimento entre el grupo control y el grupo con SN crónico (Figura 9).

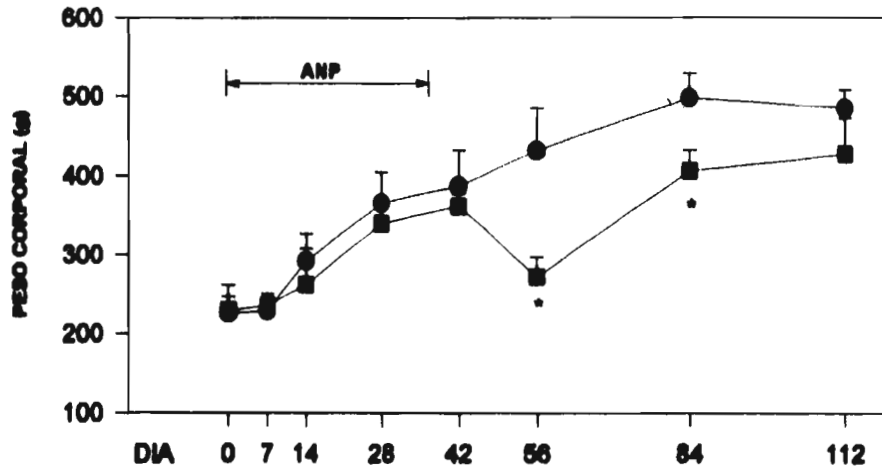


FIGURA 8 Peso corporal de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

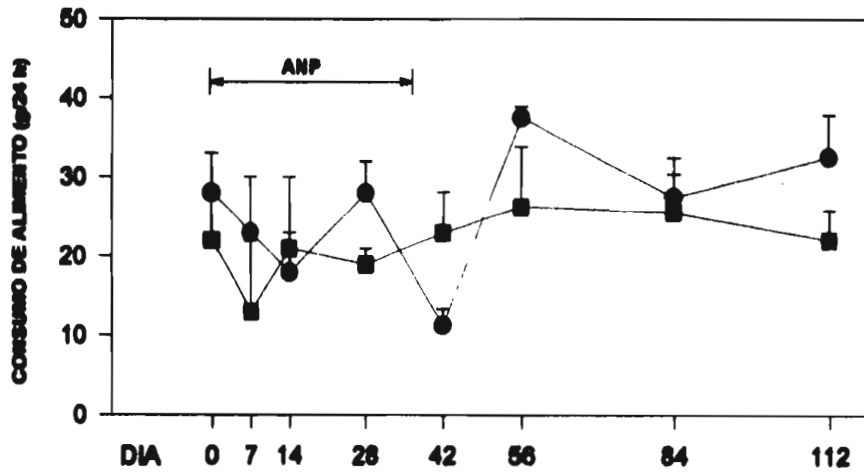


FIGURA 9 Consumo de alimento de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p = NS$).

El volumen de orina aumentó significativamente en el grupo con SN crónico los días 14, 28, 42, 56 y 84 del estudio ($p < 0.001$) (Figura 10). La concentración de nitrógeno de urea (BUN) en sangre aumentó solo significativamente al día 7 del estudio ($p < 0.001$) (Figura 11).

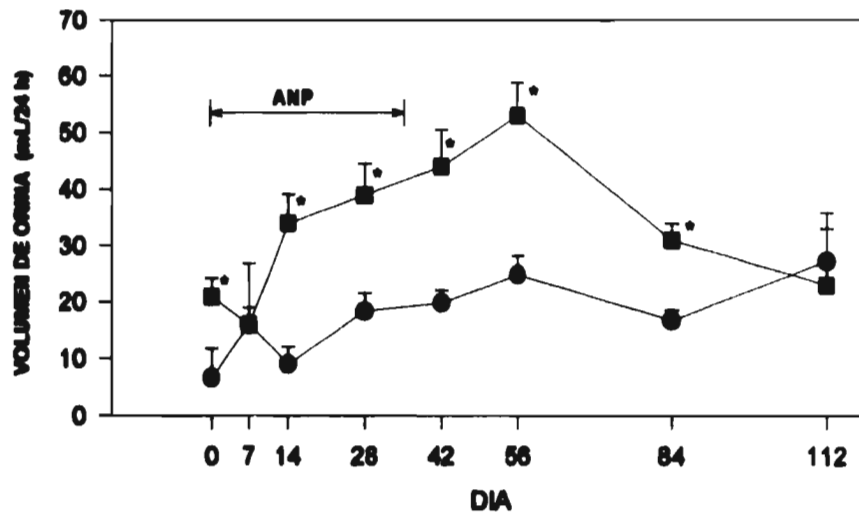


FIGURA 10 Volumen de orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

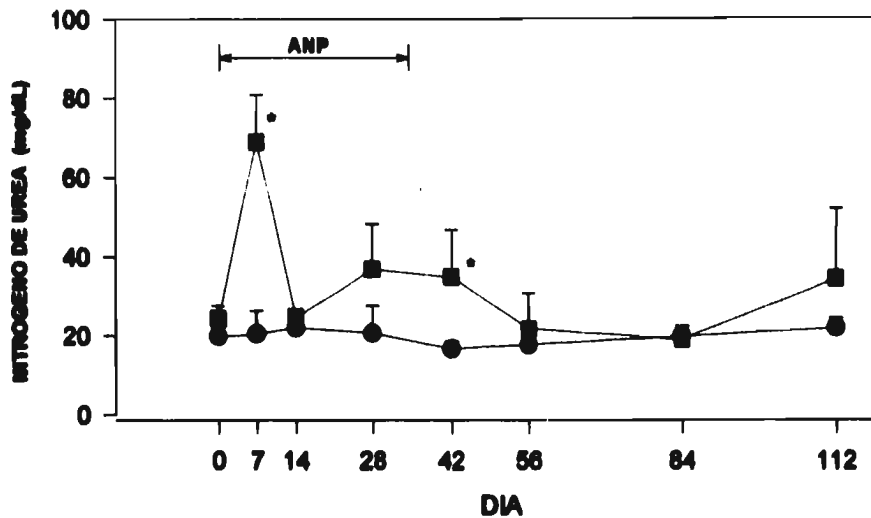


FIGURA 11 Nitrógeno de urea en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

Función renal: La función renal del grupo nefrótico vs el grupo control se calculó en base a la depuración de creatinina, la cual permitió conocer si la filtración glomerular era normal.

No se observó diferencia significativa en la concentración de creatinina sérica en los grupos control y con SN (Figura 12). Así mismo, la concentración de creatinina en orina tampoco fue diferente entre los grupos control y nefrótico (Figura 13).

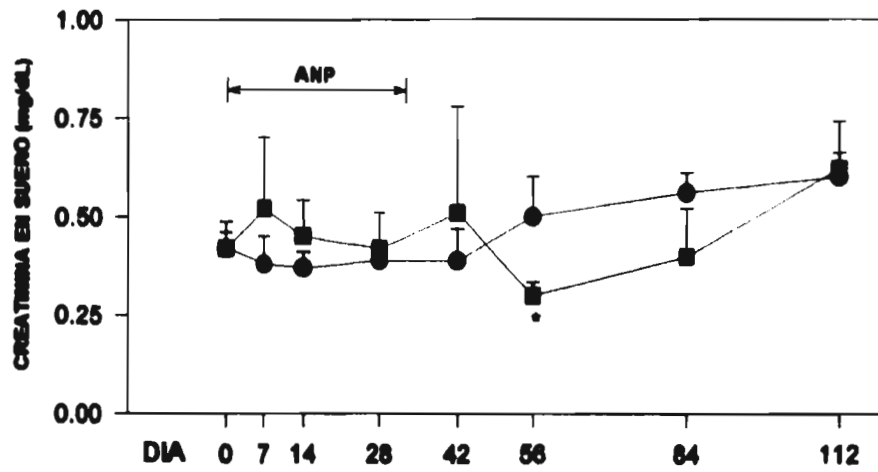


FIGURA 12 Creatinina en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio (p = NS).

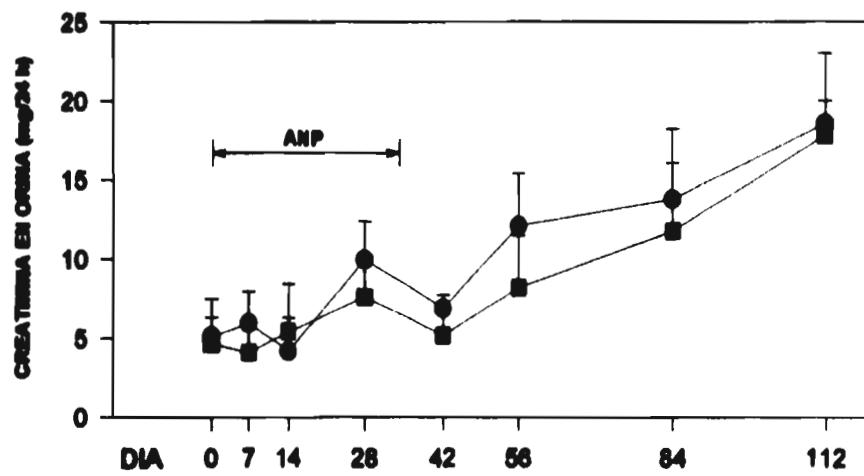


FIGURA 13 Creatinina en orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio (p = NS).

Por lo tanto, al calcularse la filtración glomerular del grupo con SN a través de la depuración de creatinina, ésta no fue significativamente diferente a la del grupo control (Figura 14).

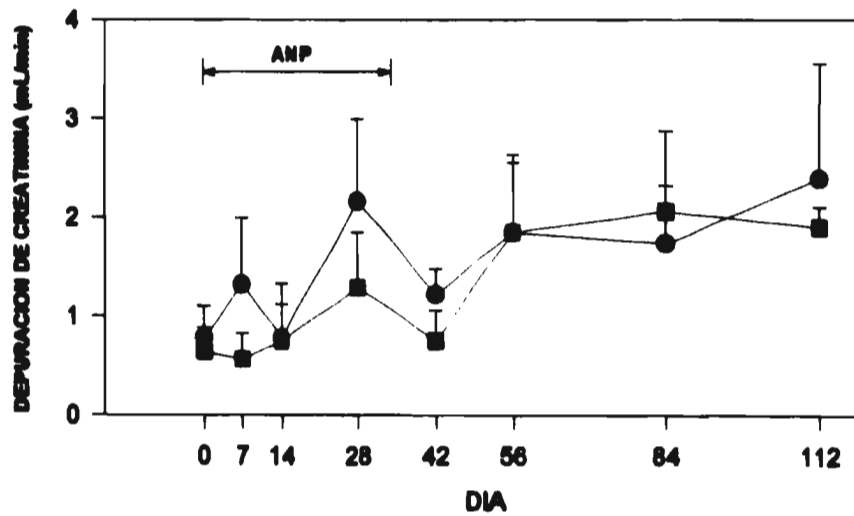


FIGURA 14 Depuración de creatinina en las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio (p = NS).

Metabolismo mineral: Las alteraciones del metabolismo mineral ocasionadas a partir de la excreción masiva de proteínas en la orina (principalmente albúmina), favorecieron la disminución de la concentración de calcio en sangre (calcio total) a partir del día 7 del estudio, sin llegar a alcanzar diferencias significativas entre los grupos control y con SN; sin embargo, después de la 2a y 3a inyección de ANP los días 21 y 35 del estudio, esta diferencia fue significativa los días 28 y 42 ($p < 0.001$) (Figura 15).

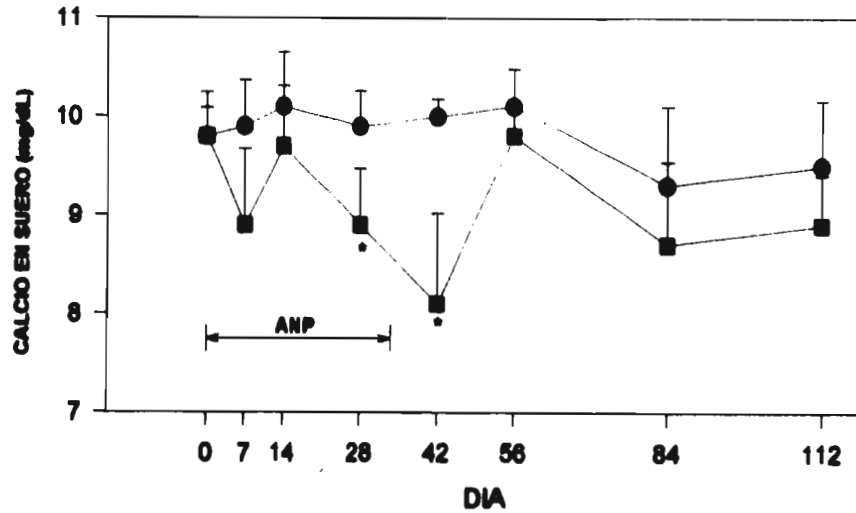


FIGURA 15 Calcio total en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

A pesar de no haber cambios en la excreción de calcio en orina durante los primeros 42 días del estudio, las ratas con SN presentaron un aumento significativo en su excreción al día 56 del estudio ($p < 0.001$) (Figura 16). La disminución de calcio total favoreció la disminución de la concentración de calcio ionizado (libre) los días 7, 28 y 42 ($p < 0.05$) del estudio en el grupo con SN (Figura 17).

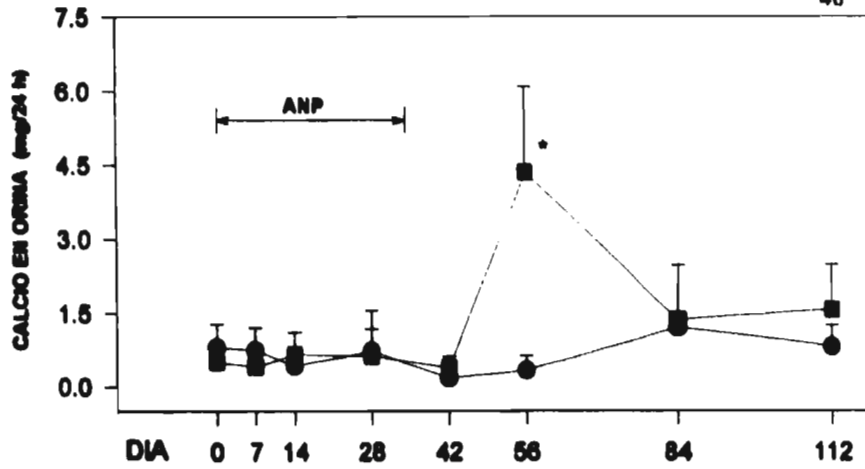


FIGURA 16 Calcio en orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

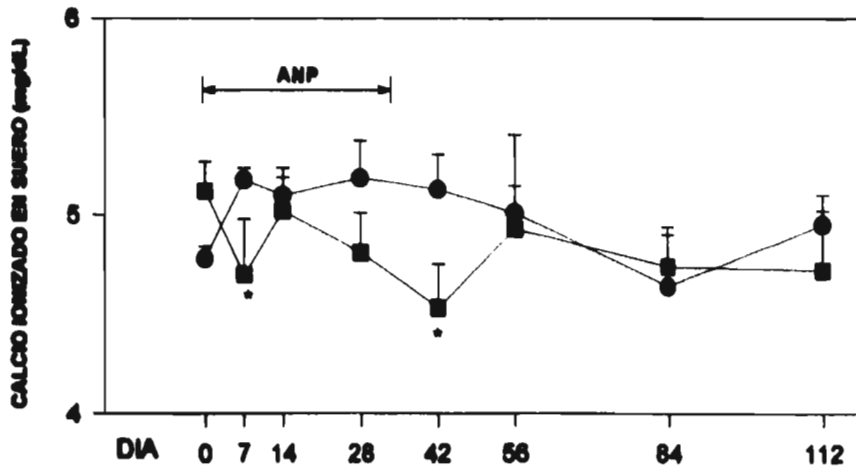


FIGURA 17 Calcio ionizado de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

La disminución de calcio (total y libre) estimuló el aumento de la concentración de hormona paratiroidea (PTH) en la circulación sanguínea, encontrándose éste aumento a partir del día 14 del estudio, y presentando un pico máximo en su concentración al día 42 del estudio, diferente del grupo control ($p < 0.05$). Al día 84 del padecimiento, los valores de PTH en sangre regresaron a sus valores basales (Figura 18).

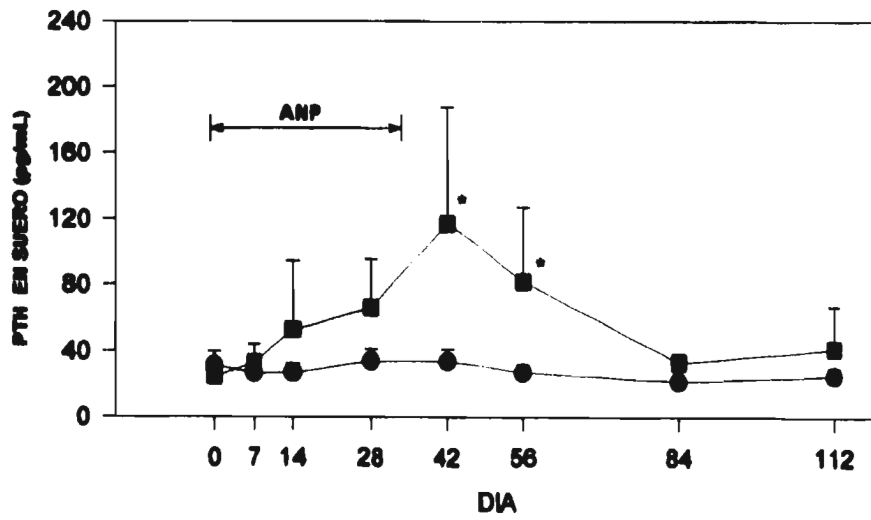


FIGURA 18 PTH en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

En condiciones normales, un aumento en la concentración de PTH favorece la excreción de fósforo por el túbulo renal. Sin embargo, en nuestro modelo de SN crónico, esta diferencia solo fue significativa entre los grupos control y con SN el día 42 del estudio (Figura 19).

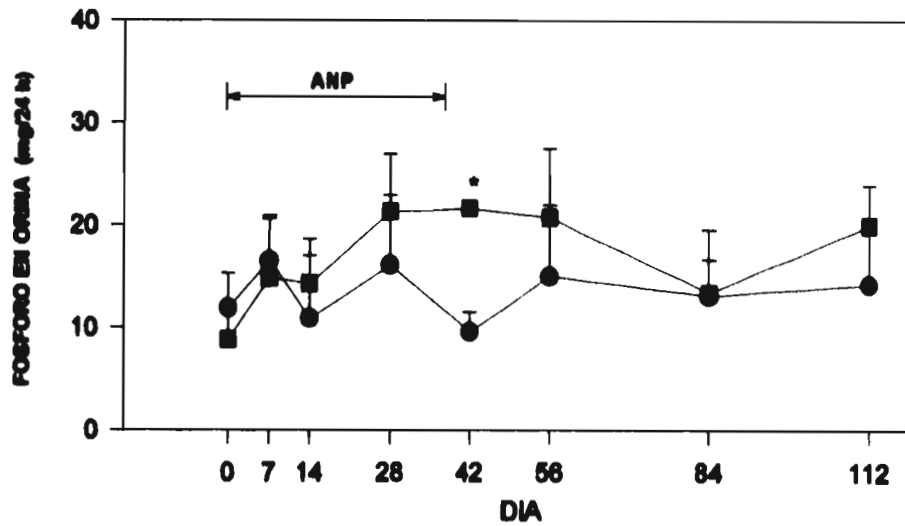


FIGURA 19 Fósforo en orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio (p=NS).

La concentración de fósforo en sangre fue diferente significativamente entre los grupos control y SN al día 56 del estudio ($p < 0.05$) (Figura 20). Así mismo, la concentración de 25-OHD disminuyó a partir del día 7 y hasta el día 84 del estudio ($p < 0.001$) (Figura 21). Por consiguiente, la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, metabolito biológicamente activo de la vitamina D, dependiente de la concentración de 25-OHD en sangre, disminuyó significativamente en el grupo con SN los días 28, 42 y 56 del estudio ($p < 0.05$) (Figura 22).

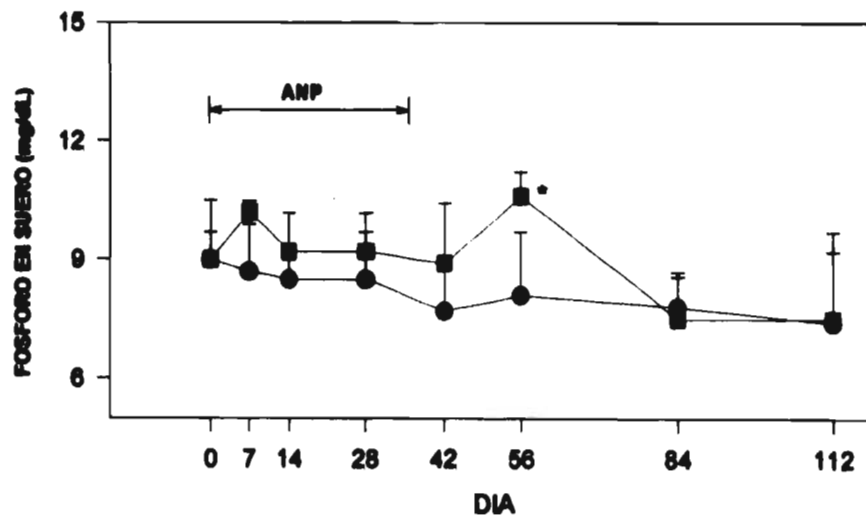


FIGURA 20 Fósforo en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

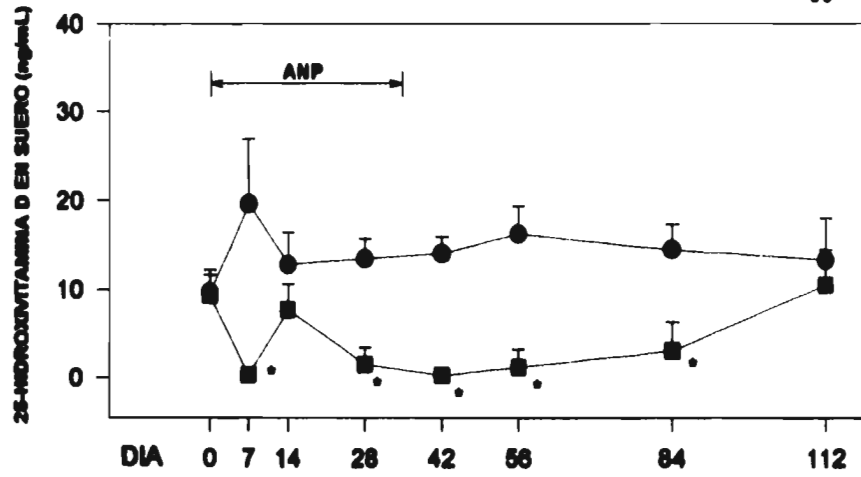


FIGURA 21 25-hidroxitamina D de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.001$).

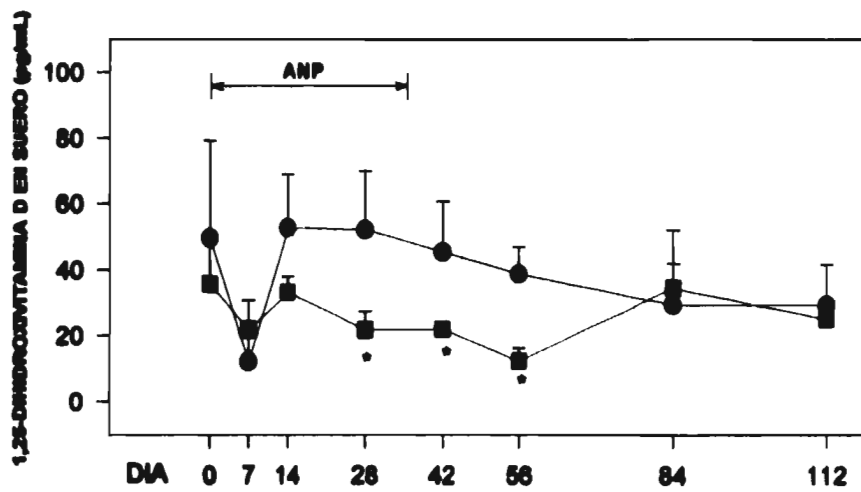


FIGURA 22 1,25-dihidroxitamina D en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

Bioquímica del remodelamiento óseo: En cuanto a los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo, la concentración de hidroxiprolina en la orina aumentó a partir del día 7 del padecimiento. Su concentración se mantuvo por arriba de los valores basales y fue significativamente diferente entre los dos grupos los días 28, 42 y 56 del estudio ($p < 0.05$) (Figura 23). Por otra parte, la concentración de piridinolina libre no fue diferente entre los grupos control y con SN ($p = NS$) (Figura 24).

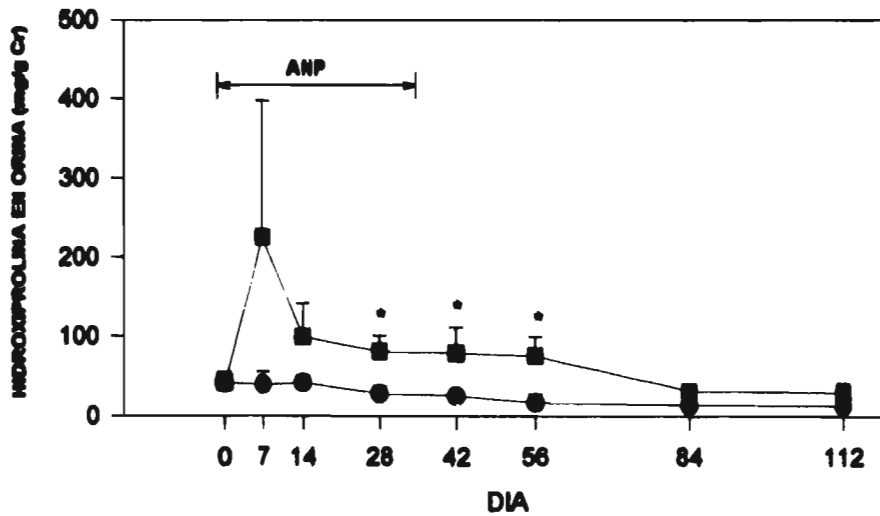


FIGURA 23 Hidroxiprolina en orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

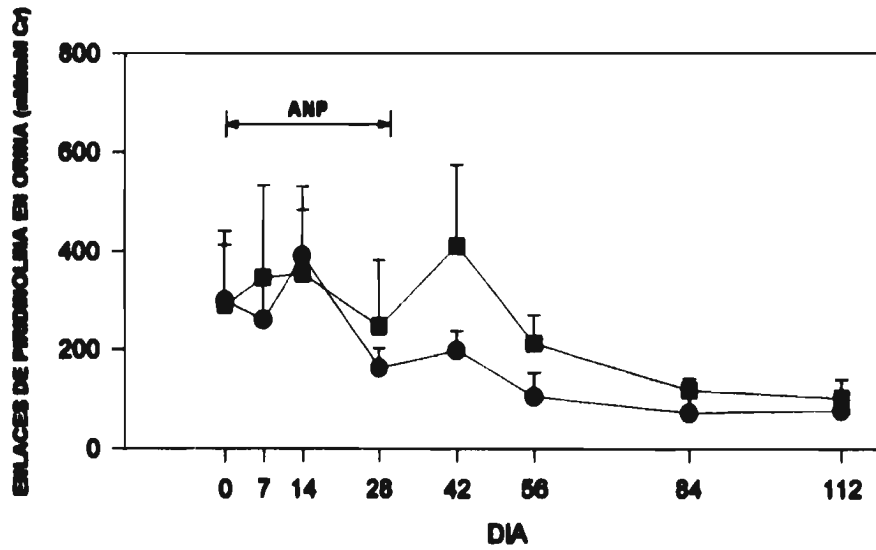


FIGURA 24 Excreción de Piridinolina en orina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p = NS$).

La concentración de fosfatasa alcalina disminuyó progresivamente con el crecimiento óseo en ambos grupos de ratas, sin embargo en el grupo con SN crónico esta disminución se hizo más aparente los días 7, 28 y 42 del estudio ($p < 0.05$) (Figura 25). La concentración de osteocalcina, marcador específico de la formación ósea, aumentó en sangre los días 7, 28 y 42 del estudio, y fue diferente significativamente del grupo control ($p < 0.05$) (Figura 26).

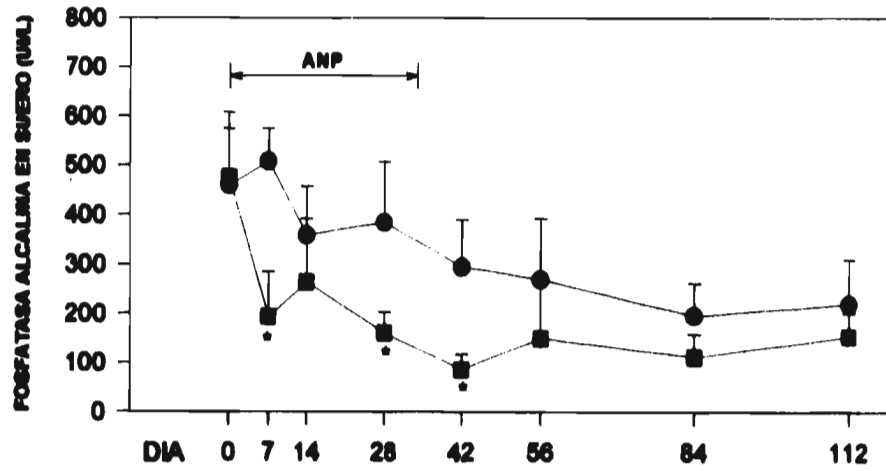


FIGURA 25 Fosfatasa alcalina de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

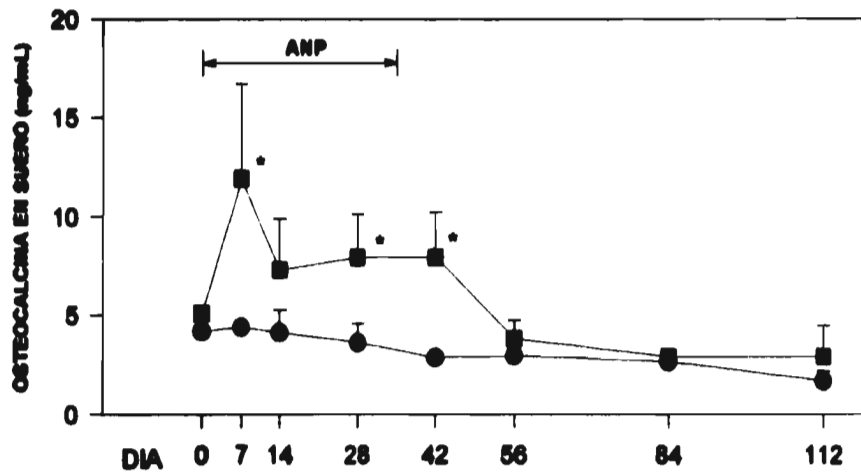


FIGURA 26 Osteocalcina en suero de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

El crecimiento longitudinal del fémur solo presentó diferencia significativa al día 56 del estudio entre el grupo control y con SN ($p < 0.05$) (Figura 27). De la misma manera su peso (g) solo fue diferente del grupo control al día 56 del padecimiento ($p < 0.05$) (Figura 28).

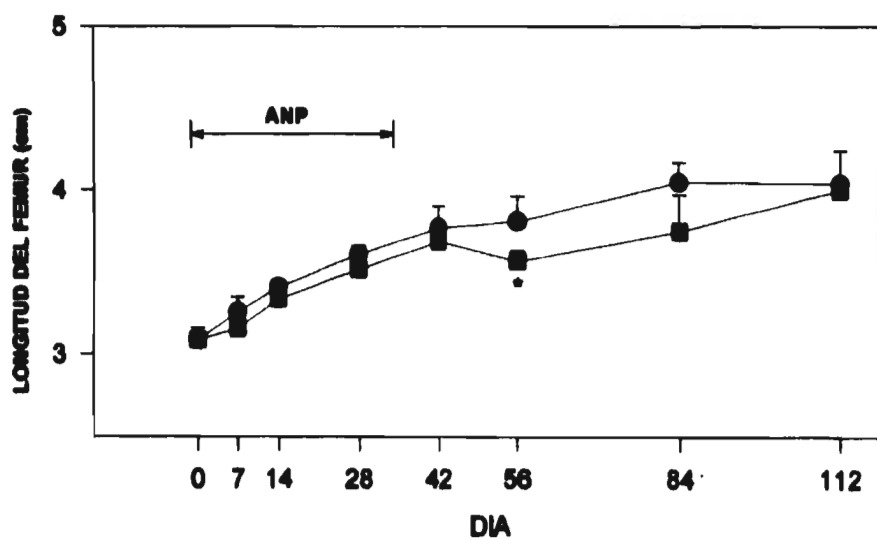


FIGURA 27 Longitud del fémur de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

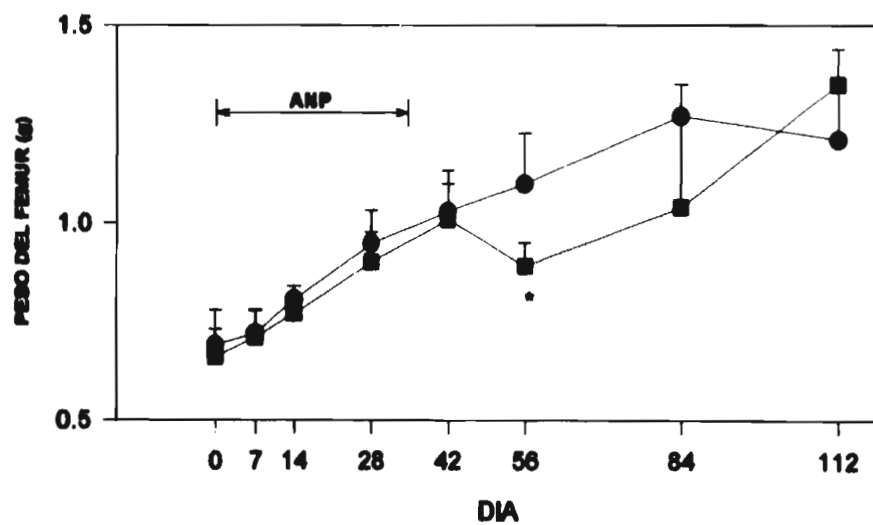


FIGURA 28 Peso del fémur de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

El CMO fue significativamente diferente del grupo control al día 56 del estudio ($p < 0.05$) (Figure 29). La DMO solo fue significativamente diferente al día 56 del padecimiento entre el grupo control y el grupo con SN ($p < 0.05$) (Figura 30).

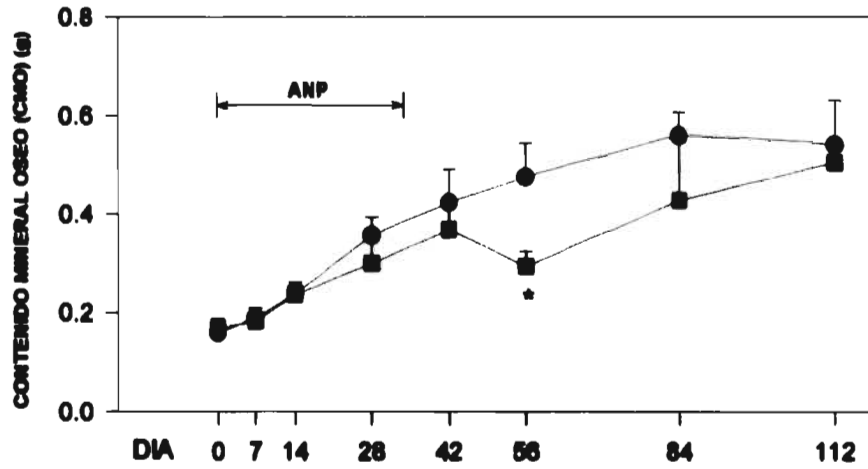


FIGURA 29 Contenido mineral óseo (CMO) de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

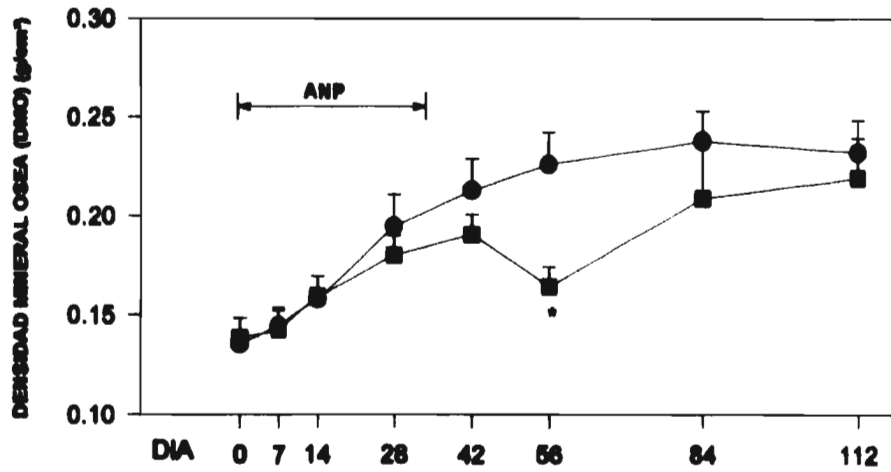


FIGURA 30 Densidad mineral ósea (DMO) de las ratas control (●) y nefróticas (■) durante los días 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84 y 112 del estudio ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En este trabajo desarrollamos un modelo que presentó las alteraciones típicas del SN y filtración glomerular (FG) normal, estimada a través de la depuración de creatinina, para estudiar las alteraciones óseas que se presentan en este padecimiento. Está bien establecido que al disminuir la concentración de las proteínas del plasma y aumentar la pérdida masiva de las mismas por la orina, los cambios metabólicos y clínicos presentes en este padecimiento se agudizan (Bernard, D.B, 1988; Mallick, N.P. 1991). Sin embargo, éste es un fenómeno reversible, por lo tanto, era indispensable reforzar estos cambios, y llevar el modelo a su estado crónico a lo largo de los 112 días del estudio; para ello se inyectó al grupo de ratas con SN una segunda y tercera dosis de ANP de 5 mg/100 g de peso corporal cada una, al día 21 y 35 del estudio.

El contar con un modelo de SN crónico que nos permitiera estudiar más a fondo las alteraciones relacionadas con el metabolismo del calcio, la vitamina D y el remodelamiento óseo, era primordial. El antecedente inmediato a este estudio fue un modelo de síndrome nefrótico agudo reversible, inducido con una dosis única de ANP de 15 mg/100 g de peso corporal, y valorado a partir del día 2 al día 28 del padecimiento (Sierra Amor, R.I. 1992). En este estudio, las ratas presentaron proteinuria persistente, hipercolesterolemia, aumento transitorio de la concentración de nitrógeno de urea en sangre, así como alteraciones del metabolismo mineral como hipocalcemia, hiperfosfaturia y disminución de la concentración de vitamina D.

En este modelo crónico, se observó que las ratas correspondientes al grupo con SN disminuyeron de peso corporal a partir del día 14 del estudio, sin lograr alcanzar el peso correspondiente al de las ratas del grupo control al día 112 del padecimiento. Esto puede explicarse en parte por la proteinuria persistente, ya que no hubo diferencias significativas en el consumo de alimento entre los dos grupos de ratas (control y con SN).

Se conoce que durante el progreso de la enfermedad, la disminución de la concentración de albúmina en sangre altera el metabolismo de los lípidos (Bernard, D.B. 1988), lo que conduce a un aumento en sus niveles circulantes. En nuestro modelo experimental hubo aumento de la concentración de colesterol en sangre a partir del día 7 del estudio; este aumento se presentó nuevamente el día 42, posinyección de la tercera dosis de ANP el día 35 del estudio. Al día 84 del padecimiento, los niveles de colesterol disminuyeron, sin llegar a alcanzar la concentración de colesterol del grupo control al día 112 del estudio.

Como se observa en nuestro modelo experimental, el grupo con SN presentó proteinuria e hipoproteinemia a partir del día 7 del estudio. Así mismo, una segunda y tercera dosis de ANP, reforan nuevamente el síndrome, y por consiguiente la excreción masiva de proteínas en la orina, favoreciendo la hipoproteinemia durante los días 112 días del estudio. En el grupo con SN, la excreción de proteínas en la orina del día 28 y el día 42 del estudio fue diferente del grupo control.

Así mismo, la concentración de las proteínas en el plasma fue diferente con respecto al grupo control. Estos dos parámetros inician las alteraciones metabólicas y óseas que se describen a continuación.

En el grupo de ratas con SN, la concentración de creatinina en suero aumentó el día 42 del estudio solamente. Este aumento no fue significativamente diferente con respecto al grupo control a lo largo de los 112 días del estudio, no encontrándose variación alguna entre los grupos. Así mismo, la excreción de creatinina en la orina, expresada en función del volumen urinario, y la filtración glomerular, no fueron diferentes entre el grupo control y el grupo de ratas con SN.

Las alteraciones del metabolismo mineral ocasionadas a partir del aumento de la excreción de proteínas en la orina, y, por lo tanto, de la disminución de albúmina en el plasma, favoreció que la concentración del calcio disminuyere al día 7 y al día 42 del estudio en el grupo con SN. La excreción de calcio en la orina no fué diferente del grupo control durante los primeros 42 días del estudio. Sin embargo, el día 56, se presentó un aumento significativo en la excreción de este ion por la orina, este aumento pudo deberse al efecto resortivo de PTH el día 42 del pedacimiento. En condiciones normales, al disminuir la concentración de calcio en sangre, hay un aumento en la concentración de fósforo sérico. Por otro lado, el aumento en sangre de PTH ejerce efecto fosfatúrico a nivel del túbulo renal, dando por resultado un aumento en la excreción de fósforo en la orina el día 42 como se observa en este caso.

Es interesante observar que la concentración de fósforo en sangre aumenta el día 56, al normalizarse la excreción de fósforo por la orina. La hiperactividad de las glándulas paratiroides, y por consiguiente el aumento de la concentración de hormona paratiroidea (PTH) en sangre desencadenan el hiperparatiroidismo secundario que se manifiesta en el SN (agudo o crónico), mecanismo que favorece la desmineralización del osteoide, y por lo tanto, el aumento la resorción ósea que se estimula al aumentar la actividad osteoclastica mediada por PTH. Por consiguiente, disminuye el contenido mineral y la densidad ósea, alteraciones que se presentan muy claramente en este modelo experimental de SN. Por otra parte, el hiperparatiroidismo que se presentó en este padecimiento pudo ser la causa del aumento de la excreción de calcio en orina el día 56 del padecimiento, el cual, en parte, está en función del recambio esquelético, así como de la reabsorción de calcio a nivel del túbulo distal, la cual es estimulada por PTH (Bouhtiauy, I. et al., 1991). A su vez, la reabsorción de calcio está influenciada también por el aumento en la reabsorción de sodio y agua por el túbulo renal.

Debido a que existen otros padecimientos renales con filtración glomerular disminuída, tales como la osteodistrofia renal y la insuficiencia renal, y por lo tanto cursan con disminución del contenido mineral y de la densidad ósea (Tessitore, N., et al, 1984), era necesario desarrollar un modelo donde la función renal cursara con filtración glomerular normal calculada a través de la depuración de creatinina, como se mencionó al principio de esta discusión. Otra consecuencia importante de la hiperfiltración de las proteínas del plasma, es el efecto sobre la concentración de las proteínas transportadoras de hormonas, como es el caso de la PT-D.

La 25-hidroxivitamina D (25-OHD), que está unida a su proteína transportadora, al filtrarse por el riñón, ocasiona disminución de su concentración en la sangre. Por otro lado, la 25-OHD, es el precursor del metabolito biológicamente activo de la vitamina D, la 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D]. La hipocalcemia que se presentó en el SN crónico, estimuló el aumento de la 1,25(OH)₂D, sin embargo, su efecto se vió disminuido en gran parte por la falta de sustrato (25-OHD). Este proceso está influenciado por PTH, la cual favorece el aumento de la actividad de la 1-alfa-25-hidroxilasa renal, al liberar calcio del hueso e indirectamente aumentar su absorción intestinal. En condiciones normales, el aumento de la 1,25(OH)₂D ejerce efecto directo sobre la actividad osteoclástica al favorecer la liberación de calcio del hueso, e indirectamente aumenta la actividad osteoblástica, al favorecer la formación ósea, ejerciendo ambas acciones sobre el remodelamiento óseo. El efecto resortivo de PTH y el remodelamiento mediado por 1,25(OH)₂D favorecen la desmineralización ósea y, por consiguiente, la degradación de la colágena. El producto final de este proceso es la liberación a la circulación de hidroxiprolina, aminoácido que se excreta por la orina y que se ha utilizado como indicador de la actividad resortiva. La excreción de hidroxiprolina se inicia a partir del día 7, la cual presenta un pico máximo el día 28 y disminuye gradualmente, pero sigue siendo significativamente diferente entre los grupos a lo largo del estudio.

Como se mencionó previamente, el remodelamiento óseo es un proceso continuo, donde la actividad osteoclástica estimula a su vez la actividad osteoblástica, depositándose osteoblastos sobre las cavidades que formaron los osteoclastos.

Este proceso libera fosfatasa alcalina a la circulación sanguínea, la cual esta mediada por la concentración de su isoenzima ósea. Sin embargo, la concentración de fosfatasa alcalina total (FA) no fue un marcador confiable para medir el aumento de la actividad osteoblástica; su concentración en suero en el SN se mantuvo disminuido desde el día 7 al día 42 del estudio. En el SN, este mecanismo parece estar mediado por otros factores (Pedraza-Chaverri, J. et al. 1992).

Por otro lado, el aumento de OC indicó un aumento de la actividad osteoblástica. La OC es una proteína de tipo no colágeno presente en el osteoblasto, lo que es un indicador de la mineralización ósea. En situaciones tales como el modelo estudiado, en donde los animales de experimentación no desarrollaron insuficiencia renal, el aumento de OC refleja un aumento en la actividad osteoblástica (Delmas, P. D. et al., 1983). Interesantemente, el día 7 del estudio, la concentración de osteocalcina aumentó significativamente en el grupo con SN con respecto al grupo control; este aumento coincidió con la caída transitoria pero no significativa de la función renal en ese día exclusivamente. Así mismo, la concentración de OC disminuye al día 14 en el grupo de ratas con SN. Por otra parte, hay que considerar que la concentración de esta proteína es directamente proporcional a la velocidad de crecimiento del hueso. Se sabe que sus niveles se encuentran altos en la niñez y disminuyen conforme el individuo se acerca a la edad adulta (Azria, M. 1989). El patrón de comportamiento de esta proteína en el grupo de ratas control refleja exactamente este cambio. Así mismo, el peso del fémur, expresado en gramos, fue significativamente diferente entre el grupo con SN y el grupo control.

Las alteraciones del metabolismo mineral, de la vitamina D y de las hormonas que regulan estos mecanismos, ejercen un efecto directo sobre el remodelamiento óseo. Los estudios que se reportan en la literatura (Chesney, R.W. et al, 1977; Johnston, C.C. et al, 1991) se han basado principalmente en utilizar la densitometría de un sólo fotón para conocer los cambios en el CMO. A diferencia, en nuestro se utilizó la densitometría de doble fotón de rayos X, que tiene un alto grado de resolución en animales de experimentación. Esta tecnología altamente específica sirvió para medir los cambios óseos a nivel del contenido mineral y de la densidad de la masa ósea en este estudio. De ahí la importancia de nuestros hallazgos, los cuales resultan ser los primeros reportados en la literatura en donde se desarrolla un modelo de SN crónico inducido con ANP y se estudia el recambio esquelético mediante marcadores bioquímicos de alta especificidad, como son la osteocalcina en sangre, y los enlaces de piridinolina en la orina, así como herramientas tales como la densitometría de doble fotón de rayos x (Masses, R.B., et al., 1990) que resultan ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de las enfermedades óseas ocasionadas por defectos metabólicos, nutricionales ó fisiológicos de gran alcance.

Por primera vez en este modelo de SN crónico experimental inducido con ANP, se midieron los enlaces de piridinolina. Su excreción en orina es un indicador de la degradación de la colágena Tipo I, y por consiguiente del aumento de la resorción ósea (Gerrits, M.I., et al., 1995). Como se pudo observar, la excreción máxima de estos enlaces se presentó al día 42 del estudio, que fue cuando hubo un aumento significativo de PTH.

Si consideramos que este es un mecanismo reflejo del aumento de la actividad osteoclástica mediada por esta hormona, queda claro entonces que en el SN crónico el hiperparatiroidismo secundario que se presenta es la causa más importante de desmineralización ósea.

Es interesante mencionar que el día 56 del estudio, hubo aumento significativo de la concentración de calcio en la orina y también disminución del CMO y de la DMO. En nuestro modelo experimental, el CMO y, la DMO disminuyeron en el SN experimental durante los días de máxima secreción de PTH (42 y 56), regresando a valores control a partir del día 84 del estudio. El CMO aumentó ligeramente en el grupo con SN los días 84 y 112 del estudio, casi igualándose al grupo control; a pesar de ello, el cambio fué estadísticamente diferente entre el grupo con SN y el grupo control. Al calcular el CMO en función del área cuantificada, la densitometría ósea fue significativamente diferente entre los dos grupos estudiados. Es muy probable que de estos dos mecanismos que se presentaron durante el día 56 del estudio (aumento de la concentración de calcio y disminución del CMO y de la DMO), los cuales están directamente relacionados con el aumento de PTH, dependa en gran parte el manejo del recambio esquelético, y el metabolismo mineral en el SN. Como se observó, la resorción predominó sobre la formación del hueso, la cual mantuvo la homeostasis mineral en equilibrio a expensas del deterioro del esqueleto en este padecimiento. En la figura 31 se muestra la posible recurrencia de alteraciones que conducen a la disminución del contenido mineral y de la masa ósea transitoria en las ratas con SN.

Se requieren de estudios más extensos para valorar la eficacia de dar tratamiento con agentes antiresortivos en padecimientos que cursan con deterioro de la masa ósea, alteraciones del metabolismo mineral y de la bioquímica del remodelamiento esquelético, como es por ejemplo, el síndrome nefrótico crónico que hemos desarrollado en este trabajo.

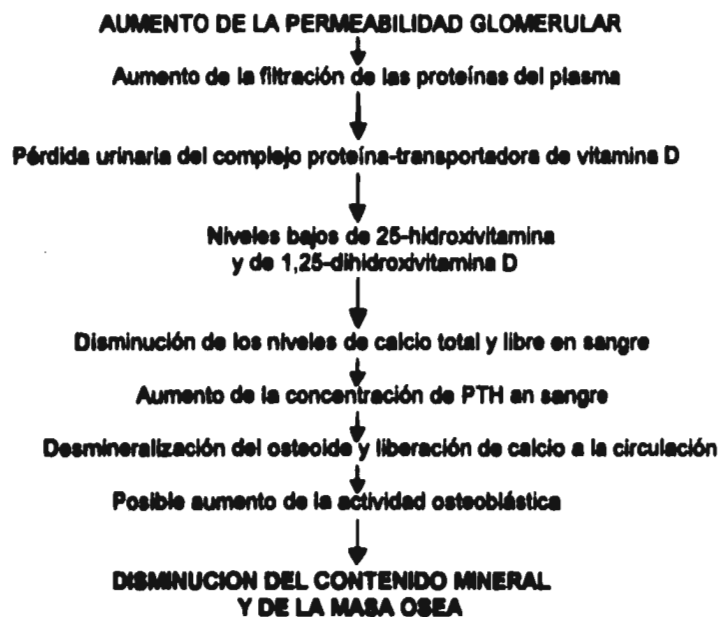


FIGURA 31 ALTERACION DEL METABOLISMO MINERAL Y OSEO EN EL SINDROME NEFROTICO EXPERIMENTAL (Sierra Amor, R.I. 1996).

8**CONCLUSIONES**

1. Los marcadores bioquímicos del remodelamiento esquelético determinados en ratas con síndrome nefrótico crónico indican que hay un aumento en el recambio esquelético, esto es, aumento en la formación y degradación del hueso, en este modelo experimental.
2. Durante la proteinuria intensa, la degradación del hueso predomina y conduce a una disminución transitoria del contenido mineral y densidad del hueso.
3. Hacia el final del estudio, a pesar de la proteinuria persistente, la concentración de proteínas totales y el contenido mineral y densidad del hueso regresan a valores normales.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alon, U. y Chan, J.C.M. 1983. Calcium and vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. Int. J. Pediatr. Nephrol. 4:115-118.

Amato, D., Pedraza-Chaverrí, J. y Herrera-Acosta, J. Fisiología del síndrome nefrótico. En: Martínez Maldonado, M., Rodicio, J.L., y Herrera Acosta, J. Tratado de Nefrología, Ediciones Norma, Madrid, 1993. 2a. edición. Cap 39. pag. 685-694.

Appel, G.B., Blum, C.B., Chien, S., Kunis, C.L. y Appel, A.S. 1985. The hyperlipidemia on the nephrotic syndrome. Relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure, and viscosity. New Engl. J. Med. 312:1544-1548.

Auwerx, J., De Keyser, L., Bouillon, R. y De Moor, P. 1986. Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with nephrotic syndrome. Nephron 42:231-235.

Azris, M. 1989. Value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. Calcif. Tissue Int. 45: 7-11.

Baron, R. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Primer of the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. First Edition. Published by the American Society of Bone and Mineral Research 1990: 3-6.

Barragry, J.M., France, M.W., Carte, N.D., Auton, J.A., Beer, M., Boucher, B.J. y Cohen, R.D. 1977. Vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. *Lancet* 2:229-232.

Bernard, D.B. 1988. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 33:1184-1202.

Borowsky, B.A., Kesner, D.M., Hartroft, W.S., Recant, L. y Koch, M.B. 1961. Aminonucleoside-induced chronic glomerulonephritis in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 57:512-520.

Bouhtiauy, I., Lajeunesse, D. y Brunette, M.G. 1991. The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule. *Endocrinology* 128:251-258.

Calvo, M.S., Gundberg, C.M., Heath III, H. y Fox, J. 1991. Homologous amino-terminal radioimmunoassay for rat parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 261:262 - 268.

Chan, Y.K., Mason, R.S., Parmentier, M., Savdie, E., Lissner, D. y Posen, S. 1983. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. *Kidney Int.* 24:336-341.

Chen, P.S. Jr. y Toribara, H.W. 1956. Microdetermination of phosphorous. *Anal.Chem.* 28:250-254.

Cheesey, R.W., Mazess, R.B., Roses, P.G. y Jax, D.K. 1977. Bone mineral status measured by direct photon absorptiometry in childhood renal disease. *Pediatrics* 60:864-872.

Cruz, C., Juárez-Nicolás, F., Tapia, E., Corree-Rotter, R. y Pedraza-Chaverri, J. 1994. Abnormalities of coagulation in experimental nephrotic syndrome. *Nephron* 68:489-496.

Deftos, L.J. 1991. Bone protein and peptide assays in the diagnosis and management of skeletal disease. *Clin. Chem.* 37:1143-1148.

Deftos, L.J. y Glowacki, J. Mechanism of bone metabolism. In: Kem, D.C., Inohlich, E. Editors. *Pathophysiology*, 3er. Edition. Philadelphia: J.B. Lypincott Co. 1984, 445-468.

Delmas, P.D. 1990. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocr. Metab. Clin. North America* 19:1-19.

Delmas, P.D., Wilson, D.M., Mann, K.G. y Riggs, B.L. 1983. Effect of renal function on plasma levels of bone GLA-protein. *J. Clin. Endocr. Metab.* 57:1028-1030.

Demiaux, B., Arlot, M.E., Chapuy, M.C., Menuier, P.J. y Delmas, P.D. 1992. Serum osteocalcin is increased in patients with osteomalacia: correlations with biochemical and histomorphometric findings. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74:1146-1151.

Diamond, J.R. y Karknovsky, M.J. 1986. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am. J. Pathol.* 122:481-487.

Ebeling, P.R., Peterson, J.M. y Riggs, L. 1992. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone disease. *J. Bone Min. Res.* 7:1243-1249.

Emerson, K. y Beckman, W.W. 1945. Calcium metabolism in children with nephrosis I. A description of an abnormality in calcium metabolism in children with nephrosis. *J. Clin. Invest.* 32:29-39.

Eriksen, E.F., Axelrod, D.W. y Flemming, M. In: Bone Histomorphometry. Published by the American Society for Bone and Mineral Research. Raven Press 1994,6-7.

Eriksen, E.F., Axelrod, D.W. y Flemming, M. In: Bone Histomorphy. Published by the American Society for Bone and Mineral Research. Raven Press 1994, 13-31.

Feldman, J.D. y Fisher, E.R. 1961. Chronic aminonucleoside proteinuria. Lab. Invest. 3:444-458.

Fiegelson, E.B., Drake, T.W. y Recant, L. 1957. Experimental nephrosis in rats. J. Lab. Clin. Med. 40:437-446.

Frenk, S., Antonowicz, I., Craig, J.M. y Metcoff, J. 1955. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89:424-429.

Freundlich, M., Bourgoignie, J.J., Zilleruello, G., Jacobs, A.L., Canterbury, J.M. y Strauss, S. 1985. Bone modulating factors in the nephrotic children with normal glomerular filtration rate. Pediatrics 37:280-285.

Gerrits, M.I., Thijssen, J.H.H. y van Rijn, J.M. 1995. Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin. Chem.* 41:571-574.

Goldstein, D.A., Haldiman, B., Sherman, D., Norman, A.W. y Massry, S.G. 1981. Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J. Clin. Endocr. Metab.* 52:116-121.

Goldstein, D.A., Ode, Y., Kurokawa, K. y Massry, S.G. 1977. Blood levels of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. Studies in 26 patients. *Ann. Intern. Med.* 87:664-667.

Golper, T.A. y Schwart, S.H. 1982. Impaired renal mevalonate metabolism in nephrotic syndrome: a stimulus for increased hepatic cholesterologenesis independent of GRF and hypoalbuminemia. *Metabolism* 31:471-473.

Griffin, M.G., Kimble, R., Hopper, W. y Pacifici, R.L. 1993. Dual-energy X-ray absorptiometry of the rat: accuracy, precision, and measurement of bone loss. *J. Bone Min. Res.* 8:795-800.

Gundberg, C.M., Wilson, P.S., Gallop, P.M. y Parfitt, A.M. 1985. Determination of osteocalcin in human serum: Results with two kits compared with those by a well characterized assay. Clin. Chem. 31:1720-1723.

Haddad, J.C. y Welgates, J. 1976. Radioimmunoassay of the binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum. Concentrations in normal subjects and patients with disorders of mineral homeostasis. J. Clin. Invest. 58:1217-1220.

Haldimann, B. y Trechsel, U. 1983. Vitamin D replacement therapy in patients with nephrotic syndrome. Min. Electrolyte Metab. 9:154-156.

Hanson, D.A., Wels, M.A., Sollen, A.M., Maslan, S.L., Singer, F.R. y Eyre, D.R. 1992. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. J. Bone Min. Metab. 7:1251-1258.

Horst, R.L., Reinhardt, T. y Hollis, B.W. 1990. Improved methodology for the analysis of plasma vitamin D metabolites. Kidney Int. 38:28-35.

Hunsicker, L.G., Shearer, T.P. y Shaffer, S.J. 1981. Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexadimethrine. Kidney Int. 20:7-10.

Jaffe, J. 1966. Manual del autoanalizador Beckman 2.

Johnston, C.C., Siemenda, C.W. y Melton, L.J. 1991. Clinical use of bone densitometry. *Current Concepts*. 324:1105-1109.

Jones, J.H., Peter, D.K., Morgan, D.B., Coves, G.A. y Mallick, N.P. 1967. Observations on calcium metabolism in the nephrotic syndrome. *Q. J. Med.* 36:301-320.

Katz, J., Sellers, A.L. y Bonorris, G. 1964. Effect of nephrectomy on plasma albumin catabolism in experimental nephrosis. *J. Lab. Clin. Med.* 63:680-684.

Khamiseh, G., Vaziri, N.D., Oveisi, F., Ahnadhia, M.R. y Ahmadnia, L. 1991. Vitamin D absorption, plasma concentration and urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196:210-213.

Koenig, K.G., Lindberg, J.S., Zerwekh, J.E., Paladino, K., Cushner, H.M. y Copley, J.B. 1992. Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int.* 41:161-165.

Korkor, A., Schwartz, J., Bergfeld, M., Teitelbaum, S., Avioli, L.V., Klark, S. y Slatopolsky, E. 1983. Absence of metabolic bone disease in adult patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:496-500.

Lambert, P.W., DeOreo, P.B., Fu, I.Y., Kaetzel, D.M., Von Ahn, K., Hollis, B.W. y Ross, B.A. 1982. Urinary and plasma vitamin D3 metabolism in the nephrotic syndrome. *Metab. Bone. Dis. Res.* 4:7-15.

Lowry, O.A., Rosenbrough, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:267-275.

Lim, P., Jacob, E., Chio, L.F. y Pwee, H.S. 1976. Serum ionized calcium in nephrotic syndrome. *Orth. J. Med.* 45:421-424.

Lim, P., Jacob, E., Tock, E.P.C. y Pwee, H.S. 1977. Calcium and phosphorous metabolism in nephrotic syndrome. *Q. J. Med.* 46:327-338.

Malluche, H.H., Goldstein, D.A. y Massry, S.G. 1979. Osteomalacia and hyperparathyroid bone disease in patients with nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 63:501-505.

Mellick, N.P. 1991. Epidemiology and natural course of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin. Nephrol.* 35: Supp. 1:3-7.

Manual del Densitómetro óseo. Modelo QDR-1000. Chicago, Il. E.U.1990.

Manual del Espectrofotómetro Perkin-Elmer de Absorción Atómica. Modelo 3030B.
Norwalk, CT. E.U. 1982.

Manual del Estuche para Piridinoline en Orina. Metra Biosystems, Mount View, CA.
E.U. 1993.

Manual del Radiometer ICA 1. Modelo ICA 1. Copenague, Dinamarca. 1981.

Masees, R.B., Barden, H.S., Bisek, J.P. y Hanson, J. 1990. Dual-energy X-ray absorptiometry for total body and regional bone mineral and soft tissue composition. Am. J. Clin. Nutrition 51:1106-1112.

Mizokuchi, M., Kubota, M., Tomino, Y. y Koide, H. 1991. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. Contr. Nephrol. 90:139-143.

Mizokuchi, M., Kubota, M., Tomino, Y. y Koide, H.L. 1992. Possible mechanism of impaired calcium and vitamin D metabolism in nephrotic rats. Kidney Int. 42:355-340.

Mundy, G. Bone Remodeling cells. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. First Edition. Published by the American Society for Bone and Mineral Research. 1990, 18-22.

Olbright, C.J., Onnon, J.K., y Tisher, C.C. 1987. Catepsin B and L in nephron segments of rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 32:354-356.

Pedraza-Chaverrf, J., Cruz, C., Ibarra-Rubio, M.E., Chavez, M.T., Calleja, C., Tapia, E., Uribe, M.C., Romero, L., y Peña, J.C. 1990. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. 1. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodium retention. *Rev. Invest. Clin.* 42:29-38.

Pedraza-Chaverrf, J., Cruz, C., Tapia, E. y Peña, J.C. 1992. Activity of serum enzymes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Renal Failure* 14:523-531.

Pedraza-Chaverrf, J., Sosa, G., Cruz, C., Medina-Campos, O.N. e Ibarra-Rubio, M.E. 1996. Time-course analysis of serum and urinary proteins by SDS-PAGE in experimental nephrotic syndrome. *Renal Failure* 18:181-194.

Pjdenphen, J., Larsen, N.E. y Christiansen, C. 1984. An easy and reliable method for determination of urinary hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* 124:45-48.

Ponticelli, C. y Passerini, P. 1991. Conventional treatment of idiopathic nephrotic syndrome and membranous nephropathy in adults. *Clin. Nephrol.* 35: Supp.1:16- 21.

Santos-Atherton, D. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En: Nefrología Clínica. Martínez Maldonado, M. y Rodicio, J.L. Cap 22. Salvat, Barcelona, 616. 1982.

Schmidt-Gayk, H., Schmidt, W., Grawunder, C.M., Ritz, E., Tschöpe, W., Pietsch, V. y Andrassy, K. 1977. 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. Lancet 2: 105-107.

Schnaper, H.W. y Robson, A.M. Nephrotic syndrome: minimal changes disease, focal glomerulosclerosis and related disorders. In: Diseases of the Kidney. 5th Edition, 1993. By R.W. Schrier y C.W. Gottschalk. Little Brown & Co. Boston. pp: 1731-1784.

Sierra Amor, R.I. 1992. El sistema de la vitamina D en ratas con síndrome nefrótico inducido con aminonucleósido de puromicina. Tesis de Maestría. U.N.A.M. México, D.F.

Sierra-Amor, R.I., Specker, B., Jiménez, F., Ellis, K., Hall, E., Eutrech, G., Ho, M., Cruz, C. y Pedraza-Chaverrí, J. 1996. Bone mineral content, bone mineral density and biochemical bone markers in aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. Clin. Chem. 42:S240.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

Stickler, G.B., Hayles, A.B., Power, M.L.H. y Uron, J.A. 1960. Renal tubular dysfunction complicating the nephrotic syndrome. *Pediatrics* 26:75-78.

Stickler, G.B., Rosevear, J.W. y Ulrich, J.A. 1962. Renal tubular dysfunction complicating the nephrotic syndrome: the disturbance in calcium and phosphorus metabolism. *Proc. Mayo Clinic* 37:376-388.

Tessitore, N., Boucci, E., D'Angelo, A., Lund, B., Corgati, A., Lund, B., Valvo, E., Lupo, A., Loschiavo, C., Fabris, A. y Maschio, G. 1984. Bone histology and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal or reduced renal function. *Nephron* 37:153-159.

Tietz, N.W. *Textbook in Clinical Chemistry*. 2nd Edition. Edited by Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood. Saunders. 1994. Section V. pg 696-697.

Wallerstein, S., Zucker, C.L. y Fleiss, J.L. 1980. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* 47:1-9.

Werner, J.A., Goton, S.J. y Reisz, L.L. 1972. Escape from inhibition of resorption in cultures of fetal bone treated with calcitonin and parathyroid hormone. *Endocrinology* 90:752-759.

Yamauchi, A., Imai, E., Noguchi, T., Tanako, T., Yamamoto, S., Mikami, H., Fukuhara, Y., Fujii, M., Orita, M. y Kamada, T. 1988. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats. *Am. J. Physiol.* 254:E676-E678.



AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY
& CANADIAN SOCIETY OF CLINICAL CHEMISTS

July 28 - August 1 · Chicago, Illinois

April 3, 1996

Rosa I. Sierra-Amor
University of Cincinnati Children's Hospital
Medical Center
231 Bethesda Avenue
Cincinnati, OH 45267-0541

The Contributed Papers Committee for the 1996 Annual Meeting of the AACC has accepted your abstract for presentation in Chicago.

Temporary Number: 0098
Permanent Number: 604
Title: Bone and Mineral Metabolism in Rats with Nephrotic Syndrome
Session: Animal Clinical Chemistry
Date/Time: Thursday AM

Please read and follow the enclosed instructions carefully when preparing your materials for presentation. An accepted abstract is only the beginning point for meaningful communications. These guidelines are intended to enhance the presentation of your investigative work and provide uniformity among all presentations. Please follow the guidelines for the benefit of all those who will be in attendance.

If you are unable to present your poster, please notify the AACC Meetings Department as soon as possible citing the permanent number, title, presenting author and scheduled paper session.

If your abstract must be withdrawn during the meeting, please notify Courtney Ford at the pre-registration counters. Failure to present an accepted abstract may jeopardize your ability to present in future meetings.

Authors are expected to register using the official AACC meeting registration form and pay the appropriate registration fee. An accepted abstract does not exempt the author from payment of the registration fee. AACC members receive registration forms automatically. If you are not a member, please request registration forms by contacting the AACC Office in Washington, DC at 1-800-892-1400 or 202-857-0717. FAX 202-833-4576.

I wish you a successful presentation and meaningful scientific interaction with your colleagues. See you in Chicago.

Yours truly,

Marc Walter

Marc Walter, PhD
1996 AACC Abstracts Coordinator

Enclosure

S6
98

International Journal of Laboratory Medicine and Molecular Diagnostics

AACC/CSCC 1996 Annual Meeting
July 28-August 1, 1996
McCormick Place East, Chicago, IL

Abstracts of:
Plenary Sessions
EduTrak Sessions
Scientific Posters

Additional Meeting Information

Thursday, August 1, 10:00am-12:30pm

affinity comparison with a polyclonal antibody produced in a rabbit against the same conjugate rendered similar results. Classical radioimmunoassays developed using the monoclonal and the polyclonal provided assays with equivalent rates and sensitivity characteristics. Two hundred and six samples were either extracted and measured in the two assays and the results showed that the monoclonal antibody based assay provided significantly lower results with a mean of 155 ng/dL, range of 17 to 800 ng/dL and median of 58 ng/dL, compared to a mean of 245 ng/dL, range of 32 to 1300 ng/dL and median of 98 ng/dL obtained with the polyclonal antibody based assay ($p < 0.0001$). Spearman rank correlation was 0.8712 ($p < 0.0001$). Facts of these samples were also submitted to a cation column chromatography and measured with both assays. The results obtained with the monoclonal antibody based assay in the extracted only samples (mean 151 ng/dL, range 18 to 460 ng/dL, median 47 ng/dL) were similar ($p < 0.1483$) to those obtained with the polyclonal antibody based assay in the same samples extracted and submitted to chromatography (mean 128 ng/dL, range 19 to 440 ng/dL, median 46 ng/dL). The data obtained with the new monoclonal antibody indicate that it can be used in potentially simple and specific assays for serum testosterone, as well as provide the basis for the development of non-competitive assays.

602

VERIFYING THE REFERENCE INTERVAL FOR FREE THYRONINE AND FREE TRIIODOTHYRONINE ATTAINING THE "REFERENCE" APPROACH (R. Rapolo M. Dozari, Davide Gavazza, Giovanni Marchi (Clin Chem and Hospital Lab Hosp Verona and Legnano (VR), Italy)

Objectives: The production of reference intervals represents a difficult and constant task for the clinical laboratory, once they are established, they require a regular review. The laboratory may follow IFCC recommendations or use commercially available softwares for the calculation of reference limits using the population patients. The aim of the present study was to evaluate GraphROC™ in the production of reference interval for free thyroxine (FT4) and free triiodothyronine (FT3) through the "indirect" approach. **Materials and methods:** We selected all the tests of the thyroid panel assayed in 1995 in Legnano Laboratory (Legnano Hospital is a 600 bed general hospital equipped with a Medicine and a Surgery, but not Endocrinology Department) relative to inpatients and outpatients. All the assays were performed using ACS-180 (Ciba Coring, Medfield, USA). The data were processed using the standard features of GraphROC™ software. **Results:** We had previously calculated, following IFCC (Dozari et al Clin Chem 1995, 41: 575) an interval reference for FT4 = 2.25-3.77 ng/L (Ciba Coring RevB 694 2.3-4.2 ng/L), the interval suggested by GraphROC (0-2130) was 2.23-3.64 ng/L. We had adopted as interval reference for FT4 = 5-20 ng/L (Ciba Coring RevG 594 8-15 ng/L), the interval suggested by GraphROC™ (n° 4647) was 8.33-14.11 ng/L (see Figure). **Discussion:** GraphROC™ appears an useful tool in order to assist in choosing and verifying reference intervals, the interval obtained by us for FT4 was very near to that calculated using IFCC recommendations and the interval for FT4 was very near to that recommended by the manufacturer.



Thursday, August 1

Poster Session: 10:00am-12:30pm
Animal Clinical Chemistry

603

Formation of Sulfhemoglobin in Rhesus Monkeys and Possible Correlation with Erythrocyte Glutathione Concentration. Richard B. Szilagyi and John L. Zimmerman. (Eli Lilly and Co., Greenfield, IN 46140)

An experimental anti-cancer drug was administered to rhesus monkeys in an attempt to understand the origin of the anemia seen during the

Animal Clinical Chemistry

clinical trials with this compound. In all, 46 monkeys were dosed orally by a variety of regimens. Subsequent to dosing the hemoglobin oxidation products methemoglobin (metHb) and sulfhemoglobin (sulfHb) were determined spectrophotometrically. All animals were found to produce predominantly sulfHb as well as lesser amounts of metHb. That monkeys can produce sulfHb in response to drug administration has been reported previously (Clin. Chem., 34,1197(1988)). Our results extend this finding and suggest that sulfHb formation, although relatively rare in humans and most laboratory animals, may occur readily in monkeys. Because sulfHb can potentially interfere with the determination of metHb, its possible prevalence in treated monkeys should be considered. Because the presence of sulfHb indicated possible oxidative damage to the red blood cell (RBC), we measured RBC glutathione (GSH) by either the standard DTNB method or by a more specific enzymatic procedure. We found the GSH concentration of the monkey RBC to be about 100 mg/dL in both treated and untreated animals. This concentration is markedly higher than the mean values reported for humans (68.5 mg/dL) and mean values which we measured for dogs (72.0 mg/dL) and rats (64.7 mg/dL). A possible relationship between RBC GSH concentration and the tendency to form sulfHb was proposed by McCutcheon (Lancet, 2,240(1960)) who observed that humans who produced sulfHb had elevated GSH levels in their RBCs. We suggest that sulfHb formation may commonly occur in monkeys which are challenged with hemoglobin-oxidizing drugs. The seeming tendency of these animals to produce sulfHb may be related to the comparatively high GSH concentration in their RBCs.

604

BONE AND MINERAL METABOLISM IN RATS WITH NEPHROTIC SYNDROME. Ross I. Spiller, Anne F. Jimenez, Borisy L. Specker, Kay Ellis, Emily Hall, Mona Ho, Cristiano Cruz and Jose Pedraza-Chaverri. (Children's Hospital and University of Cincinnati Medical Ctr., Cincinnati, OH 45229; RINS2, Mexico City, 14000; and Biology Dept., Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico City 04510).

Nephrotic syndrome (NS) is characterized by an increased urinary protein excretion, hypoproteinemia, hypocalcemia and edema. Minerals, hormones, vitamins, and binding proteins are filtered by the kidney. Therefore, the mineral metabolism is altered; bone mineral content (BMC), and bone mineral density (BMD) are decreased. The objective was to develop experimentally a NS rat model with normal creatinine clearance, and to study the bone and mineral metabolism alterations in the chronic stage of the disease. The NS was induced in male Wistar rats (n=46) with puromycin aminonucleoside (PAN) (10, 5 and 5 mg/100 g bw) by iv injection (day 0, 21 and 36). Blood and urine samples were collected at day 0, 7, 14, 26, 42, 56, 84 and 112. Minerals (Ca, Ca, P, Cr, PTH, vit D, ALPase, and osteocalcin) were analyzed in serum. Minerals (Ca, P, Cr, hydroxyproline and pyridinoline (PYD)) were analyzed in urine. Compared to control group (n=48), glomerular filtration rate was normal (p=NS). The NS group showed proteinuria (p<0.001), hypocalcemia (p<0.02), increased PTH concentration (p=0.004), low vitamin D (<0.001), decreased BMC (p<0.001) and decreased BMD (p<0.001); increased osteocalcin concentration (p<0.001), low ALPase (p=0.003) and increased hydroxyproline (p<0.001). PYD was not different (p=NS) from control group. All parameters returned to control values at day 112. Proteinuria persisted along the 112 days of the study. Our study is the first one using an experimental chronic NS rat model induced with PAN, where the mineral and bone metabolism are studied simultaneously.

605

DECREASE IN LEUKOCYTE CHEMILUMINESCENCE BY ANTIOXIDANTS AND OXYGEN FREE RADICAL SCAVENGERS. Kaira J. Kumar, Prasad K. (Departments of Pathology and Physiology, University of Saskatchewan and Royal University Hospital, Saskatoon, Saskatchewan, S7N 0W8, Canada)

Oxygen free radicals (OFRs) have been implicated in tissue injuries during ischemia-reperfusion. It has been documented that

LABORATORY STUDY

ARTICLE NUMBER AND QUERY

148, 149

Biochemical Bone Markers, Bone Mineral Content, and Bone Mineral Density in Rats with Experimental Nephrotic Syndrome

Rosa I. Sierra,¹ MS, Bonny L. Specker,¹ PhD,
Felipe Jiménez,² BS, Cristino Cruz,² BS,
and José Pedraza-Chaverrí,³ PhD

¹Department of Pediatrics
Pediatric Bone Research Center
Children's Hospital and University of Cincinnati Medical Center
Cincinnati, Ohio 45267-0541, USA

²Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
Mexico, DF 14000

³Departamento de Biología
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
Mexico, DF 04510

ABSTRACT

The human nephrotic syndrome (NS) is accompanied by important alterations of mineral and bone metabolism. The purpose of the present study was to examine bone metabolism in rats with experimental NS and normal creatinine clearance, and to evaluate the reversibility of this alteration. NS was induced by three injections of puromycin aminonucleoside (PAN) on days 0, 21, and 35 (10, 5, and 5 mg/100 g body weight, respectively). The biochemical markers of bone formation (osteocalcin and alkaline phosphatase) and bone resorption (hydroxyproline and pyridinolines), bone mineral content (BMC), and bone mineral density (BMD), determined by dual-energy x-ray absorptiometry

Address reprint requests to: Rosa I. Sierra, MS, Department of Pediatrics, Children's Hospital and University of Cincinnati Medical Center, 231 Bethesda Ave., Cincinnati, OH 45267-0541. Fax: (513) 558-7770.

This page runs 1 line long

(DEXA), were studied on days 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84, and 112. Proteinuria was present throughout the study. Hypoproteinemia was seen on days 7, 28, 42, and 56, returning to control values on days 84 and 112. In serum, osteocalcin (OC) concentration increased ($p < 0.001$), and alkaline phosphatase (ALP) decreased ($p = 0.002$). In urine, hydroxyproline increased ($p < 0.001$), but urinary pyridinoline was not different from the control group throughout the study. Increased serum parathyroid hormone concentration and decreased levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxyvitamin D were found from day 7. During the intense proteinuria, bone resorption predominates and decreased BMC and BMD ensues in PAN-nephrotic rats. PAN-nephrotic rats showed low BMC and BMD compared to control group ($p < 0.001$). At the end of the study, when proteinuria persisted but total serum protein returned to control values, the biochemical bone markers, BMC, and BMD returned to normal. In conclusion, PAN-nephrotic rats had reversible bone alterations that were related to the magnitude of proteinuria and the concentration of total serum protein.

Key Words: Dual-energy x-ray absorptiometry; Nephrotic syndrome; Osteocalcin; Puromycin aminonucleoside; Pyridinoline.

INTRODUCTION

Controversy exists on the frequency of bone lesions, which have been found in none (1,2), in a few (3), or in all (4) of the reported patients with nephrotic syndrome (NS)^{*} and normal renal function. Demineralization of the skeleton and pathological fractures have been reported in nephrotic children (5), and abnormalities of bone histology (4), as well as disturbances of calcium metabolism have been shown in adults with NS and normal renal function (6). Dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) (7-9) is now an established method for measuring bone mineral density (BMD) in humans, and it can be used to measure BMD accurately and precisely in rats (10). Different experimental models of NS resemble the human counterpart and can aid in the study of the biochemistry and physiology of NS. The most common model used is the one induced by the injection of puromycin aminonucleoside (PAN) (11-14). The renal lesions are very similar to those described in humans with minimal-damage NS (13). We made the hypothesis that persistent proteinuria for 112 days may induce irreversible bone damage in rats with NS induced by three injections of PAN. Therefore, the present study was undertaken in an effort to evaluate the biochemical bone markers—osteocalcin, alkaline phosphatase, urinary hydroxyproline, and urinary pyridinoline—and the relationship with BMC and BMD in rats with NS in a 112-day study.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Design

Ninety-six male Wistar rats weighing 200-250 g were studied. NS was induced by three subcutaneous injections of a 2% PAN (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution in

^{*}Nonstandard abbreviations: NS, nephrotic syndrome; OC, osteocalcin (bone Gla protein, BGP); PTH, parathyroid hormone; PAN, puromycin aminonucleoside; BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density.

This page runs 1 line long

0.9% NaCl (10, 5, and 3 mg/100 g of body weight) at days 0, 21, and 35 of the study, respectively. Control rats received the same volume of vehicle (0.9% NaCl) (14). The animals were maintained in metabolic cages from day 0 to day 112, and urine was collected and measured at the indicated times. PAN or vehicle was injected on day 0. Rats were pair-fed and had free access to water. Animals were maintained in compliance with the guiding principles for the care and use of animals (15).

Blood samples of 6 rats per group per day were obtained by decapitation from days 0, 7, 14, 28, 42, 56, 84, and 112, and collected at room temperature without anticoagulant to obtain serum; and the right femur was excised and weighed. Urine samples were centrifuged, aliquoted, and stored at -20°C prior to the analysis. Glomerular filtration rate (GFR) was evaluated as 24-h creatinine clearance. Total protein in urine or serum was measured according to Lowry et al. (16) using a bovine serum albumin as standard. Cholesterol in serum was estimated enzymatically according to the instructions of the manufacturer (Farmacuticos Lakezide, México, DF). Serum and urinary calcium were measured by atomic absorption spectroscopy (Perkin-Elmer, Model 3030B, Norwalk, CT). Serum and urinary creatinine and phosphorus, and serum alkaline phosphatase were measured by a V.P.S.5. autoanalyzer (Abbott, Irving, TX). Serum ionized calcium was stored in CO_2 tubes, and its concentration was measured by calcium electrode (pH = 7.4) (Radiometer, Model ICA 1, Copenhagen, Denmark). Serum intact PTH was measured by radioimmunoassay using a commercial kit specific for rat PTH developed by Immunotopics Inc. (San Clemente, CA) and distributed by Nichols Institute Diagnostics (San Juan Capistrano, CA) with an intra- and interassay variation of 4% and 8%, respectively. Rat osteocalcin (bone GLA protein, BGP) was measured by radioimmunoassay with a goat anti-rat osteocalcin antibody specific for the carboxyl terminal region of rat BGP (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA) with an intra- and interassay variation of 4.5% and 8%, respectively. Serum vitamin D metabolites [25-OHD and 1,25(OH) $_2$ D] were determined according to Horst et al. (17). The intra- and interassay variation for 25-OHD vitamin D was 10% and 15%, respectively. 1,25(OH) $_2$ D intra- and interassay coefficient of variation was 9% and 12%, respectively. Urinary hydroxyproline was measured according to Pedeaphant et al. (18). Urinary pyridinolines and creatinine were measured by an immunoenzymatic commercial assay (Metra Biosystems, Mountain View, CA) (19) with an intra- and interassay variation of 3.8% and 8.7%, respectively. Concentrations are expressed per creatinine excretion in nanomoles per millimole.

Dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) measurements were made with a Hologic QDR-1000 x-ray bone densitometer (Hologic, Inc., Waltham, MA) in which scans were acquired with a 1 mm diameter x-ray collimator inserted over the original collimator. In addition, an ultrahigh-resolution software program available from Hologic was utilized, which increased the number of lines scanned by fourfold and slowed the speed of the scanning arm to produce an oversampling that led to a point resolution increase over sevenfold compared with a typical human scan. Each femur was scanned for 8 min. Reproducibility of the measurements was determined by making three measurements on each femur on the same day, with repositioning between scans. DEXA scan was performed on the right femur of the 96 rats, after it was excised, and it was then submerged in 2.5 cm water for BMC and BMD determinations.

Statistical Analysis

Analysis of variance (two-way ANOVA) was used to compare groups (control and NS) and to determine whether differences over time were similar between the two treatment

groups (tested as the interaction term of group and time) (20). Cholesterol, GFR, urinary protein, urinary calcium, PTH, 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and urinary pyridinoline required a log transformation to satisfy the assumption of normality. Unless otherwise stated all *p* values given are for the significance of the time-by-group interaction term. Each point on the figures represents the mean \pm SD of 6 determinations. A probability less or equal to 0.05 was considered significant.

RESULTS

All rats injected with PAN showed edema, ascites (2 to 10 mL), massive proteinuria, hypoproteinemia, and hypocalcemia. Proteinuria began 4 days after PAN injection, reaching a maximum value 28 days later (day 28) and remaining high until day 112 [Fig. 1(a)]. Total serum protein decreased, reaching the lowest value on day 7, and then rose to reach control values by day 112 [Fig. 1(b)]. Serum cholesterol concentration increased from day 7 to day 84, as shown in Table 1, and body weight was decreased compared to control rats after PAN injection ($p < 0.001$) (Table 1). Urinary volume increased the day after ascites and edema were evident (day 7), and remained high until day 112 (Table 1). Creatinine clearance was not different between groups ($p = \text{NS}$) (Table 1).

All rats with NS had lower total and ionized serum calcium concentration over the study period (Table 2). Urinary calcium excretion was increased and significantly different on day 56 ($p < 0.002$) (Table 2).

No differences were found in serum phosphorus over the study period; however, urinary phosphorus increased significantly on day 42 ($p < 0.001$) (Table 2). Serum PTH was increased in the NS group compared to control group from day 7 through day 84 ($p < 0.003$) (Table 3). Mean serum 25-OH vitamin D concentration was lower in rats with NS versus control rats on days 7–84, although the mean values appeared to return to normal by the end of the study. Serum 1,25(OH)₂D also decreased in nephrotic rats ($p < 0.001$), returning to control values by day 84 of the study (Table 3).

Biochemical Bone Markers

Serum osteocalcin concentrations increased initially on day 7 and returned to control values by day 56 (Fig. 2(a)). These changes over time differed significantly depending upon the group ($p < 0.001$). The change over time in alkaline phosphatase concentration also differed by group, with the NS rats having lower concentration than the control group ($p = 0.002$) (Fig. 2(b)). On the contrary, there was a peak of excretion of hydroxyproline in urine of NS rats on day 7 and slightly higher excretion from day 14 to day 112 (Fig. 3(a)). Pyridinoline excretion in urine was slightly higher in the nephrotic rats; however, there was no significant difference between groups (Fig. 3(b)). DXA scans in the femur showed lower BMC in NS versus controls following PAN treatment ($p < 0.001$), returning to control values on day 112 (Fig. 4(a)). BMD showed similar results, with the mean BMD between groups varying over time ($p < 0.001$) and reestablishing at control values on day 84 (Fig. 4(b)).

DISCUSSION

PAN has been widely used to produce nephrosis in rats (11–14,21–34). PAN is a product of the hydrolytic cleavage (Edman degradation) of the antibiotic penicillin (35). Unlike

This page runs 1 line long

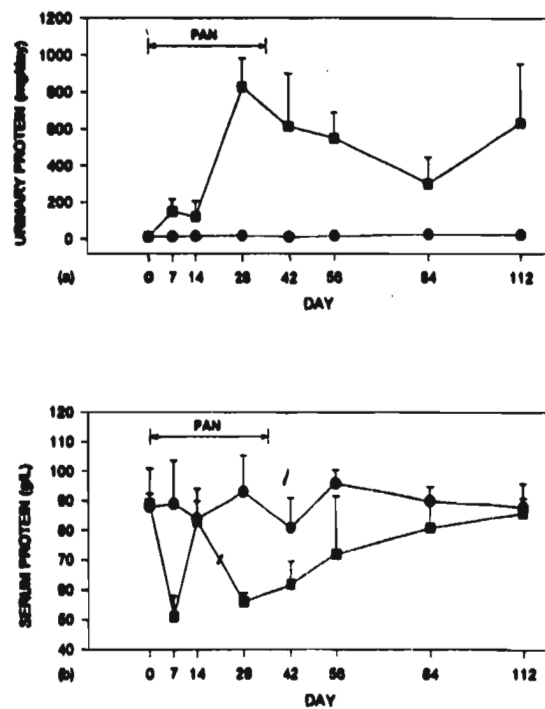


Figure 1. Urinary protein excretion (a) and serum protein concentration (b) in control (●) and nephrotic (■) rats from day 0 to day 112 of the study. Interaction term of group \times time $p < 0.001$ for both parameters.

puromycin, PAN is not a specific inhibitor of protein synthesis (36,37). The similarities between metabolic alterations and the glomerular lesions of the PAN-treated rats and human nephrotic syndrome have made PAN-treated rats a useful experimental model for this human condition (11,13,21,38-40). Human and experimental nephrosis are characterized by profound alterations in the metabolism of plasma proteins (14,21-25,27,28,30-34,41-44). In order to investigate the bone and mineral metabolism in PAN-nephrotic rats,

This page runs 1 line long

Table 1
 Mean (\pm SD) of 6 Control and 6 PHN-Nephrotic Rats for Screen Cholesterol, Body Weight, Urinary Volume, and Creatinine Clearance

Text	Group	Day						P		
		0	7	14	28	42	56			
Screen cholesterol (mmol/L)	Control	21 \pm 7	16 \pm 3	20 \pm 4	26 \pm 5	20 \pm 3	17 \pm 2	17 \pm 5	21 \pm 5	0.001
	Nephrotic	34 \pm 4	88 \pm 27	63 \pm 22	89 \pm 16	93 \pm 24	108 \pm 20	40 \pm 16	34 \pm 15	
Body weight (g)	Control	226 \pm 21	279 \pm 16	292 \pm 34	346 \pm 39	388 \pm 44	432 \pm 53	498 \pm 31	483 \pm 23	0.001
	Nephrotic	230 \pm 32	236 \pm 14	263 \pm 46	340 \pm 33	362 \pm 16	272 \pm 25	400 \pm 39	477 \pm 46	
Urinary volume (mL)	Control	12 \pm 5	11 \pm 3	9 \pm 3	13 \pm 3	11 \pm 2	10 \pm 3	13 \pm 2	15 \pm 6	0.003
	Nephrotic	7 \pm 3	16 \pm 11	9 \pm 5	18 \pm 6	20 \pm 7	25 \pm 7	7 \pm 3	27 \pm 13	
Creatinine clearance (mL/min)	Control	0.7 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5	0.7 \pm 0.3	2 \pm 0.7	1.2 \pm 0.2	1.7 \pm 0.6	1.6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.9	NS
	Nephrotic	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.7	2 \pm 0.4	1.9 \pm 0.2	

Table 3
 Mean (\pm SD) of 6 Control and 6 Nephrotic Rats for Serum Paraoxytol Metabolites (PTH),
 Metabolites D-25-Hydroxy (VID-25OH), and Metabolites D-1,25-Dihydroxy (VID-1,25OH)₂

Test	Group	Day											P
		0	7	14	28	42	56	84	112				
PTH (ng/L)	Control	31 \pm 7	26 \pm 2	27 \pm 5	34 \pm 7	33 \pm 6	27 \pm 4	21 \pm 2	23 \pm 4			0.03	
	Nephrotic	24 \pm 5	41 \pm 17	41 \pm 22	59 \pm 25	94 \pm 52	69 \pm 34	33 \pm 5	37 \pm 15				
VID-25OH (nmol/L)	Control	23 \pm 4	45 \pm 15	30 \pm 7	33 \pm 5	34 \pm 4	39 \pm 7	34 \pm 6	31 \pm 9			0.001	
	Nephrotic	23 \pm 6	1 \pm 0	17 \pm 6	2 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 1	4 \pm 3	23 \pm 9				
VID-1,25(OH) ₂ (pmol/L)	Control	102 \pm 4.9	123 \pm 28	121 \pm 33	119 \pm 33	104 \pm 29	92 \pm 17	66 \pm 22	63 \pm 24			0.001	
	Nephrotic	80 \pm 27	49 \pm 14	79 \pm 10	51 \pm 12	53 \pm 4.1	28 \pm 7.4	74 \pm 30	60 \pm 6				

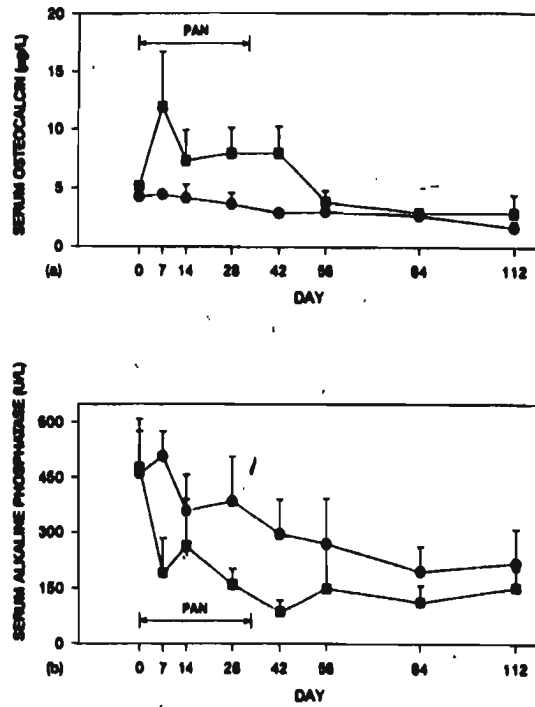


Figure 2. Serum osteocalcin concentration (a) and serum total alkaline phosphatase concentration (b) in control (O) and nephrotic (●) rats from day 0 to day 112 of the study. Interaction term of group \times time $p < 0.001$ for osteocalcin and $p = 0.002$ for alkaline phosphatase.

we studied the biochemical bone markers, bone mineral content, and bone mineral density in rats with NS induced with PAN, which was characterized by persistent proteinuria along the 112 days of study. Proteinuria was more evident on days 28–56. Hypoproteinemia and marked hypercholesterolemia were seen already on these days. By the end of the study the concentration of total serum protein returned to control values in spite of the proteinuria. These data indicate that nephrotic rats have developed in adaptive response in such a way that protein synthesis compensated the urinary losses of plasma protein.

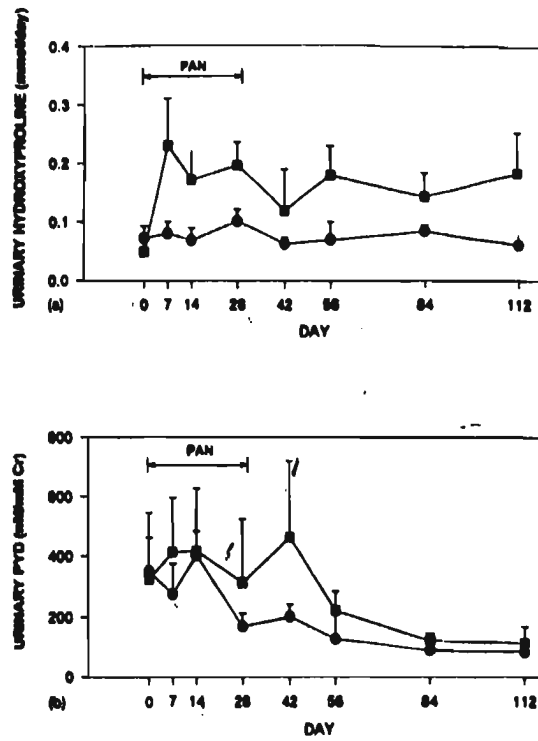
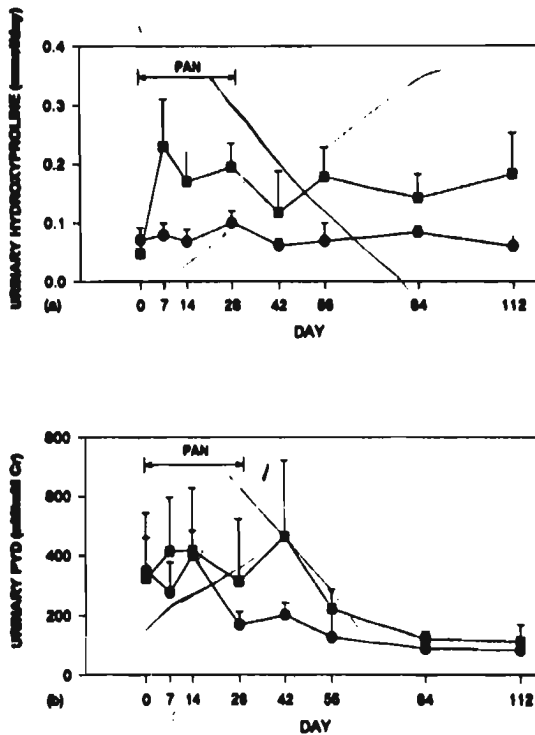


Figure 3. Urinary hydroxyproline excretion (a) and urinary pyridinoline (Pyd) excretion (b) in control (●) and nephrotic (◐) rats from day 0 to day 112 of the study. Interaction term of group \times time $p < 0.001$ for hydroxyproline and $p = NS$ for pyridinoline.

Bone Metabolism in Nephrotic Syndrome

417



31-0
see attached
correct
Fig 4

Figure 4. Bone mineral content (a) and bone mineral density (b) in the femur of control (O) and nephrotic (●) rats from day 0 to day 112 of the study. Interaction term of group \times time $p < 0.001$ for both parameters.

Clinical and experimental nephrosis is associated with marked abnormalities of calcium and vitamin D metabolism that cannot be accounted for by the associated hypoalbuminemia alone (43). Our rats showed transitory alterations in calcium metabolism. They had low levels of total and ionized serum calcium, and low circulating values throughout the study (44-48). It has been shown that serum ionized calcium, urinary calcium excretion,

and intestinal absorption of calcium are frequently reduced in the nephrotic syndrome (4,49-52).

Several studies have documented the occurrence of osteomalacia and hyperparathyroidism in this population (4,6). Plasma concentrations of various vitamin D metabolites, including 25-OHD₃ and 1,25(OH)₂D₃, are reduced in the nephrotic syndrome (4,6,45-57), indicating an altered vitamin D metabolism as a possible cause of these abnormalities. Reduced plasma concentration of 25-OHD₃ is associated with, and largely due to, massive urinary/renal losses of this prohormone along with its binding protein (vitamin D binding protein) (45,54-57). While the mechanism of reduced plasma 25-OHD₃ concentration is reasonably clear, the reason for demonstrated reduction in 1,25(OH)₂D₃ (calcitriol), the active hormonal form of vitamin D, is less evident. Massive urinary loss may limit the availability of 25-OHD₃ for conversion to calcitriol (6,49). Normal intestinal absorption of vitamin D, demonstrated by *in vivo* perfusion experiments in nephrotic rats, has excluded the possible role of vitamin D malabsorption as the main cause (57). In addition, impaired calcitriol biosynthesis due to diminished 25-OHD₃-1 hydroxylase activity has been demonstrated in kidneys from rats with PAN-induced nephrosis (58).

The impact of these abnormalities on the skeleton in humans with NS has been studied in several ways (59,60) but not experimentally in rats with PAN-induced NS and not using DEXA as a tool to detect bone loss. Biochemical evidence of secondary hyperparathyroidism in NS is suggested by the finding of elevated levels of PTH in many of these patients (4,6,61), showing generalized decalcification of the skeleton (62) and noted osteoporosis in steroid-treated nephrosis (5). Rickets were seen in nephrotic children with clinical bone disease (59,60). No radiological evidence of hyperparathyroidism or osteomalacia was found in adult patients with NS; however, bone histology performed in nephrotic patients revealed mild osteoporosis (62) and osteomalacia (4). In addition, features of active secondary hyperparathyroidism and bone resorption were present. Chesney et al. (64) indicated that the steroid therapy rather than the disease itself is responsible for reduced BMD. Our rats with PAN-induced NS did not receive steroid treatment; however, elevated PTH and reduced BMC and BMD were observed in the nephrotic group.

Currently, bone GLA protein (BGP), or osteocalcin (65,66), is the most abundant of the noncollagenous proteins found in bone, accounting for about 25% of the total in adults. It is thought to represent a specific index of bone turnover, rather than of formation alone (67). Levels are abnormal in patients with metabolic bone disease characterized by increased bone turnover such as renal osteodystrophy (68) and Paget's disease (65). BGP is also elevated by PTH and lowered by calcitonin (65,69,70). In addition, plasma elevations of BGP reflect increased bone turnover rather than decreased renal filtration in patients with GFR greater than 30 mL/min/1.73m² (71). High concentrations of serum osteocalcin are present in primary and secondary hyperparathyroidism (66). Other studies indicate that osteocalcin concentration in the circulation may be acutely regulated by calcium and/or PTH (73). In our study, serum osteocalcin concentration in rats with PAN-induced NS increased from day 7 to day 56, returning to control levels by the end of the study, when serum protein concentration was in the normal range. This finding strongly indicates an increase in bone turnover and bone formation activity. However, serum alkaline phosphatase enzymatic activity was not useful in determining skeletal assessment (74). It been shown by Padraza-Chaverri et al. that the activity of ALP in PAN-induced nephrotic syndrome is decreased (75). Others found that ALP is also eliminated in urine of PAN nephrotic rats (76). These facts may preclude that ALP can be used as a marker for bone formation in NS.

Nephrotic patients excreted higher amounts of hydroxyproline in urine compared to normals (77). In addition, urinary levels of hydroxyproline reflect the turnover of extracellular as well as skeletal proteins (78), and it is the noncollagenous proteins of bone which constitute only 5-10% of its organic phase.

Determination of urinary excretion of collagen pyridinium cross-links (pyridinoline and deoxypyridinoline), present in the mature form of collagen, is becoming the state-of-the-art methodology to measure bone resorption (79). In this work, although pyridinoline excretion followed the same general pattern as hydroxyproline excretion and is thought to accurately reflect the breakdown of type I collagen of bone, we found no group difference in the urinary excretion of pyridinoline in rats with PAN-induced NS. On the other hand, BMC and BMD by DEXA scans were useful tools to study the effect of PAN-induced NS in bone. PAN-nephrotic rats showed lower BMC and lower BMD by DEXA scans than control rats, confirming human data showing generalized osteopenia.

The secondary hyperparathyroidism present in this disease seems to have a short effect, or not effect at all, in demineralizing the osseoid. On the other hand, our data clearly indicate that PAN-nephrotic rats developed increase bone turnover, which was evident by high levels of OC, and increase excretion of OH proline. During the intense proteinuria, bone resorption predominates, which causes bone mineral content and density to decrease. At the end of the study, when serum protein was within the normal range, the biochemical bone markers and BMC and BMD returned to control values. The determination of bone markers served to estimate the bone turnover process that took place during the chronic stage of this disease. Our results showed that in the PAN-nephrotic rats, with normal creatinine clearance, these two mechanisms—bone formation and bone resorption—are related to the magnitude of proteinuria. This alteration does not seem to cause a permanent damage in bone.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Kay Ellis, Emily Hall, Gemma Utrecht, and Mario Medvedovic for their excellent technical assistance. Thanks are given to Mona Ho, MS, for assistance in analyzing the data.

REFERENCES

1. Karkar A, Schwartz J, Bergfeld M, Teitelbaum S, Avioli L, Klehr S, Stetopolsky E: Absence of metabolic bone disease in adult patients with the nephrotic syndrome and normal renal function. *J Clin Endocrinol Metab* 36:496-500, 1983.
2. Lim P, Jacob E, Chio LF, Posa HS: Serum ionized calcium in nephrotic syndrome. *Q J Med (New Ser)* 45:421-426, 1976.
3. Mazzio G, D'Angelo A, Bonuccio E, Pagano P, Ossi E, Lupo A, Valvo E, Toskano N, Massa P: Aspects of calcium metabolism in obstructive nephropathy: a metabolic and bone biopsy investigation. *Nephron* 19:32-43, 1977.
4. Mallock H, Goldstein DA, Masary SG: Osteomalacia and hyperparathyroid bone disease in patients with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 63:494-500, 1979.
5. Jones JM, Peters DK, Morgan DB, Coles GA, Mallick NP: Observations on calcium metabolism in the nephrotic syndrome. *Q J Med* 36:301-320, 1967.
6. Goldstein DA, Haldiman B, Sherman D, Norman AW, Masary SG: Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J Clin Endocrinol Metab* 33:116-121, 1981.

7. Mueller, KH, Tries A, Ray RD: Bone density and composition. *J Bone Joint Surgery (Am)* 48:140-148, 1966.
8. Frost HM: *Bone Remodeling and Its Relationship to Metabolic Bone Disease*. Springfield, IL, CC Thomas, 1973, p 92.
9. Wronski TI, Clinton M, Doherty AL, Dane LM: Estrogen treatment prevents osteoporosis and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 123:681-686, 1988.
10. O'Brien MG, Kimble R, Nopler W, Pacifici R: Dual energy x-ray absorptiometry of the rat: accuracy, precision, and measurement of bone loss. *J Bone Miner Res* 8:795-800, 1993.
11. Pinesh E, Antonowicz I, Craig JM, Metcalf J: Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside, renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:424-427, 1955.
12. Pyo HJ, Seminars EN, Nieldberger M, Kim JK, Schrier RW: Arginine vasopressin gene expression in rats with puromycin-induced nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 25:58-62, 1995.
13. Vernier RL, Papernaster BW, Good RA: Aminonucleoside nephrosis. I. Electron microscopic study of the renal lesion in rats. *J Exp Med* 109:115-126, 1959.
14. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Barro-Rubio ME, Chavez MT, Calleja E, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC: Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 42:29-38, 1990.
15. Commission on Care and Use of Laboratory Animals: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, 1965.
16. Lowry OH, Rosebrough NI, Farr AL, Randall RJ: Protein determination with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
17. Herz RL, Reinhold TA, Nellis BW: Improved methodology for the analysis of plasma vitamin D metabolites. *Kidney Int* 38:828-835, 1990.
18. Podgheant J, Larzon ME, Chelstnason C: An easy and reliable method for the determination of urinary hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 142:145-148, 1984.
19. Seyedin SM, Kung VT, Donloff YN, Mesley RP, Gomez B, Nielsen LA, Rosen HN, Zuk RF: Immunostay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 8:633-642, 1993.
20. Walloonsis S, Zecher CL, Fleiss JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47:1-9, 1980.
21. Bernard DB: Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. In Brenner BM, Stein JH (eds), *The Nephrotic Syndrome. Contemporary Issues in Nephrology*, vol 9. New York, Churchill Livingstone, 1983, pp 85-119.
22. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chavez MT, Lopez A, Barro-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* 42:120-126, 1990.
23. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chavez MT, Barro-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* 42:210-216, 1990.
24. Lewandowski AE, Liar WSW, Simpson-Fisher CA, Kent J, Jefferson L: Effect of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 254:C634-C642, 1988.
25. Boonman M, Oldfield S, MacIntosh ICM, Michael J, Adis D: Hypogammaglobulinemia in nephrotic rats is attributable to hypercatabolism of IgG. *Clin Exp Immunol* 74:425-430, 1988.
26. Ricardo SD, Borstrom JF, Ryan OB: Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis: in vitro studies. *Kidney Int* 45:1057-1060, 1994.
27. Barro-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC, Pedraza-Chaverri J: Serum angiotensin converting enzyme activity and plasma renin activity in experimental models of rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 17:391-399, 1990.
28. Arévalo AE, Barro-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J: Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 191:175-184, 1990.
29. Liang KH, Oveisi F, Vaziri ND: Gene expression of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase in the course of puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int* 49:855-860, 1996.
30. Levy E, Ziv E, Bar-On H, Shafit E: Chylomicron synthesis in experimental nephrotic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1005:30-36, 1989.
31. Chaverri J, Calandra S: Plasma and urinary lipids and lipoproteins during the development of nephrotic syndrome induced in the rat by puromycin aminonucleoside. *Biochim Biophys Acta* 710:188-196, 1981.

32. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Barro-Rabito ML, Hernández C, Tapia E, Peña JC: Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 57:106-108, 1991.
33. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Sandoval AA, Tapia E, Peña JC: Effect of captopril on urinary excretion of renin and angiotensinogen in aminonucleoside nephrosis. *Renal Failure* 14:153-159, 1992.
34. Bhadli R, Levy E, Duchalban R: Urinary excretion of apolipoproteins bound to HDL-like particles in rat nephrotic syndrome and their relation to plasma HDL. *Nephron* 56:24-29, 1990.
35. Baker BR, Joseph RP, Williams JHF: Puromycin synthetic studies. VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 76:2838, 1954.
36. Ciani W, Hattema B, van der Horst MLC, Wessling JJ: Puromycin aminonucleoside and adriamycin disturb cytoskeletal and extracellular matrix protein organization, but not protein synthesis of cultured glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 2:40-50, 1994.
37. Chow SC, Peters I, Orrenius S: Reevaluation of the role of the *de novo* protein synthesis in rat thymocyte apoptosis. *Exp Cell Res* 216:149-159, 1995.
38. Ueda N, Baliga R, Shalh SV: Role of "catalytic" iron in an animal model of minimal change nephrotic syndrome. *Kidney Int* 49:370-373, 1996.
39. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB: Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tacrolimus or olipropast. *Exp Nephrol* 3:270-279, 1995.
40. Pedraza-Chaverri J, Arévalo AB, Hernández-Pando R, Larriva-Sald J: Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *Int J Biochem Cell Biol* 27:583-591, 1995.
41. Glassock RJ, Cohen AH, Adler SG: Primary glomerular diseases. In Brenner BM (ed), *The Kidney*, vol 2. Philadelphia, WB Saunders, 1996, pp 1382-1497.
42. Yagama K, Kanishi K, Ohta A, Takano M, Ohana R, Itoh N, Okamoto H: Elevation of plasma angiotensinogen in rats with experimentally induced nephrosis. *Nephron* 63:89-93, 1993.
43. Vaisri ND, Gostales E, Barnes CH, Chen HT, Nguyen Q, Arquilla M: Factor XIII and its substrates, fibrinogen, fibrinogen, and $\alpha 2$ -antiplasmin, in plasma and urine of patients with nephrosis. *J Lab Clin Med* 117:152-156, 1990.
44. Vaisri ND, Brennan HE, Ness B: Changes of coagulation factors IX, VIII, VII, X, and V in nephrotic syndrome. *Am J Med Sci* 280:167-171, 1980.
45. Vaisri ND: Endocrinological consequences of the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 13:360-364, 1993.
46. Goldstein DA, Oda Y, Kurakawa K, Masary SG: Blood levels of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. *Ann Int Med* 87:664-667, 1977.
47. Tancioni N, Benucci E, D'Angelo A, Lund B, Cagnani A, Lund B, Valvo E, Lupo A, Lasciavo C, Fabris A, Marchio G: Bone histology and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal or reduced renal function. *Nephron* 37:153-159, 1984.
48. Pevselschik M, Bourgeois JJ, Zillervelo G, Abitbol C, Canterbury JM, Struss J: Calcium and vitamin D metabolism in children with nephrotic syndrome. *J Pediatr* 108:383-387, 1986.
49. Ahan U, Chan JCM: Calcium and vitamin-D metabolism in nephrotic syndrome. *Int J Pediatr Nephrol* 4:115-118, 1983.
50. Aarvold J, De Keyser L, Bouillon R, De Moor P: Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron* 42:231-235, 1986.
51. Heilmann B, Truchel U: Vitamin D replacement therapy in patients with the nephrotic syndrome. *Miner Elect Metab* 9:154-156, 1983.
52. Lambert PW, De Oros PB, Pe IV, Kozart DM, van Ahn K, Hollis BW, Rees BA: Urinary and plasma vitamin D₃ metabolites in the nephrotic syndrome. *Met Bone Dis Rel Res* 4:7-15, 1982.
53. Kato K, Nonaka A, Yamashita H, Suda T: Serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in patients with various types of renal disease. *Clin Nephrol* 14:274-279, 1980.
54. Shimotoji T, Hagiwara T, Seino Y, Yamaoka K, Ishi T, Ishida M, Matsuda I, Kishara C, Yamabuchi H: A specific competitive protein binding assay for serum 24,25-dihydroxyvitamin D in normal children and patients with nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 106:145-154, 1980.
55. Baumgart JM, Cutler ND, Beer M, France MW, Aston JA, Boucher BJ, Cohen RD: Vitamin-D metabolism in nephrotic syndrome. *Lancet* 2:629-632, 1977.
56. Ede KA, Gray RW, Lemans J Jr: Urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in health and the nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 99:325-330, 1982.
57. Khamisul G, Vaisri ND, Oweisi F, Ahmadia MR, Ahmedia L: Vitamin D absorption, plasma concentrations and urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:210-215, 1991.

58. Mizokuchi A, Kubota M, Tomino Y, Koide H: Possible mechanism of impaired calcium and vitamin D metabolism in nephrotic rats. *Kidney Int* 42:335-340, 1992.
59. Sticker GB, Hayles AB, Power MH, Ulrich JA: Renal tubular dysfunction complicating the nephrotic syndrome. *Pediatrics* 26:75-85, 1960.
60. Sticker GB, Resorver JW, Ulrich JA: Renal tubular dysfunction complicating the nephrotic syndrome: the disturbance in calcium and phosphorus metabolism. *Proc Mayo Clin* 37:376-388, 1962.
61. Schmidt-Gayk H, Grossvelder C, Tshope W, Schmitt W, Ritz E, Pietzsch V, Andraszy K: 25-Hydroxy-vitamin D in nephrotic syndrome. *Lancet* 2:105-108, 1977.
62. Emmon K Jr, Backman WW: Calcium metabolism in nephrosis. I. A description of an abnormality in calcium metabolism in children with nephrosis. *J Clin Invest* 24:564-572, 1945.
63. Lim P, Jacob E, Teck EPC, Pwee HS: Calcium and phosphorus metabolism in nephrotic syndrome. *Q J Med (New Ser)* 46:327-338, 1977.
64. Chanay RW, Maness RB, Ross P, Jax DK: Effect of prednisone on growth and bone mineral content in childhood glomerular disease. *Am J Dis Child* 132:768-772, 1978.
65. Price PA, Nishimoto SK: Radioimmunoassay for the vitamin K dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2234-2238, 1980.
66. Slovick DM, Gundberg CM, Neer RM, Lian JB: Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting. *J Clin Endocrinol Metab* 59:228-230, 1984.
67. Auri M: Value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 45:7-11, 1989.
68. Mallick HH, Panti P, Pongrove MC, Price PA: Plasma levels of bone Gla-protein reflect bone formation in patients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int* 26:869-874, 1984.
69. Deffen LJ, Parfitt AM, Price PA: Changes in plasma bone Gla-protein during treatment of bone disease. *Calcif Tissue Int* 34:121-124, 1982.
70. Rico H, Baplanis D, Del Rio A, Hernandez ER: Treatment of postmenopausal and calcium-long-term results. *Proc 2nd Int Conf on Osteoporosis, Athens, 1985*, pp 376-380.
71. Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, Riggs BL: Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocrinol Metab* 57:1028-1030, 1983.
72. Guillemain J, Guillemain S: Plasma osteocalcin in primary and secondary hyperparathyroidism with regard to daily fluctuations. *Horm Metab Res* 21:220-221, 1989.
73. Gundberg CM, Grant PD, Coe LN, Chou CJ, Brown EM, Johnson PJ, LeBoff MS: Acute changes in serum osteocalcin during induced hypocalcemia in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 72:438-443, 1991.
74. Deffen LJ: Bone protein and peptide assay in the diagnosis and management of skeletal disease. *Clin Chem* 37:1143-1148, 1991.
75. Pedrazz-Chaverri J, Cruz C, Tapia E, Peña JC: Activity of serum enzymes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Renal Failure* 14:523-531, 1992.
76. Price RG, Ellis BG: Urinary enzyme excretion in aminonucleoside nephrosis in rats. *Chem-Biol Interact* 13:353-358, 1976.
77. Mani UV, Mani I: Altered urinary excretion of hydroxyproline in nephrotic syndrome patients. *J Clin Biochem Nutr* 6:155-158, 1969.
78. Krane E, Muller AJ, Harris ED Jr: Urinary polypeptides related to collagen synthesis. *J Clin Invest* 49:716-729, 1970.
79. Delmas PD: Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocr Metab Clin No Am* 19:1-17, 1990.