



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN FUNCIONAL DEL EJE
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADA EN
EL SÍNDROME NEFRÓTICO AGUDO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA
BIOL. LAURA CATALINA DÍAZ BONILLA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUNIO, 2002

00346
4



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.

DEDICATORIA.

Llegar a este momento ha significado mucho esfuerzo, tiempo y paciencia no solo de mi parte sino de toda mi familia, por ello quiero agradecerles a todos ellos su apoyo. Ser parte y ahora formar una familia es una de las más grandes bendiciones que Dios me ha dado.

A m hijo Omar Jesús (Pushi).

Gracias hijo por darme el honor de ser tu mamá, de verte crecer, de estar junto a ti y de hacerme sentir de nuevo una niña y dejarme ver el mundo a través de tus ojitos. Tu presencia es todo lo que nos faltaba a tu papá y a mi.

A mi esposo Omar

Gracias Omar porque siempre cuento contigo. Tu amor es el sostén de mi vida, todo lo que hago siempre tiene algo de tí.

A mis papás Ramón y Lulú:

Gracias por apoyarme en todo. Ahora no solo fue su amor el que me dio fuerza para seguir adelante, además me regalaron la tranquilidad de saber que cuidan a mi hijo mientras desarrollaba este trabajo y sin eso tal vez no lo hubiera terminado. Ustedes son muy importantes para mí.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a todos los sinodales por su tiempo para revisar esta tesis. Al Dr. José Pedraza, a la Dra. Ma. Teresa Benítez, a la Dra. Marta Menjívar, a la Dra. Elena Zambrano, a la Dra. Ma. Luisa Fanjul, al M. en C. Mario Cárdenas y a la M. en C. Guadalupe Ortiz.

Gracias a la Dra. Marta Menjívar y al M. en C. Mario Cárdenas, por toda su ayuda técnica y académica y por su disposición para enseñarme más del tema y resolver mis dudas. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo.

RESUMEN

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad renal que se caracteriza por la presencia de profundos cambios metabólicos, principalmente proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia. Estas alteraciones son consecuencia directa o indirecta de un aumento en la permeabilidad glomerular lo que permite una filtración excesiva de proteínas del plasma al espacio urinario. La causa primaria de este aumento en la filtración es la alteración de la barrera de filtración glomerular que al microscopio electrónico se observa como un borramiento de los podocitos y desprendimiento de la lámina rara externa. Esta enfermedad se presenta en el 15 a 20 % de los adultos con SN idiopático y predominantemente afecta al sexo masculino. Los cambios metabólicos son generalmente reversibles pero con recaídas frecuentes. En estudios previos, nuestro grupo encontró que en las ratas nefróticas macho y hembra existe una disfunción endocrina ya que se presenta hipogonadismo-hipogonadotrópico. El presente trabajo tuvo como objetivo principal investigar el estado funcional de la hipófisis y gónadas (ovario y testículo) en el SN experimental mediante pruebas dinámicas.

El SN se indujo administrando una sola dosis subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP, 150 mg/Kg de peso) a ratas adultas Wistar de ambos sexos, los grupos controles recibieron solución salina. Se evaluó la función endocrina en base a las concentraciones hormonales, ciclo estral y peso de los tejidos andrógeno dependientes. Todas las mediciones se realizaron los días 3, 7 y 10 después de la inyección de ANP para investigar si alguna de las unidades del eje hipotálamo-hipófisis-gónada se altera y origina las disfunciones previamente mencionadas. Las alteraciones metabólicas se valoraron con la medición de proteínas en suero y en orina y de colesterol en suero. En suero se realizó también la cuantificación de la hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), progesterona (P4), testosterona (T), estradiol (E2) y androstendiona por radioinmunoanálisis (RIA). Se evaluó la respuesta de la hipófisis de ratas controles y nefróticas de ambos sexos a un estímulo de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) (300ng/100g de peso) y de la unidad gonadal con la administración de una o cuatro dosis de la hormona gonadotropina coriónica (hCG) (8UI/rata). Se colectó orina de 24 hr para la cuantificación de proteínas totales. Se registraron los pesos de los animales así como de los tejidos andrógeno dependientes, próstata ventral y vesícula seminal, en las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ratas macho. En las ratas hembra se monitoreó el ciclo estral mediante exudados vaginales antes y después de la inducción del SN

Los resultados mostraron que el ciclo estral se perdió a partir del día 4 de la inducción del SN y permaneció en diestro hasta el día del sacrificio, las concentraciones de LH, P4 y E2 de ratas hembras nefróticas disminuyeron significativamente respecto a los grupos control, mientras que las de LH, FSH, A, T, y E2 disminuyeron significativamente en machos nefróticos con respecto al grupo control. En respuesta a la baja concentración de andrógenos se observó una disminución significativa en el peso de los tejidos andrógeno dependientes (vesícula seminal y próstata ventral). La secreción de LH y FSH después de la administración de LHRH a ratas machos nefróticas fue menor que la de los grupos controles en cada uno de los tiempos establecidos. En las ratas hembras nefróticas se encontró que la respuesta de LH fue disminuída con respecto a los controles y que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de FSH de los grupos controles y nefróticos. Los datos de secreción de hormonas esteroides en ratas macho después de la administración de hCG revelaron que no hubo diferencias significativas entre los grupos control y nefrótico en la secreción de P4 y T, pero sí en las concentraciones de E2. En las hembras nefróticas se observó que la secreción de P4 y E2 se encontró disminuída significativamente el día 10.

Nuestras conclusiones son las siguientes: 1) Existe una disfunción en ambas unidades del eje hipófisis gónada durante el SN experimental. 2) Las alteraciones hormonales que se presentan en el SN se instalan al mismo tiempo que las anomalías bioquímicas (día 7). 3) La respuesta atenuada de la hipófisis de animales nefróticos posiblemente fue el reflejo de una disminución en su síntesis o de una respuesta parcialmente alterada al estímulo que se originó desde el receptor. 4) La respuesta de las gónadas en ambos sexos al estímulo de hCG reflejó una alteración en la ruta esteroidogénica, que en los machos se presenta en la síntesis de estradiol y en las hembras desde progesterona.

Proponemos, de acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo, que la enzima de la ruta esteroidogénica que se altera en ambos sexos es la P₄₅₀ aromatasas, ya que los niveles de E2 fueron prácticamente indetectables. Esto pudiera deberse a una disminución muy marcada en la síntesis de esta enzima o a una disminución en su actividad.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN.

I.	INTRODUCCIÓN.	
I.1.	Eje Hipotálamo- Hipófisis- Gónada	3
I.1.1.	Hormonas hipotalámicas	4
I.1.1.1.	Mecanismos de acción de LHRH.	5
I.1.2.	Hormonas hipofisiarias.	6
I.1.2.1.	Mecanismos de acción de las gonadotropinas	7
I.1.2.1.1.	Función testicular de las gonadotropinas.	8
I.1.2.1.2.	Función ovárica de las gonadotropinas.	9
I.1.3.	Esteroidogénesis gonadal.	9
I.1.4.	Desarrollo folicular.	12
I.1.5	Ciclo estral	13
I.2.	El riñón.	14
I.3.	Síndrome nefrótico.	17
I.3.1	Características del síndrome nefrótico	17
I.3.2.	Causas del síndrome nefrótico.	18
I.3.3.	Enfermedad de cambios mínimos.	19
I.3.4.	Inducción experimental del síndrome nefrótico.	19
I.3.4.1.	Aminonucleósido de puromicina (ANP).	20
I.4.	Alteraciones endócrinas reproductivas.	22
II.	HIPOTESIS.	26
III.	OBJETIVO.	26
III.1.	Objetivos específicos.	26
IV.	MATERIALES Y METODOS.	
IV.1.	Diseño experimental.	27
IV.1.1.	Etapa I. Evaluación de la instalación del síndrome nefrótico.	27
IV.1.2.	Etapa II. Evaluación de la función hipofisiaria al estímulo con LHRH.	27
IV.1.3.	Etapa III. Evaluación de la función gonadal al	

	estímulo con hCG (1 y 4 dosis).	28
IV.2.	Reactivos.	28
IV.3.	Animales.	28
IV.4	Determinaciones bioquímicas	29
IV.5.	Determinaciones hormonales.	29
IV.6.	Análisis estadístico.	30
V.	RESULTADOS.	
V.1.	Ratas macho.	31
V.2.	Ratas hembra.	37
VI.	DISCUSION.	42
VII.	CONCLUSIONES.	46
VIII.	BIBLIOGRAFIA.	48
IX.	ARTICULOS ORIGINALES.	56

I. INTRODUCCION.

I.1. Eje hipotálamo - hipófisis - gónada.

El hipotálamo constituye el punto de unión entre el cerebro y la glándula hipofisiaria. La secreción de hormonas adenohipofisarias está controlada positiva y negativamente por factores hipotalámicos. Las hormonas hipofisarias liberadas a la circulación periférica, regulan el crecimiento celular, la diferenciación, así como, las actividades en los órganos blanco (Fig 1).

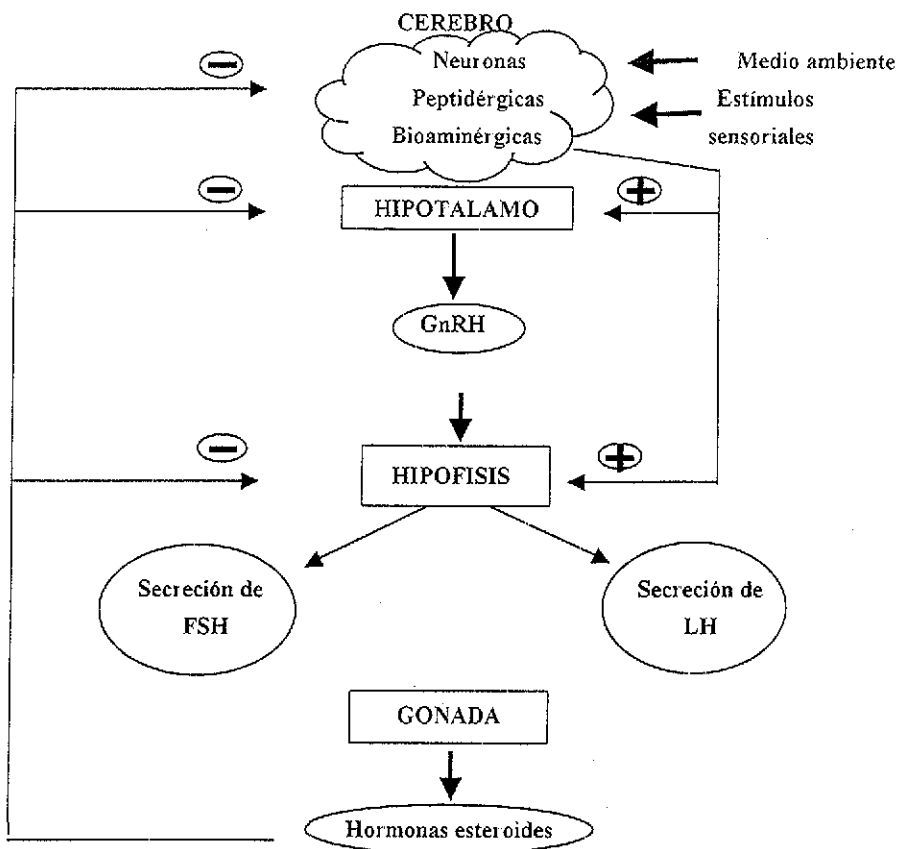


Figura 1. Esquema del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada. Comunicación entre las unidades y retroalimentación por medio de sus productos

Esta secreción de hormonas está controlada por el sistema nervioso central a través de reguladores hipotalámicos como la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH o GnRH)

El mantenimiento del medio ambiente interno requiere múltiples señales que convergen sobre el sistema neuronal del hipotálamo el cual, según el caso, provee a través de las hormonas hipofisiarias una respuesta endocrina metabólica específica

La íntima asociación anatómica y funcional de la glándula hipofisiaria con el hipotálamo se lleva a cabo entre la eminencia media hipotalámica y la adenohipófisis, por medio de un sistema vascular portal el cual provee un delimitado paso de sustancias provenientes del cerebro, tales como LHRH que es la responsable del control de la glándula hipofisiaria anterior (1)

En la conexión hipotálamo-hipófisis, la dirección del flujo sanguíneo se da principalmente en dirección a la hipófisis, la interrupción de esta conexión conduce a una disminución en los niveles de gonadotropinas así como una eventual atrofia gonadal y la consecuente falla en la secreción de esteroides (2) Existe también un flujo retrógrado en el sistema vascular portal, el cual constituye el asa corta del sistema de control por retroalimentación entre el hipotálamo y la hipófisis (3)

1.1.1. Hormonas hipotalámicas.

El hipotálamo juega un papel importante en la regulación de la función reproductiva. La secreción de las hormonas derivadas de la parte anterior de la hipófisis está controlada por el sistema nervioso central (SNC) a través de reguladores hipotalámicos uno de los cuales es LHRH (3)

El área preóptica y la región media basal del hipotálamo contienen importantes centros para el control de la secreción de gonadotropinas. Las neuronas peptidérgicas en esta región secretan LHRH. Las neuronas de otras regiones del cerebro presentan terminales en esta área e influyen la síntesis y liberación de LHRH vía mecanismos catecolaminérgicos, dopaminérgicos y otros más relacionados con endorfinas (4-5) El péptido LHRH constituye el vínculo humoral entre el componente neural y el endócrino de la función reproductiva (6).

La LHRH está constituida por 10 aminoácidos, tiene una vida media circulante de 2 a 4 minutos y se sintetiza inicialmente como una molécula precursora, la pre pro LHRH que consiste de 92 aminoácidos (7). La periodicidad de los pulsos de liberación de la LHRH ocurre cada 60 a 100 minutos en el hipotálamo medio basal adulto (8). Los sistemas catecolaminérgicos centrales ejercen efectos activadores moduladores mientras que, los opioides endógenos tienen un efecto inhibitor (9). La liberación pulsátil de LHRH varia en relación a la concentración circulante de las hormonas esteroides, por ejemplo, la liberación es máxima el día de la oleada preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) (10).

1.1.1.1. Mecanismos de acción de LHRH.

Después de que LHRH se une a su receptor en la membrana de los gonadotropos induce una serie de respuestas celulares que dan como resultado la biosíntesis y dimerización de las subunidades alfa y beta de LH y la hormona folículo estimulante (FSH), así como de los procesos de glicosilación. Este proceso es dependiente de calcio e independiente de AMPc, utiliza fosfoinosítidos como segundo mensajero y activación de proteína cinasa C (11).

LHRH está ampliamente distribuido en el SNC así como en otros tejidos. Sin embargo, su papel en sitios distintos de la hipófisis aún se desconoce. (12)

La regulación fisiológica de la liberación pulsátil de LH y FSH por medio de los pulsos apropiados de LHRH implica la interacción con los factores ováricos: estradiol, progesterona, inhibina, activina, folistatina, cuyo blanco son los gonadotropos, que inducen aumento o disminución del número de gonadotropos, cambios en la expresión de los genes de las subunidades alfa y beta de LH y FSH y secreción diferencial de estas hormonas (13). La liberación episódica y pulsátil de LHRH resulta en una liberación igualmente pulsátil de las gonadotropinas hipofisiarias y una respuesta episódica en las células blanco de LH y FSH. La cantidad de LH y FSH que se libera en respuesta a la LHRH depende de la edad y del estatus hormonal (1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.1.2. Hormonas hipofisarias.

Las hormonas hipofisarias que controlan a las gónadas son LH y FSH. Ambas hormonas son secretadas por las mismas células basófilas en la hipófisis anterior por estímulo de LHRH. LH y FSH al igual que la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica (hCG) son glicoproteínas compuestas de dos cadenas polipeptídicas denominadas subunidades alfa y beta (14)

La subunidad alfa en las cuatro hormonas es idéntica, parece ser que un único gen codifica para la expresión de esta subunidad la cual, se sabe, consta de 92 aminoácidos y dos cadenas laterales de carbohidratos (14)

La cadena beta de cada glicoproteína es la que finalmente determina las características inmunológicas y funcionales de cada hormona (15) La subunidad beta de LH y FSH está compuesta de 115 aminoácidos, una cadena lateral de carbohidratos en la LH y dos en la FSH La subunidad beta de la LH y la hCG son similares excepto en el extremo carboxilo de la hCG que contiene 30 aminoácidos adicionales y más residuos de carbohidratos (15) El peso molecular de la LH es aproximadamente de 28,000 y de FSH de 33,000 aunque este peso no es exacto por la gran variabilidad de los carbohidratos que constituyen estas moléculas. Los residuos de monosacáridos presentes en ambas gonadotropinas son manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido siálico (16-17).

Las diferencias dadas por el tipo y número de carbohidratos en las gonadotropinas son responsables de la variación en los puntos isoeléctricos y en la vida media de las isoformas de estas moléculas. En general la forma más alcalina de LH tiene una mayor potencia biológica pero se retira de la circulación rápidamente. La isoforma más ácida es menos activa y se metaboliza lentamente, por lo que las concentraciones circulantes son altas (1). En el caso de la FSH la remoción enzimática del ácido siálico conduce a una disminución de su vida media plasmática circulante (16-17). La vida media de la LH se describe con un comportamiento exponencial en dos fases: una inicial de 40 minutos y la segunda de 120 minutos La hCG por estar más glicosilada, presenta una vida media aún mayor (18). La tasa de depuración metabólica de la LH es de 25 ml/min (19). Solo una pequeña fracción de la LH secretada aparece en orina (20) La FSH tiene una vida media con un comportamiento doble exponencial como la LH y sus vidas medias son de 3.9 y 70 h en cada fase (21) La tasa de depuración de FSH es de 14 ml/min (22).

Se han aislado gonadotropinas de las hipófisis de muchas especies, incluyendo humanos, vacas, cerdos y ratas así como anfibios, peces y una variedad de otros vertebrados lo que indica que es una molécula altamente conservada(23).

I.1.2.1. Mecanismo de acción de las gonadotropinas.

Tanto la LH como la FSH se secretan en forma coordinada para regular la maduración y función del testículo y el ovario así como la gametogénesis y la esteroidogénesis. Ambas ejercen sus efectos en las gónadas, inicialmente a través de la unión con los receptores de membrana de alta afinidad y con excepción del receptor de LH-hCG, son específicos para cada hormona. Estos receptores son glicoproteínas y están constituidos por siete dominios transmembranales (24-25). La unión de la hormona con el receptor activa la proteína G unida a un nucleótido de guanidina que a su vez activa la adenilato ciclasa y aumenta la concentración de AMPc como segundo mensajero. Este proceso lleva finalmente a la síntesis y secreción de hormonas esteroides. La síntesis y secreción de LH y FSH se regula positiva o negativamente por las concentraciones de estradiol y progesterona a nivel del hipotálamo y la hipófisis (23).

Además de las hormonas esteroides, al menos tres proteínas derivadas de las células de la granulosa modulan la formación y secreción de FSH de la hipófisis, la activina parece estimular mientras que la inhibina y folistatina suprimen. A su vez éstas tres proteínas son inducidas por la propia FSH (26). El control positivo es básico para promover la oleada de LH requerida para iniciar la ovulación, la cual es disparada por una brusca elevación y persistencia del nivel sérico de estradiol (27).

La distribución de las isoformas de LH y FSH en la hipófisis varía durante el ciclo reproductor y depende de la influencia de estradiol y LHRH (17). La cantidad de isoformas de LH básicas, biológicamente más potentes que las ácidas, se incrementa durante la oleada de gonadotropinas preovulatoria (28). Por otro lado, se ha observado que la LH incrementa su bioactividad al ser liberada a la circulación y esto parece estar asociado directa o indirectamente a esteroides gonadales (29). La LH estimula a las enzimas de la esteroidogénesis, la reacción paso limitante es la ruptura del colesterol que da lugar a la pregnenolona, esto conduce a un aumento en la síntesis de esteroides sexuales (30).

I.1.2.1.1. Función testicular de las gonadotropinas.

El testículo contiene dos unidades funcionales, una red tubular que consta de células germinales y células de Sertoli para la producción y transporte de espermatozoides al ducto excretor y un sistema intersticial constituido por las células de Leydig, las cuales contienen toda la maquinaria enzimática para la producción de andrógenos (31)

En las células de Leydig, la función de la LH es la activación de la esteroidogénesis, mediante cambios en la producción de AMPc, el cual incrementa la actividad de la cinasa A de proteína, fosforilación de AMPc, fosforilación de componentes regulatorios celulares y síntesis de proteínas que modulan la ruta esteroidogénica (32)

Al parecer existen receptores en exceso para la LH en las células de Leydig, dado que la mayor respuesta fisiológica se realiza cuando solo una fracción de estos sitios han sido ocupados (33). La regulación de la biosíntesis de testosterona por LH ocurre en los estadios iniciales de su biosíntesis principalmente en la conversión de colesterol a pregnenolona en la mitocondria

La FSH en el testículo actúa principalmente en la maduración de los tubos seminíferos y la espermatogénesis (32) La presencia de la FSH es necesaria para la iniciación de la espermatogénesis pero el mantenimiento de esta requiere de la presencia de altas concentraciones intratesticulares de andrógenos (33)

En las células de Sertoli la FSH se une a su receptor específico y da inicio a una serie de eventos bioquímicos similares a los producidos por LH (33). En estas células se activa la proteína cinasa A dependiente de AMPc (34) y se estimula la transcripción y la síntesis proteica la cual incluye la síntesis de proteínas unidoras de andrógenos (35), así como la activación del complejo de aromatasas que convierten testosterona en estradiol (36) La FSH juega además un papel indirecto en la esteroidogénesis dado que induce la maduración de las células de Leydig durante el desarrollo e incrementa el número de receptores para LH en estas células (37)

I.1.2.1.2. Función ovárica de las gonadotropinas.

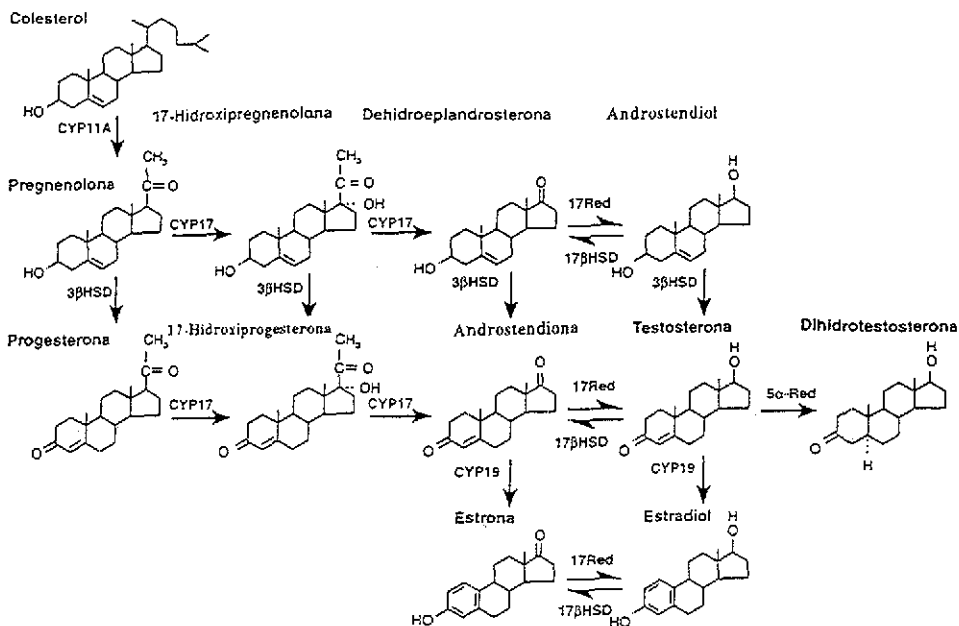
En el ovario se encuentran dos compartimientos básicos: corteza y médula. La corteza contiene estructuras foliculares en diferentes estados de desarrollo circundadas por el estroma y las células intersticiales. La médula está constituida principalmente por vasos sanguíneos, nervios y fibras musculares (38). Durante el ciclo ovulatorio, un coordinado mecanismo multihormonal da por resultado el desarrollo y liberación de un gameto femenino.

En el ovario, la acción de la LH y FSH se lleva a cabo en dos tipos de células foliculares: las de la granulosa y las de la teca. En ambos tipos celulares la LH y la FSH activan la esteroidogénesis a través de sus receptores por medio de AMPc y proteína cinasa A (39). Los receptores para FSH se han encontrado únicamente en las células de la granulosa (40), los que son para LH se expresan en las células de la granulosa sólo en algunos estadios de maduración (41), y están presentes de manera constitutiva en las células de la teca ovárica (42).

I.1.3. Esteroidogénesis gonadal.

En los mamíferos existen tres órganos endocrinos especializados en la producción de esteroides: la glándula suprarrenal, el ovario y el testículo. En estadios específicos como el embarazo, la placenta se presenta como la mayor fuente de hormonas esteroides (1).

Las rutas bioquímicas y los complejos enzimáticos son muy similares en todos los tejidos esteroidogénicos. Los esteroides son derivados del colesterol, el cual es un producto de la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en forma de lípidos en el organismo, estas reservas se forman por síntesis de novo de colesterol o por transferencia de éste a las células a partir del torrente sanguíneo (43).



- 1) CYP11A = 20-esteroide hidroxilasa, 22-esteroide hidroxilasa, 20-22 esteroide desmolasa (P450sc).
- 2) 3β-HSD = 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3-cetoesteroide Δ^4 , Δ^5 isomerasa.
- 3) CYP17 = 17 α -esteroide hidroxilasa (P450c17).
- 4) CYP17 = 17,20 esteroide desmolasa (P450c17)
- 5) 17 Red = 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).
- 6) 5 α Red = 5 α -reductasa.
- 7) CYP 19 = P450 aromatasa (P450arom).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2.- Esteroidogénesis gonadal.

El primer paso en la biosíntesis de andrógenos y estrógenos es la ruptura de la cadena lateral del colesterol por la enzima P450sc (side cleavage Cain) la cual es un complejo enzimático asociado a la membrana mitocondrial que cataliza tres reacciones separadas 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y el rompimiento de la cadena lateral del colesterol entre los carbonos C20 y C22 del colesterol para producir pregnenolona y ácido isocaproico, estas reacciones son consideradas el paso limitante en la esteroidogénesis (43). La P450sc se expresa predominantemente en la corteza suprarrenal, en el testículo ésta se encuentra en las células de Leydig, en el ovario se expresa en las células de la teca y la granulosa. La pregnenolona resultante de la reacción anterior es convertida a progesterona por una reacción catalizada por un complejo enzimático microsomal designado como 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^4 - Δ^5 isómera (3 β -HSD), este

complejo produce la deshidrogenación e isomerización de esteroides C21 y C19, esta enzima también tiene como sustrato la 17α hidroxipregnenolona y la dehidroepiandrostendiona. (DHEA). La 3β -HSD se localiza en las membranas del retículo endoplásmico y mitocondria. Se ha detectado actividad de la 3β -HSD en tejidos clásicamente esteroidigénicos como la placenta, adrenales, ovario (teca interna) y testículo (células de Leydig), y en tejidos como pulmón, endometrio, próstata, corazón y cerebro, entre otros

El siguiente paso, es la 17α -hidroxilación de pregnenolona o progesterona y la ruptura en el carbono 17 y 22 es catalizada por la 17α -hidroxilasa asociada a citocromo P450 (P450c17); esta enzima posee actividad enzimática tanto de 17α -hidroxilación como de 17-22-liasa, y constituye la reacción clave de la biosíntesis de andrógenos (44), sus intermediarios pueden ser convertidos a dehidroepiandrostendiona y androstendiona, respectivamente. La P450 17α se expresa en tejido gonadal y adrenal, en el ovario la se expresa únicamente en la células de la teca, donde dirige la síntesis de andrógenos y estrógenos y en la corteza adrenal en donde participa en la formación de glucocorticoides y andrógenos adrenales

El paso final hacia la biosíntesis de estrógenos es la reacción reversible entre la androstendiona y la testosterona por medio de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa ó enzima tipo 3 (17β -HSD) y la aromatasa. La 17β HSD cataliza la interconversión de 17-hidroxi y 17-cetoesteroides, como la estrona y el estradiol o androstendiona y testosterona.

Finalmente, la conversión de esteroides C-19 a compuestos estrogénicos C-18 es catalizada por el complejo enzimático del retículo endoplásmico conocido como aromatasa. Este complejo incluye la aromatasa citocromo P450 y NADPH citocromo P450 reductasa. La aromatasa es una hemoproteína microsomal y es responsable de la fijación de esteroides C-19, de las dos reacciones de hidroxilación en la posición 19, de la hidroxilación en C2 y la consecuente aromatización del anillo A (45-46) para la formación de un anillo A fenólico característico de los estrógenos (43).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

I.1.4 Desarrollo folicular.

El desarrollo folicular en la rata sigue el patrón que la regulación hormonal del ciclo estral le impone. A lo largo de este ciclo se presentan en forma sucesiva las fases de estro, metaestro o diestro I, diestro II y proestro.

Una oleada de LH y FSH ocurre la tarde del proestro y la de FSH se mantiene en la mañana del estro. Los folículos que maduran durante un ciclo determinado, en respuesta al incremento cíclico de gonadotropinas, inician su crecimiento alrededor de 19 días antes de la ovulación. Por lo tanto una vez que empiezan a crecer se exponen al menos a tres elevaciones consecutivas de gonadotropinas. Se ha propuesto que el incremento de gonadotropinas que precede a la ovulación, selecciona de entre el lote de folículos en crecimiento, aquéllos que ovularán y se luteinizarán en el siguiente proestro (47). Los estadios finales del desarrollo folicular dependen en gran parte de las gonadotropinas (48). Los folículos no seleccionados o incapaces de responder a la señal de las gonadotropinas, se convierten en atrésicos y no maduran completamente (47). Aunque la atresia puede ocurrir en varios estadios se observa principalmente en pequeños folículos antrales. La atresia folicular constituye la muerte y degeneración del folículo. El ovocito experimenta picnosis producto de la apoptosis, y posteriormente se observa necrosis y finalmente ocurre una reabsorción total. Las células de la granulosa sufren reducción en el índice mitótico y citólisis precedida por picnosis nuclear. Las células de la teca se hipertrofian. El antro es invadido por capilares y fibroblastos y finalmente se colapsa (49).

Los receptores de FSH están limitados a las células granulosas y los de LH están presentes en la teca, células intersticiales y lúteas y en grados variables en las células de la granulosa de acuerdo a su estadio de maduración (50). El examen de la relación entre el crecimiento folicular y los receptores a las gonadotropinas demuestran que el incremento en el número de receptores a FSH se debe en gran parte a que los estrógenos inducen la proliferación de las células de la granulosa (51). Conforme avanza la maduración de los folículos, aumenta el contenido de receptores para LH en las células de la teca, sobre todo durante el proceso previo al incremento preovulatorio de gonadotropinas. En el folículo maduro, la FSH junto con el estradiol causan incremento de receptores de LH en células de la granulosa.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Al inicio del ciclo ovulatorio la FSH estimula la actividad de la aromatasa de las células de la granulosa, lo que da como resultado el aumento de la concentración folicular de estrógenos (52), cuyo nivel creciente incrementa la captación folicular de FSH y la sensibilidad de la acción a la misma (53). Uno o varios folículos producen relativamente más estrógenos que los otros. Este o éstos folículos dominantes participan en una secuencia ordenada de sucesos durante los cuales la FSH y los estrógenos estimulan el crecimiento, la formación del antro, el incremento de receptores de LH en las células de la granulosa (54). Una vez inducidos, los receptores de LH en las células de la granulosa requieren la presencia continua de FSH para mantenerse. Además el estradiol se encuentra en altas concentraciones en el antro del folículo en desarrollo, lo que permite asegurar un ambiente favorable para el crecimiento y maduración de los folículos (55).

I.1.5. Ciclo estral.

El ciclo reproductivo en los mamíferos euterios, a excepción del ser humano y algunos otros primates, se denomina ciclo estral. El ciclo estral es el tiempo que transcurre entre dos periodos de celo (estro) del animal. Su duración depende de la especie en estudio y, en algunos casos, de condiciones ambientales, particularmente la duración del ciclo luz-oscuridad. El propósito del ciclo estral es llevar a un grupo de folículos ováricos a la maduración y ovulación, y al mismo tiempo, inducir la conducta sexual que provoca el apareamiento y la fertilización de los huevos ovulados. En algunas ratas de laboratorio, cada ciclo dura cuatro o cinco días y está acoplado al ciclo de luz-oscuridad y durante el mismo se manifiestan las fases de estro, metaestro o diestro I y diestro II y proestro. El ciclo puede estudiarse mediante frotis vaginales que evidencian los cambios morfológicos del epitelio vaginal y que reflejan la actividad ovárica como consecuencia a su vez, del ambiente hormonal. La fase de estro tiene una duración de 9 a 12 horas y se caracteriza por la receptividad sexual de la hembra para la cópula. Depende de la presencia de estradiol y progesterona y de su interacción con el hipotálamo (56). Durante esta fase ocurre una rápida maduración de múltiples folículos ováricos, aumento del tamaño del útero y una rápida proliferación de la mucosa vaginal, lo que puede observarse en la citología exfoliativa en donde se encuentran células epiteliales superficiales, cornificadas y anucleadas. Al final de esta fase se produce la ovulación. La siguiente fase, diestro I dura aproximadamente 21 horas y se inicia poco después de la ovulación. Los ovarios contienen

los cuerpos luteos y folículos pequeños y el tamaño y vascularización del utero disminuyen. En el frotis vaginal se observan muchos leucocitos polimorfonucleares y pocas células cornificadas. El diestro II es la fase que dura más tiempo (60 a 70 horas) y principalmente se observan leucocitos y algunas células epiteliales basales nucleadas. En esta fase ocurre una involución de los cuerpos lúteos y mayor regresión uterina. La fase de proestro se caracteriza por la presencia de células epiteliales basales nucleadas y dura alrededor de 12 horas, y ocurre involución funcional de los cuerpos lúteos y tumefacción preovulatoria de los cuerpos de folículos ováricos (57).

El ciclo estral en la rata se regula por períodos de luz y oscuridad, ya que éstos controlan la producción de la hormona melatonina coordinada a su vez por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. La melatonina se produce en la glándula pineal e inhibe la actividad de las gónadas. Esta sigue un ritmo circadiano de síntesis y secreción, con niveles bajos o indetectables durante el día y valores máximos durante la noche. De esta forma la melatonina ejerce un efecto secuencial sobre el desarrollo folicular y con esto, la progresión del ciclo estral. Los folículos más avanzados que se exponen a los niveles mínimos de melatonina en la fase diurna del proestro, terminan su desarrollo produciendo grandes cantidades de estradiol y como consecuencia el aumento de LH y FSH, lo cual induce la fase de estro y la liberación de dichos folículos maduros. De acuerdo con lo anterior, se ha observado que las ratas expuestas a iluminación constante se mantienen en estro. (58).

I.2. El riñón.

En condiciones normales el riñón se encarga de la excreción de metabolitos, el mantenimiento del pH de los fluidos corporales así como de mantener el agua y electrolitos circulantes dentro de valores fisiológicos, con todo ello se mantienen las concentraciones internas de cada ion, el volumen y presión sanguínea dentro de límites tolerables para la vida, así como la osmolaridad y el balance ácido-base del ambiente interno y se encarga de eliminar desechos metabólicos de células y sustancias extrañas al organismo. Todos estos procesos del ajuste de la composición de la sangre ocurren en la unidad morfofuncional del riñón llamada nefrona. Cada riñón contiene aproximadamente un millón de nefronas. Cada nefrona consta de dos elementos uno vascular del cual recibe y

devuelve el plasma y uno tubular en donde se lleva a cabo el ajuste de la composición de la sangre (64).

El movimiento inicial del plasma que viaja por los capilares sanguíneos hacia el túbulo renal para formar el filtrado ocurre a través de un tamiz o filtro que se llama barrera glomerular (figura 3). Esta barrera está constituida por tres elementos:

- 1) Células endoteliales, que presentan en su superficie carbohidratoa polianiónicos (podocalixina) (65), este endotelio presenta poros por lo que no es una barrera significativa para el paso de moléculas
- 2) La membrana basal glomerular (MBG), que consta de tres capas que difieren en la densidad electrónica al visualizarse con marcadores de metales pesados: lámina rara interna, lámina densa y lámina rara externa, estas láminas están formadas por colágena tipo IV, presentan una alta densidad de cargas negativas y están constituidas por proteoglicanos heparán sulfato, laminina, nidógeno, fibronectina y entacina, esta lámina impide el paso de proteínas pequeñas y como resultado todas las proteínas de la sangre tiende a permanecer ahí mientras la filtración ocurre. En el humano la MBG tiene un espesor de 240-340nm y cada capa ocupa aproximadamente una tercera parte del total (66).
- 3) Células del epitelio visceral que forman un epitelio escamoso simple modificado de una célula de grosor, cada célula presenta proyecciones citoplásmicas llamadas podocitos que abrazan el capilar y están parcialmente embebidos en la lámina rara externa a una profundidad de 40-50 nm. En los podocitos se encuentra una sialoproteína, la podocalixina, que es más abundante en los podocitos que en las células endoteliales. Entre las interdigitaciones de los podocitos vecinos y sus proyecciones (pedicelos) se encuentran diafragmas de filtración de 4-6nm (67).

De acuerdo con la descripción estructural anterior los espacios y la carga negativa son fundamentales para mantener la estructura normal y establecer las propiedades de filtración selectiva de la pared de los capilares glomerulares. Los factores que determinan el paso de las moléculas por la barrera de filtración son las características de las partículas como el tamaño y la deformabilidad, la carga eléctrica y la configuración molecular así como la hemodinámica glomerular.

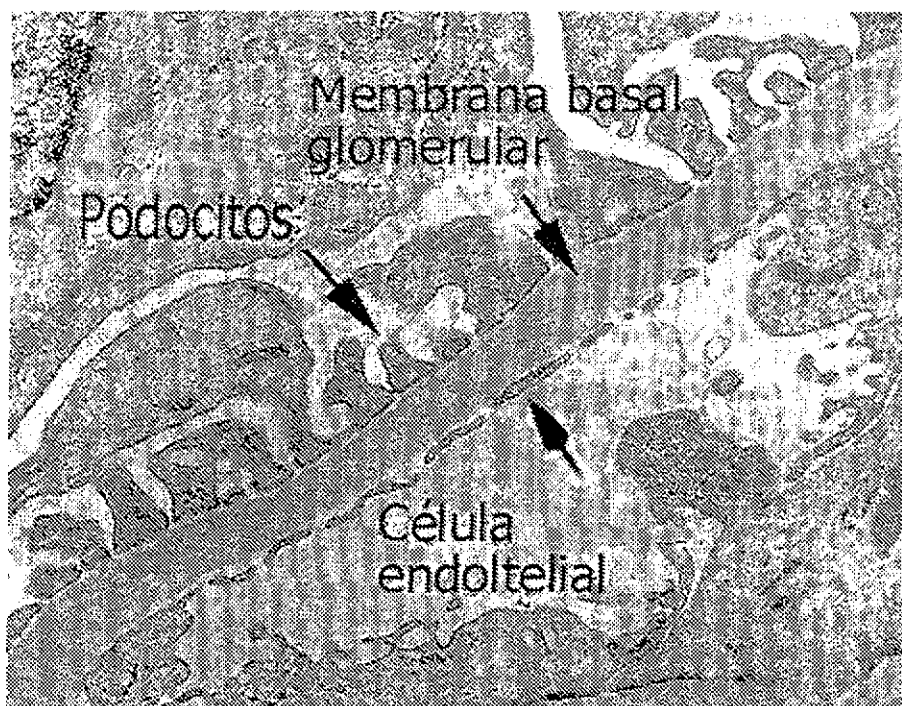


Figura 3. Corte histológico de nefrona en donde se observa la barrera de filtración glomerular.

1.3. Síndrome nefrótico.

El síndrome nefrótico (SN) es una enfermedad renal que se caracteriza por la presencia de profundos cambios metabólicos, principalmente hipoproteinemia, proteinuria e hipercolesterolemia (59), anormalidades en la coagulación y alteraciones en las concentraciones de casi todas las proteínas plasmáticas (60). Estas alteraciones son consecuencia directa o indirecta de un aumento en la permeabilidad glomerular que sufre una filtración excesiva de las proteínas del plasma. El síndrome nefrótico puede originarse por causas desconocidas y se le denomina síndrome nefrótico idiopático, o bien, por causas conocidas llamado síndrome nefrótico secundario, que puede aparecer como consecuencia de una amplia variedad de procesos patológicos incluyendo trastornos inmunitarios, lesiones tóxicas, alteraciones metabólicas, defectos bioquímicos y trastornos vasculares (61)

1.3.1 Características del síndrome nefrótico

El SN puede ser producido por diferentes padecimientos cuya característica común es la proteinuria de magnitud suficiente para causar hipoproteinemia (60). La proteinuria abundante ($3.5\text{ g}/1.73\text{ m}^2/\text{día}$ en el humano) es la distinción del estado nefrótico debido a que rara vez se observa proteinuria de esta magnitud en las enfermedades túbulo intersticiales y vasculares del riñón (61). El mecanismo por el cual se produce la proteinuria en el humano no está completamente dilucidado. Sin embargo las evidencias indican que existe un daño en la barrera de filtración glomerular que aumenta la permeabilidad glomerular a las proteínas de alto peso molecular como la albúmina (63).

En la nefrosis inducida por aminonucleósido de puromicina (ANP) la filtración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga se encuentra muy elevada, lo que sugiere que la selectividad, tanto de tamaño como de carga, está alterada. Se ha propuesto que uno de los mecanismos responsables de la proteinuria masiva en el síndrome nefrótico podría ser la lesión de las células epiteliales glomerulares que resulta en la pérdida de procesos podocíticos, por fusión y expansión de los mismos como consecuencia de la pérdida de la carga negativa de su superficie (68). También ocurre una disgregación del

citoesqueleto de los procesos podocíticos y estos se separan de la membrana basal glomerular (69), no es claro si los proteoglicanos como el heparán sulfato (HS-PG) de la barrera de filtración glomerular disminuyen en la nefrosis por ANP, sin embargo, en los pacientes con SN congénito, los sitios aniónicos ricos en heparán sulfato están prácticamente ausentes

Se ha encontrado en los animales nefróticos inducidos con ANP la presencia de proteinuria no selectiva. Todas las fracciones se incrementan en la orina durante los 8-10 días posteriores a la administración de la droga (70). También se ha reportado un aumento en la transcripción del gen de la albúmina en el hígado de ratas nefróticas (71,72)

La causa principal de la hiperlipidemia parece ser el aumento de la síntesis hepática de proteínas entre ellas las lipoproteínas, en respuesta a la disminución de la presión oncótica del plasma causada por la hypoalbuminemia (60), además de este incremento en la síntesis de proteínas, la hiperlipidemia en el SN resulta de la disminución en el catabolismo de lipoproteínas. La modificación de la presión oncótica del plasma contribuye a la formación del edema (73) y esta produce hipovolemia. La hipovolemia induce el aumento de concentración de aldosterona y hormona antidiurética, lo cual trae como consecuencia la retención de sodio y agua, que son causa también del edema (73).

Así pues, el SN deberá ser visto como el punto final común de una variedad de procesos patológicos que dañan las propiedades de permeabilidad de la pared de los capilares glomerulares (61)

I.3.2. Causas del síndrome nefrótico.

El SN puede desarrollarse por diversas causas con base a lo cual se clasifican de la siguiente manera.

a) Enfermedades glomerulares primarias

Enfermedad de cambios mínimos, glomerulonefritis proliferativa del mesangio, glomerulosclerosis focal y segmentaria, glomerulopatía membranosa y glomerulonefritis membranoproliferativa

b) Secundario a otras enfermedades

Infecciones, medicamentos, neoplasia multisistémica (diabetes mellitus, lupus eritematoso y heredofamiliar) (61).

1.3.3. Enfermedad de cambios mínimos.

La enfermedad de cambios mínimos es la forma más frecuente de SN idiopático (primario), que se encuentra en el 70-80% en los niños y en los adultos mayores de 16 años representa el 15-20% presentándose con mayor porcentaje en los hombres que en las mujeres. En esta forma del SN el microscopio de luz no muestra alteraciones de los capilares glomerulares (de ahí la designación de cambios mínimos), sin embargo con el microscopio electrónico es notable un borramiento de los procesos podales del epitelio. El microscopio de inmunofluorescencia revela depósitos irregulares e inespecíficos de inmunoglobulinas o de componentes del complemento que pueden también estar ausentes.

Los pacientes se presentan con SN declarado, presión arterial normal, velocidad de filtración glomerular normal o reducida ligeramente. Inexplicablemente casi siempre se presentan remisiones y recaídas espontáneas con proteinuria abundante. El tratamiento es empírico y sintomático, si se toma en cuenta que se desconocen la etiología y la patogénesis. Existen muchas pruebas de que los corticosteroides aumentan notablemente la tendencia natural de esta enfermedad a tener remisiones espontáneas, pero aún así el tratamiento diario o en días alternos con esteroides por vía oral parece ser igualmente efectivo (61).

1.3.4. Inducción experimental del SN.

El SN puede ser inducido experimentalmente, inyectando suero antirriñón, daumicina, adriamicina y ANP (74).

I.3.4.1. Aminonucleósido de puromicina.

El aminonucleósido de puromicina (6-dimetilamino 9 - (3'-amino-3'- desoxi - beta - D- ribofuranosil) purina) es un derivado de la puromicina (Fig 4) Este último se obtiene del hongo actinomiceto Streptomyces alboniger, se presenta de forma cristalina y transparente en el suelo donde vive el hongo La puromicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas debido a que su estructura es muy semejante al aminoacil ARN de transferencia (ARNt) lo que impide la unión del fragmento aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma (75) y evita la transferencia de aminoácidos del ARNt a la proteína, es decir que el crecimiento de la cadena polipeptídica se interrumpe en el ribosoma (76) lo que permite la formación de pequeños péptidos a partir de los aminoácidos unidos originalmente al ARNt (77)

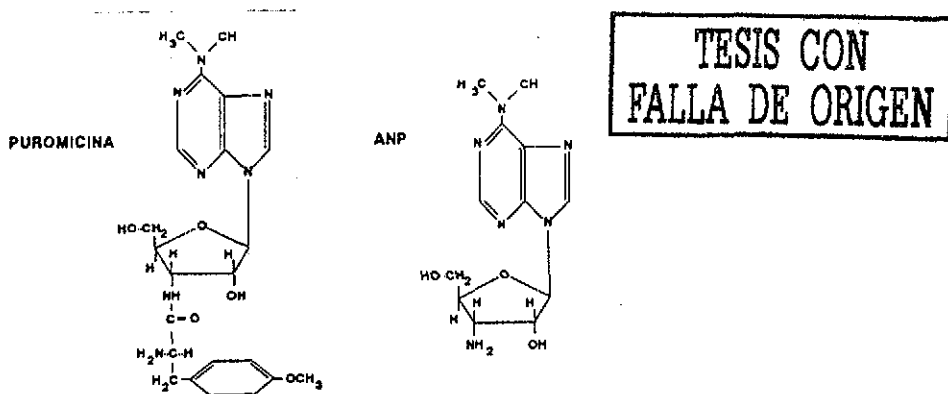


Figura 4 Estructura de la puromicina y aminonucleosido de puromicina.

El ANP se sintetizó en 1954 por Baker (78) a partir del residuo p-metoxitiroxil unido al grupo amino del azúcar de la puromicina (79) La estructura de la puromicina está constituida de dos partes un anillo de purina con un grupo dimetilamino en la posición 6 y un aminoazúcar desoxirribosídico en posición 3' (80) Se ha observado que ninguna de las partes estructurales del ANP constituyen por si sola un agente nefrotóxico, por lo que solo el ANP integro tiene esta capacidad (82)

El ANP presenta una actividad tripanicida de tres a cuatro veces mayor que la puromicina e inhibe el crecimiento tumoral mamario en ratones mejor que la puromicina. También se ha administrado en pacientes con cáncer y parece más tóxico que la puromicina. Las dosis diarias de 3-4 mg/Kg por 15 días causan severa proteinuria y descamación de las superficies ventrales de manos y pies (81)

El mecanismo por el que ANP interfiere con la síntesis del ARN no se conoce, pero se ha sugerido que el ANP interfiere en la ruta del metabolismo de las purinas, bloqueando las vías enzimáticas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y nucleoproteínas (82). También se desconoce el mecanismo por el cual el ANP causa daño renal, pero existen estudios que indican que el daño celular está mediado por la presencia de radicales libres del oxígeno y sus especies reactivas tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iones superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) que son productos del metabolismo del ANP (83).

Se ha encontrado que el ANP es especie específico ya que presenta alta nefrotoxicidad en la rata (84), en el hombre (85) y en el mono en pequeñas dosis produce SN (86). Observándose que en estos, la enfermedad es menos severa que en ratas. En el perro se observa mediana nefrotoxicidad ya que se presentan lesiones renales microscópicas semejantes a las descritas en ratas, así como proteinuria e hipoalbuminemia, pero no presentan edema, ni hipercolesterolemia (87). En el cobayo no se produce nefrotoxicidad pero sí toxicidad generalizada (88)

El ANP es un compuesto muy utilizado para el estudio del SN dado que en especies animales como la rata, su administración en dosis que varían alrededor de 15mg/100mg de peso, induce el padecimiento con las características del SN denominado de cambios mínimos del humano, principalmente entre los días 7-10 (89). En la rata el 80% del ANP se excreta en 24 hr (82), otros autores indican que el 90% se excreta en orina en 8 hr y de este entre el 90-60% se eliminan en la primera hora (90)

En la nefrosis inducida por ANP la filtración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga se encuentra muy elevada lo cual sugiere que la selectividad tanto por tamaño como de carga está alterada (91-92). La lesión morfológica característica del síndrome nefrótico es la fusión de los procesos podocíticos, la cual parece deberse a la pérdida de la carga de la superficie (93)

No está claro si los PG-HS de la barrera de filtración glomerular disminuyen en la nefrosis por ANP sin embargo en los pacientes con síndrome nefrótico congénito, los sitios aniónicos con heparan sulfato, están prácticamente ausentes (94,95)

Estudios en animales nefróticos inducidos con ANP indican la presencia de proteinuria no selectiva, en esta enfermedad todas las fracciones incrementan en la orina durante los 8 días posteriores a la administración de la droga (70). También se ha reportado un aumento en la transcripción del gen de la albúmina en el hígado de ratas nefroticas (71,72)

1.4. Alteraciones endócrinas reproductivas.

El síndrome nefrótico es un padecimiento de alta frecuencia dentro de los trastornos renales, por lo cual ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, a pesar de que en los pacientes nefróticos, se reconocen anormalidades en la función reproductiva que afectan principalmente al sexo masculino, no existen en la actualidad estudios que analicen las posibles alteraciones endocrinas de pacientes nefróticos, así como los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la disfunción del aparato reproductor.

Hasta 1992, existían solo dos reportes que evaluaban la función endocrina reproductiva en modelos experimentales, en los que se intentó explorar el efecto del SN sobre la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en forma experimental. Estas investigaciones se realizaron en ratas macho a las que se les indujo el SN con ANP, Glass y cols (96) en 1985, reportaron desarrollo de hipoandrogenismo que se manifestó en una reducción significativa en el peso de la próstata y vesículas seminales, disminución de los niveles séricos de testosterona libre y total y de la testosterona liberada del testículo incubado *in vitro*. El peso y la estructura histológica de los testículos no se modificó. Se consideró que el hipoandrogenismo fue consecuencia de la baja producción de gonadotropinas, más que a un defecto testicular intrínseco, y que la disminución de gonadotropinas a su vez, fue secundaria a un efecto del testículo sobre la unidad hipotálamo-hipófisis. Las concentraciones de testosterona estaban disminuidas así como de la hormona luteinizante (LH) y presentaban respuestas normales a nivel testicular e hipofisario por estímulo de hCG y LHRH respectivamente. Los autores concluyeron que la rata macho nefrótica desarrolló, hipogonadismo hipogonadotrópico, el cual se relacionó

con un incremento en la sensibilidad hipofisiaria a los efectos de retroalimentación negativa de la testosterona

Elias y cols (97) en 1992, en otro estudio similar, informaron la presencia de hipogonadismo con altos niveles de LH circulantes. En este trabajo se observó que en las ratas macho nefróticas había una reducción significativa de testosterona, androstendiona, estradiol y estrona plasmáticas, lo que indicó un posible daño en la esteroidogénesis testicular. También se observó un aumento de LH y un marcado incremento en la excreción urinaria de testosterona. Los autores sugirieron que la pérdida urinaria de testosterona junto con su proteína de unión contribuyó en parte a la disminución de testosterona en suero lo cual a su vez, estimuló la síntesis y liberación de LH. Los valores pico de LH y FSH obtenidos después de la administración de GnRH no mostraron variación

Nuestro grupo de trabajo en 1995 (98) realizó un trabajo en ratas hembra con SN agudo, en donde se encontró la existencia de disfunción en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que se manifestó básicamente por hipogonadismo hipogonadotrópico, la pérdida del ciclo estral después de 4 días de la inducción del síndrome por ANP. Se encontraron niveles de LH y progesterona significativamente bajos. Al mismo tiempo la concentración de estradiol presentó valores no detectables. El examen histológico de los ovarios reveló un incremento considerable en el número de folículos atrésicos. Se consideró que la disfunción endócrino-reproductiva involucró probablemente a tejidos esteroidogénicos como el ovario y/o la glándula suprarrenal y sugirió la existencia de una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada

Posteriormente en 1997 (99) se estudiaron las alteraciones endócrino reproductivas en la rata hembra y macho con SN agudo (día 10, donde se presentan las mayores alteraciones) y el periodo de remisión (día 30). Durante todo el experimento se siguió el ciclo estral de las ratas por medio de frotis vaginales y la fertilidad se estimó por la proporción de embarazos de las hembras nefróticas o inducción de embarazo por los machos nefróticos. Los resultados mostraron que todos los niveles de hormonas que fueron medidos (LH, FSH, y progesterona), así como 17β -estradiol en las hembras y testosterona total en los machos, se redujeron significativamente en el estado nefrótico (día 10), excepto FSH en las hembras, y regresaron a sus valores normales después de 30 días. En el día 10, la testosterona libre disminuyó significativamente en las ratas nefróticas, mientras que la

testosterona urinaria permaneció sin modificaciones. El ciclo estral se interrumpió el día 3 y se reestableció hasta el día 23. La capacidad de fertilizar de los machos nefróticos no se perdió completamente durante la fase aguda ya que el 37% de estos animales fueron fértiles mientras que ninguna de las hembras en esta fase lo fue. En la fase de remisión se recuperó la capacidad reproductiva en ambos sexos. Se concluyó que las ratas con nefrosis aguda experimental de ambos sexos desarrollaron un hipogonadismo hipogonadotrópico transitorio el cual resultó en una baja en la capacidad reproductiva durante la fase aguda y que afectó principalmente a las hembras.

En 1999 (100), se publicó un trabajo sobre la función reproductiva en ratas macho con nefrosis crónica. Se encontró que en las ratas nefróticas ocurre una disfunción endócrina que se caracterizó por bajas concentraciones de LH y FSH en el primer mes después del cual fueron similares o mayores a las control. La testosterona y el estradiol disminuyeron en todo el experimento. La masa de los testículos no se alteró. La masa de las vesículas seminales y la próstata disminuyó durante las dos primeras semanas y después fue esencialmente normal. La capacidad reproductiva de los machos fue de 0% en el día 7, mientras que en el día 14, el 16% del grupo fue capaz de cruzarse exitosamente y posteriormente todos los animales se recuperaron. Este trabajo demostró que las ratas con SN crónico, desarrollan una importante disfunción endócrina caracterizada principalmente por una persistente baja concentración de testosterona que deteriora la capacidad reproductiva transitoriamente. Se concluyó que en la nefrosis crónica se estableció una disfunción endócrina importante en la que se presentaron dos fases: la primera que probablemente es irreversible y se caracterizó por las bajas concentraciones de testosterona y la existencia de una falla en la respuesta a las gonadotropinas y la segunda que es reversible, la alteración transitoria de las glándulas sexuales accesorias.

Con estos antecedentes, se planteó el objetivo del tercer trabajo de nuestro grupo, estudiar las alteraciones endocrino-reproductivas en la rata hembra con SN crónico (101).

El seguimiento del SN crónico se realizó durante 112 días. La rata hembra con síndrome nefrótico crónico, inducido con ANP, presentó disfunción endócrino reproductiva que se manifestó con una alteración temporal del patrón del ciclo estral, principalmente entre los días 3 a 53, fechas en que la presencia de proestros y estros fue menor en los animales nefróticos. Durante los 112 días la LH mantuvo su nivel más bajo, correspondiente al diestro y los valores de estradiol fueron indetectables o significativamente bajos, las concentraciones de FSH y progesterona presentaron una

ligera tendencia a disminuir a partir del día 56. La prolactina mostró una condición cíclica normal durante todo el estudio y se presentó en todas las fechas una disminución crónica de la capacidad reproductiva aproximadamente 33-55%. La estimulación de las ratas hembra por la presencia de la rata macho fértil contribuyó a restablecer la ciclicidad y los niveles de estradiol, en la rata con SN crónico. En este trabajo se concluyó que en la nefrosis crónica de la rata existe alteración del mecanismo de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, cuyas causas podrían ser diversas. Un dato interesante es que la presencia del macho fértil o su orina contribuyeron a reestablecer la función reproductiva de la hembra con SN crónico lo que sugirió la participación de feromonas.

Los datos aportados por nuestro grupo nos permiten establecer que los animales con SN presentan alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada pero no se sabe cual es el estado funcional de la hipófisis y gónadas de animales nefróticos de ambos sexos. Para determinar esto, se propuso realizar pruebas dinámicas en el día 10 (fase aguda del síndrome), y analizar la respuesta de animales nefróticos y controles ante un estímulo con LHRH para conocer el estado funcional de la hipófisis y la respuesta de animales nefróticos y controles a un estímulo con hCG y establecer el estado funcional de las gónadas de animales nefróticos. Se propuso realizar estos dos experimentos en grupos de ratas macho y hembra por separado.

II. HIPOTESIS

Dados los cambios endocrino-reproductivos previamente encontrados en la rata con síndrome nefrótico inducido por ANP, es de esperarse que la respuesta de la hipófisis y la gónada a estímulos externos esté alterada en estos animales

III. OBJETIVO.

Evaluar mediante pruebas dinámicas el estado de la hipófisis y las gónadas (ovario y testículo) en el síndrome nefrótico experimental

III.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1) Estudio cronológico de las gonadotropinas (LH y FSH) y hormonas esteroides circulantes (progesterona, androstendiona, testosterona y estradiol) de ratas macho nefróticos
- 2) Estudio cronológico de las gonadotropinas (LH y FSH) y hormonas esteroides circulantes (progesterona y estradiol) de ratas hembra nefróticas
- 3) Evaluar la respuesta hipofisiaria de ratas macho nefróticas al estímulo con LHRH
- 4) Evaluar la respuesta hipofisiaria de ratas hembra nefróticas al estímulo con LHRH
- 5) Evaluar la respuesta gonadal de ratas nefróticas macho al estímulo con hCG.
- 6) Evaluar la respuesta gonadal de ratas nefróticas hembra al estímulo con hCG

II. HIPOTESIS

Dados los cambios endocrino-reproductivos previamente encontrados en la rata con síndrome nefrótico inducido por ANP, es de esperarse que la respuesta de la hipófisis y la gónada a estímulos externos esté alterada en estos animales

III. OBJETIVO.

Evaluar mediante pruebas dinámicas el estado de la hipófisis y las gónadas (ovario y testículo) en el síndrome nefrótico experimental

III.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1) Estudio cronológico de las gonadotropinas (LH y FSH) y hormonas esteroides circulantes (progesterona, androstendiona, testosterona y estradiol) de ratas macho nefróticos
- 2) Estudio cronológico de las gonadotropinas (LH y FSH) y hormonas esteroides circulantes (progesterona y estradiol) de ratas hembra nefróticas
- 3) Evaluar la respuesta hipofisiaria de ratas macho nefróticas al estímulo con LHRH
- 4) Evaluar la respuesta hipofisiaria de ratas hembra nefróticas al estímulo con LHRH
- 5) Evaluar la respuesta gonadal de ratas nefróticas macho al estímulo con hCG.
- 6) Evaluar la respuesta gonadal de ratas nefróticas hembra al estímulo con hCG

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Diseño experimental.

IV.1.1. Etapa I.- Evaluación de la instalación del síndrome nefrótico

Con el objetivo de determinar la aparición de la alteración hormonal que conduce a la disfunción del eje reproductor en el transcurso del establecimiento del SN, la evaluación del padecimiento se realizó los días 3, 7 y 10 posteriores a la inyección de ANP en el grupo de ratas I y se dividió en dos subgrupos de acuerdo al género machos (grupo **IA**) (n=5), y hembras (grupo **IB**) (n=5), en este grupo solo se realizó la evaluación en el día 10 ya que los días 3 y 7 están previamente reportados (98) El perfil hormonal de las muestras obtenidas del experimento cronológico (días 3, 7, y 10) de animales nefróticos y controles se valoró con la medición de las hormonas LH, FSH, progesterona y estradiol en ambos sexos, además, se midió androstendiona y testosterona en los machos y se determinaron también los pesos de los tejidos andrógeno-dependientes como próstata ventral y vesícula seminal Este experimento se repitió 5 veces con ratas macho y dos veces con ratas hembra.

IV.1.2. Etapa II.- Evaluación de la función hipofisaria al estímulo con LHRH en ratas macho y en ratas hembra

Para evaluar el efecto de la nefrosis experimental sobre la hipófisis de ratas nefróticas se formaron dos grupos, uno se llamó **IIA** y en él se trabajó con 5 grupos de ratas macho (controles n=5 y nefróticos n=5) y en el grupo **IIB** con 2 grupos de ratas hembra (controles n=5 y nefróticas n=5). Se estimuló a los grupos control y nefrótico el día 10, con LHRH en solución salina con una concentración 0.1 mg/ml la cual se administró una sola inyección empleando una dosis de 300 ng/ 100 gr de peso y posteriormente se fueron decapitando en los tiempos 0', 20', 40', 60' y 80', después de la administración del factor liberador y se recolectó la sangre Las muestras de suero se almacenaron para la medición de las concentraciones de LH y FSH, a -20°C hasta el ensayo. El perfil hormonal

de las muestras de suero obtenidas de animales hembras y machos en el día 10 del SN estimulados con LHRH (función hipofisiaria) se valoró con las mediciones de LH y FSH

IV.1.3. Etapa III - Evaluación de la función gonadal al estímulo con hCG en ambos sexos

Se estimularon dos grupos de ratas nefróticas (n=5) y dos grupos de animales controles (n=5) con hCG (8UI /dosis), un grupo de cada uno recibió una sola dosis en el día 10 mientras que los otros grupos de animales recibieron una dosis diaria de hCG durante cuatro días, a partir del día 7 al día 10 después de la administración del PAN. Este experimento se llevó a cabo en ratas macho (grupo IIIA) y hembras (grupo IIIB). Este experimento se repitió dos veces en ambos géneros. Todos los animales se sacrificaron cuatro horas después de la inyección del día 10. El suero se almacenó a -20°C para la medición de hormonas (progesterona y estradiol) además de testosterona en los machos. Se llevaron a cabo dos réplicas del experimento. Las muestras de suero se valoraron con la medición de progesterona y estradiol en ambos sexos además de testosterona en machos.

IV.2. Reactivos.

La 17 β -metil-3H dimetilnortestosterona (DMNT; ae= 89 Ci/mmol) se obtuvo de New England Nuclear (Boston, MA). El yodo radiactivo (¹²⁵I), (ae = 942 mCi/ml) de MDS Nordion (Ontario Canada) distribuido por Internacional de Energía Nuclear SA de CV. La presentación comercial de LHRH se compró como Relefact LHRH (Hoechst AG, Frankfurt, Germany). La hCG se obtuvo como gonadotropyl-c, (Hoechst Marion Roussel, México D F, México). El aminonucleósido de puromicina (ANP) se compró a Sigma Chemical Co, (St Louis, MO). Los demás reactivos fueron grado reactivo y comprados comercialmente.

IV.4. Animales.

Se utilizaron ratas macho y hembra Wistar, adultas de 250 g de peso promedio, mantenidas en ciclos de 12h luz y 12h oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. La comida fue de Lab Diet Brand Animal Food (PMI Feeds, St Louis, Mo, USA) que contiene 23% de proteína cruda como mínimo.

Las ratas hembra debieron presentar al menos dos ciclos estrales completos para ser elegidas para los experimentos. Se consideró que el ciclo estral de la rata ocurre cada 4 días en patrones que comprenden 3 etapas principales: Diestro (Diestro I + Diestro II), Proestro (P) y Estro (E) y se monitorearon por medio del estudio de cambios del epitelio vaginal, mediante frotis vaginales diarios. Estas determinaciones se llevaron a cabo antes y durante todo el experimento.

El SN se les indujo inyectando una dosis única (15 mg/100g de peso) vía subcutánea de ANP, este fue el día 0. El ANP se disolvió en solución salina y cada animal recibió la dosis establecida en una mezcla al 2%. Se incluyeron ratas control que se inyectaron con solución salina isotónica. Los grupos fueron de 5 animales controles y 5 nefróticos como mínimo.

IV.5. Determinaciones bioquímicas.

Las ratas controles y nefróticos de los grupos IA y IB, se sacrificaron por decapitación en los días mencionados y se recolectó la sangre de la cual se obtuvo el suero que se mantuvo a -20 °C hasta su procesamiento. Se valoró el estado nefrótico basándose en las características de proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia. Se determinaron los valores de proteína total y colesterol en suero así como la proteína total urinaria mediante métodos colorimétricos previamente descritos (98).

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas 24 horas antes de los experimentos para recolectar una muestra de orina, de la cual se midió el volumen urinario, y se obtuvo una muestra que se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

El estado nefrótico en cada experimento se valoró con base a las características de proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia.

IV.6. Determinaciones hormonales

La concentración de hormonas proteicas en suero se midieron por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo. Para cuantificar LH y FSH se emplearon reactivos y métodos proporcionados por The National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los resultados se expresaron en ng/ml en términos de los estándares de referencia internacional correspondientes, LH-RP3, y FSH-RP-2. Los

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

coeficientes de variación intra e interanálisis fueron para la LH de 5.1% y 6.5%, y para la FSH de 4% y 7.9%, respectivamente.

Las concentraciones séricas de progesterona, androstendiona, testosterona, y estradiol se midieron por RIA utilizando "kits" de la compañía Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA) Y se determinaron los coeficientes de variación intra e interensayo, para progesterona 2.0 y 5.4 %, para androstendiona 6.1% y 8.3%, para testosterona 4.4% y 8.2%, y para estradiol 6.1% y 7.4%, respectivamente.

Los estándares de yodación altamente purificados fueron para LH (NIADDK-rLH-I-9), y para FSH (NIADDK-rFSH-I-8), se marcaron con ^{125}I por el método de Cloramina T

IV.8. Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones bioquímicas y el peso de los tejidos (tabla 1 y 2), así como las mediciones hormonales los días 3, 7 y 10 o después del estímulo con LHRH se evaluaron por el análisis de ANOVA de dos vías. La prueba de t de student no pareada se utilizó para analizar los resultados de las concentraciones de testosterona, progesterona y estradiol liberados después del estímulo con hCG, se consideró $p=0.05$ como significativo comparado con el control. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el analizador de datos con Graph Pad Prism (versión 3; Graph Pad Software Inc, San Diego, CA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS.

V.1. RATAS MACHO.

En la tabla 1 se presentan los resultados de las determinaciones bioquímicas realizadas con los sueros de ratas macho nefróticas y controles de los días 3, 7 y 10 después de la administración del ANP. En esta tabla observamos que las características del SN: proteinuria, hipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia, se inician en los animales desde el día 3 y se instalan entre los días 7 y 10 que es el período en el que observamos diferencias significativas entre los valores del grupo control y nefrótico.

Tabla 1. Determinaciones bioquímicas en suero y orina de ratas control y nefróticas

Día	Proteína sérica total ^a (g/dl)	Colesterol sérico ^a (mg/dl)	Albumina sérica ^a (g/dl)	Proteína urinaria ^a (mg/24h)	n
3					
C	7.3 ± 0.2	56.3 ± 3	3.2 ± 0.1	15.3 ± 2	3
N	5.9 ± 0.4	80.4 ± 7	3.4 ± 0.2	27.7 ± 4	7
7					
C	7.7 ± 0.2	76.6 ± 4	3.4 ± 0.1	24.9 ± 4	3
N	4.4 ± 0.1	357.0 ± 21	1.4 ± 0.06	570.0 ± 44	7
10					
C	8.3 ± 0.4	62.2 ± 7	3.1 ± 0.08	29.8 ± 7	3
N	5.0 ± 0.1	324.0 ± 16	1.2 ± 0.03	410.0 ± 56	9

Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. * ANOVA de dos vías; P < 0.0001. C = control, N = nefrótico. Se realizaron 5 replicas del experimento.

En la figura 5 se presenta el perfil reproductivo evaluado los días 3, 7 y 10 en ratas macho control y nefróticas. En este perfil se observa que las diferencias entre el grupo control y nefrótico son estadísticamente significativas a partir del día 7. Los valores de LH, FSH, androstendiona, testosterona y estradiol se encontraron significativamente reducidos en las ratas nefróticas con respecto a su grupo control.

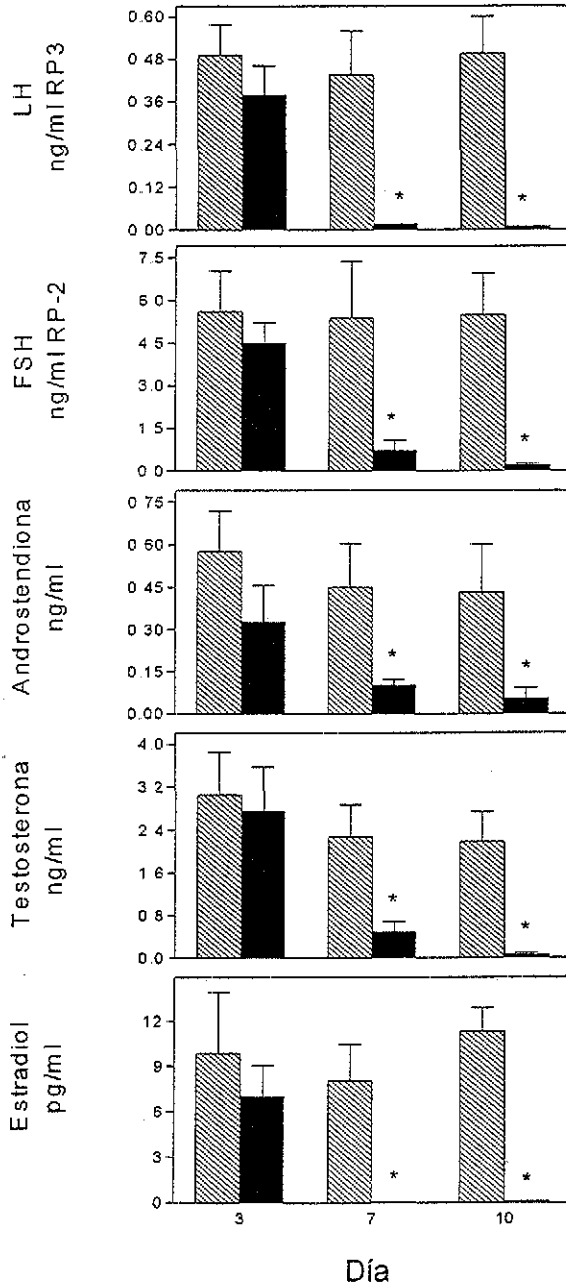


Figura 5 Concentración de hormonas séricas de ratas macho control (barras rayadas) y nefróticas (barras negras) determinadas los días 3, 7 y 10 después de la administración de ANP. Los valores se muestran como el promedio \pm EEM. * ANOVA de dos vías, $p < 0.0001$.

En la tabla 2 se observan los cambios en el peso del cuerpo y en el peso de los órganos sexuales accesorios de los grupos control y nefróticos. El promedio de peso del cuerpo inicial fue de 265 ± 21 g, el cual decrece en el día 3 después de la administración de ANP, posteriormente esta diferencia no es tan grande (días 7 y 10) y esto se debe a que en esta etapa de la enfermedad, presentan retención de fluido intraperitoneal y esto hace que y parezca que los pesos de controles y nefróticas son similares.

Al comparar el peso de los órganos sexuales accesorios (próstata ventral y vesícula seminal) encontramos que el peso de la próstata ventral de ratas nefróticas decrece marcadamente en los días 7 y 10. Por otro lado el peso de la vesícula seminal decrece significativamente desde el día 3 en todas las ratas nefróticas.

Tabla 2. Peso del cuerpo y de los tejidos andrógeno dependientes de ratas macho control y nefróticas

Días	Peso del cuerpo ^a (g)	Próstata ventral ^b (g)	Vesícula seminal ^b (g)	n
3 C	298 ± 9.2	0.20 ± 0.01	0.63 ± 0.01	3
N	250 ± 8.7	0.16 ± 0.01	0.36 ± 0.02	7
7 C	307 ± 14	0.30 ± 0.03	0.71 ± 0.04	3
N	297 ± 8.7	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.05	7
10 C	310 ± 15	0.23 ± 0.02	0.72 ± 0.07	3
N	276 ± 8.6	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.01	9

Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM

^a ANOVA de dos vías; $p = 0.003$ ^b ANOVA de dos vías; $p < 0.0001$

N = grupo nefrótico C = grupo control.

En la figura 6 se observan los resultados de la secreción de LH y FSH de ratas control y nefróticas después de la estimulación *in vivo* con la LHRH (Etapa II grupo IIA). Los resultados que se muestran son el promedio de cinco experimentos llevados a cabo. En esta gráfica observamos que las concentraciones de LH y FSH del grupo nefrótico en cada

tiempo evaluado son menores que las del grupo control. Es importante observar que las concentraciones de gonadotropinas se elevan al transcurrir el tiempo en las ratas nefróticas después de ser estimuladas su hipófisis con LHRH, sin embargo, nunca alcanzan los valores presentados por las ratas control y la diferencia entre las concentraciones de ambas gonadotropinas de los dos grupos fue siempre estadísticamente significativa.

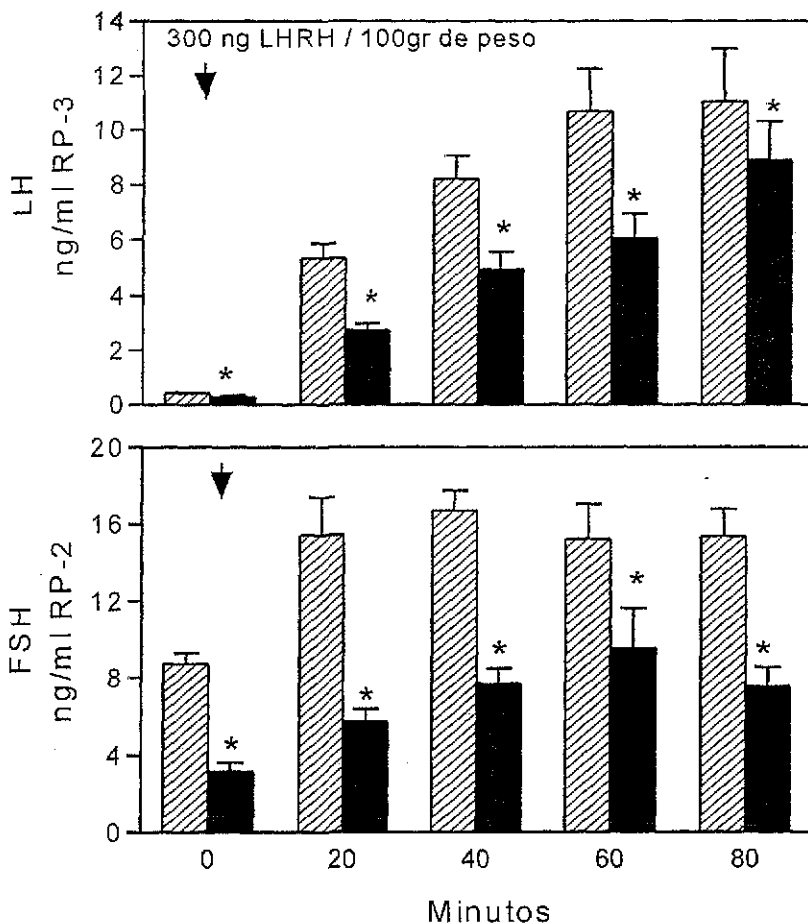


Figura 6. Concentraciones séricas de LH y FSH determinadas en cada intervalo de tiempo después de la administración de LHRH en ratas macho de los grupos control (barras rayadas) y nefrótico (barras negras). Los valores se expresan como el promedio \pm EEM. Los datos se analizaron con el método ANOVA de dos vías para el efecto de grupo (nefróticos contra controles), * $p < 0.0001$. La flecha indica el momento en el que fue administrada la hormona LHRH.

El siguiente estudio que realizamos fue la respuesta testicular *in vivo* al estímulo con hCG (Etapa III grupo IIIA) En la figura 7 observamos que la concentración presentada de testosterona en los animales controles y nefróticos en el día 10 después de la administración de ANP presenta una diferencia estadísticamente significativa. Después de 20 minutos de la administración de hCG la magnitud de respuesta de ambos grupos es similar, tanto en los grupos que recibieron 4 dosis de hCG (desde el día 7 al 10), como en los grupos que recibieron 1 dosis de hCG y se decapitaron 4 hr después Por otro lado las concentraciones de estradiol encontradas el día 10 y después de la administración de 1 o 4 dosis de hCG no presentan modificaciones, la diferencia entre ellos continúa siendo estadísticamente significativa y los valores son casi indetectables en los animales nefróticos

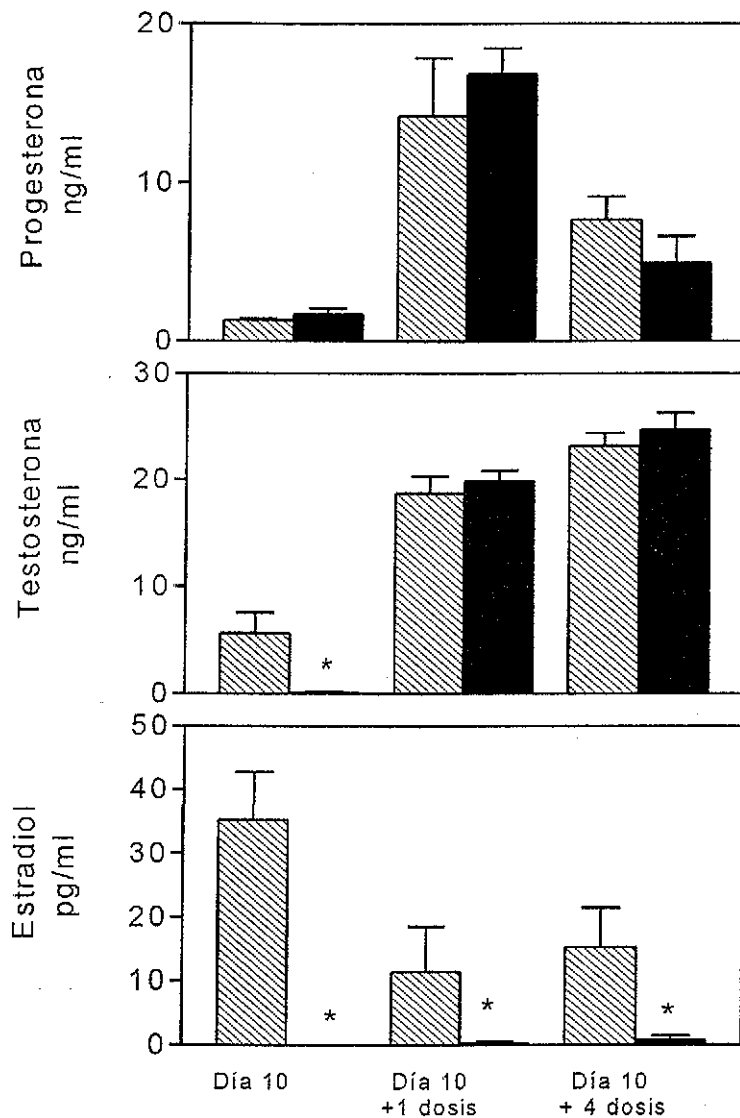


Figura 7 Se muestran las concentraciones séricas de progesterona, testosterona y estradiol de ratas macho control (barras rayadas) y nefróticas (barras negras) determinadas el día 10 antes y después de 1 o 4 dosis de hCG. Los datos se analizaron con la prueba de t de student entre grupos C y N. *P<0.05 La flecha indica el momento en el que fue administrada la hormona LHRH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. 2. RATAS HEMBRA.

En la tabla 3 se presentan los resultados de las determinaciones bioquímicas realizadas con los sueros de ratas hembra controles y nefróticas del día 10 después de la administración de ANP. En esta tabla se observa que las ratas empleadas para los experimentos de estímulo a hipófisis y a gónada realmente eran nefróticas ya que presentaron las características de hipoproteinemia, hipercolesterolemia y proteinuria. Los valores de los días 3 y 7 en ratas hembras ya fueron reportados previamente (98).

Tabla 3.- Determinaciones bioquímicas de ratas hembra controles y nefróticas.

Grupo	Proteína sérica total. (g/dl)	Colesterol sérico. (mg/dl)	Proteína urinaria (mg/24hr)	n
C	10 ± 2	60 ± 3	7.3 ± 1.5	13
N	60 ± 2*	302 ± 34*	378 ± 44*	13

Los valores se presentan como promedio ± SEM. C = grupo control N = grupo nefrótico
* P < 0.0001.

En la figura 8 se presenta el perfil reproductivo de ratas hembra de grupos control y nefrótico publicado en 1995 por nuestro grupo (98) en el que se evaluaron los días 1, 3, 7 y 10 y se observó que las concentraciones de estradiol de ratas nefróticas disminuyen significativamente desde el día 3 y así se mantienen los días 7 y 10, en los que parece aumentar cada vez más la diferencia entre ellos hasta llegar a valores de cero en el día 10. Posteriormente en el día 7 aparecen diferencias significativas en los valores de las concentraciones de LH y finalmente en el día 10 también se presentan entre los valores de progesterona de ratas control y nefróticas. En este día 10 existen diferencias significativas en las concentraciones de LH, progesterona y estradiol. Es interesante notar que en las ratas hembra los valores de FSH no sufren modificaciones que puedan considerarse estadísticamente significativas como ocurre en los machos en donde los valores disminuyen a partir del día 7.

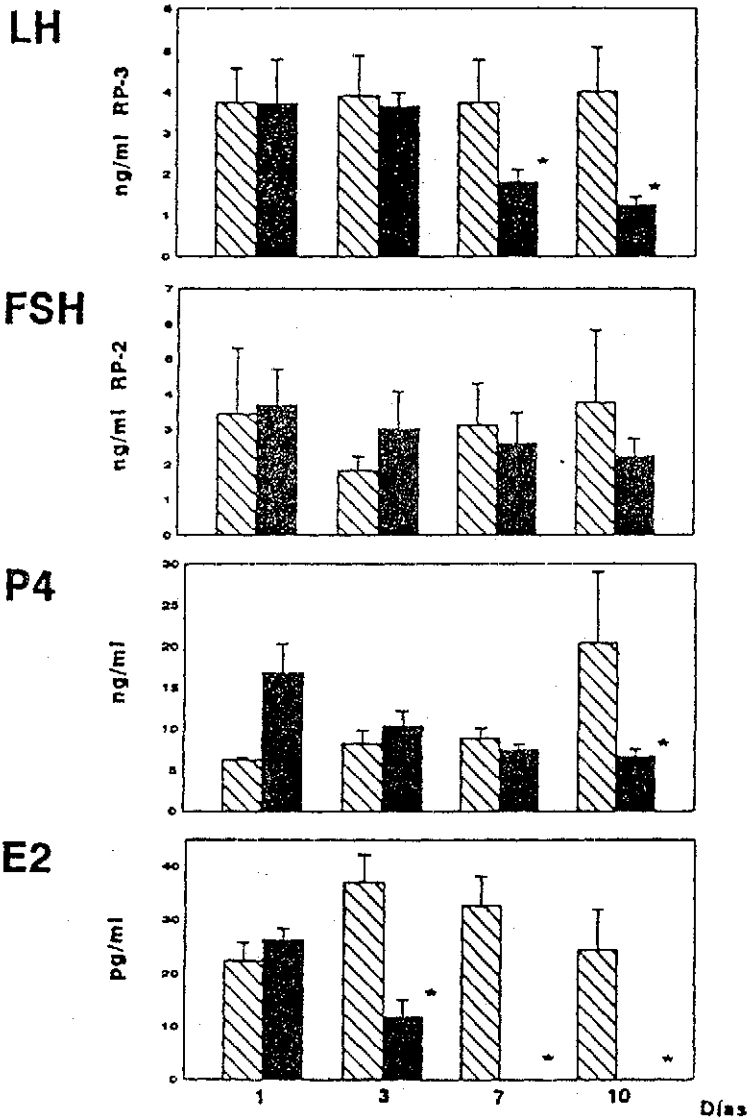


Figura 8. Se presenta el perfil reproductivo de las ratas hembra de los grupos control (barras rayadas) y nefrótico (barras negras) evaluados los días 1, 3, 7 y 10. Tomado de Menjivar et al 1995. (98).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 9 se observan los resultados correspondientes al seguimiento del ciclo estral. Los datos representan el promedio de dos experimentos. Las diferentes fases del ciclo estral están expresadas como el porcentaje de diestro, proestro y estro, respectivamente. Estos porcentajes juntos constituyen el 100% de las ratas. En las ratas control los ciclos tuvieron una duración de 4 días durante todo el tiempo de los experimentos. En las ratas nefróticas, el ciclo estral se alteró, los porcentajes de proestro y estro disminuyeron a 0% y los de diestro se incrementaron hasta 100% a partir del día 3 del estudio. En los días 6 y 7 del estudio se presentó un porcentaje pequeño (42 y 16%, respectivamente) de proestros pero no culminaron en estro.

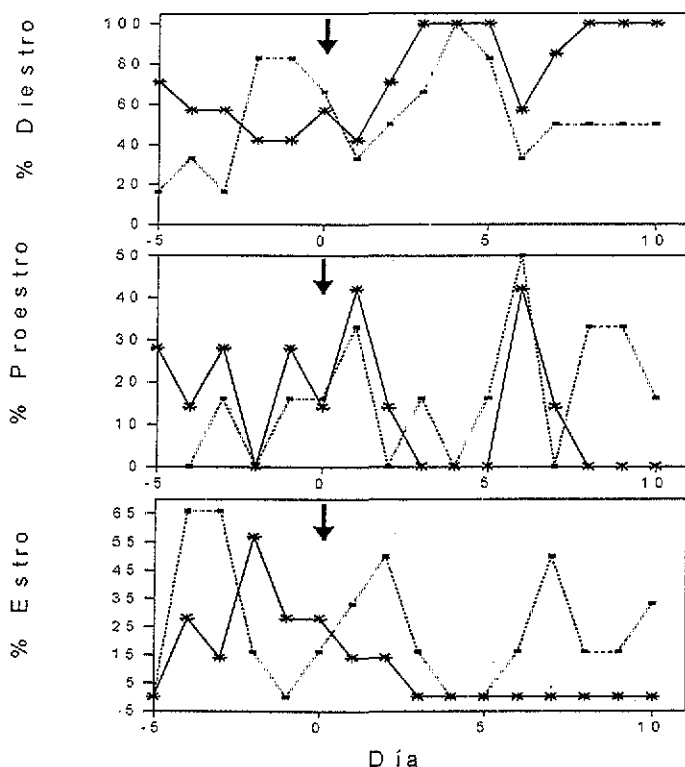


Figura 9. Seguimiento del ciclo estral por citología exfoliativa vaginal que se realizó 5 días antes y 10 días después de la administración de ANP (Día 0). Se registró el número diario de diestros, proestros y estros, como porcentaje de, al menos, 15 animales controles (cuadros) y 15 nefróticos (asteriscos), respectivamente. La flecha indica el día en el que se inyectaron con ANP.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

En la figura 10 observamos los resultados de la respuesta de la hipófisis al estímulo con LHRH de los grupos de ratas control y nefróticas (Etapa II grupo IIB) La concentración de LH, medida en cada tiempo estudiado, está significativamente disminuida en las ratas nefróticas A diferencia de lo que se presentó en los machos, las concentraciones de FSH no varían significativamente ni al comparar los valores de ratas control contra nefróticas, ni en las concentraciones que se presentaron después del estímulo con LHRH en ambos grupos

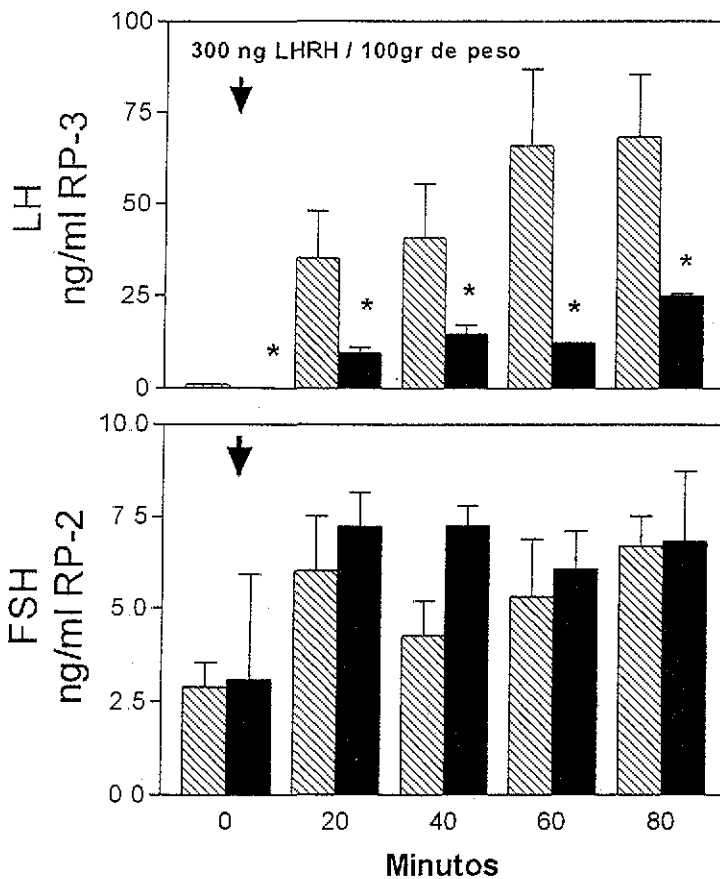


Figura 10. Concentraciones séricas de LH y FSH determinadas en cada intervalo de tiempo establecido después de la estimulación con LHRH en ratas de los grupos control (barras rayadas) y nefrótico (barras negras). Los valores se expresan como el promedio \pm EEM de dosis diferentes experimentos. Los datos se analizaron con el método ANOVA de dos vías para el efecto de grupo (control contra nefrótico) * $P < 0.0001$. La flecha indica el momento en que fue administrada la LHRH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 11 se presentan los datos obtenidos de progesterona y estradiol después de estimular a la rata *in vivo* con hCG. Se observan diferencias de concentración de progesterona y estradiol entre los grupos control y nefróticas con 1 dosis, la concentración encontrada en el día 10 casi se mantiene, mientras que los grupos con 4 dosis presentaron diferencias que ya fueron significativas. En los resultados de estradiol se observa que el día 10 se presentaron valores no detectables de estradiol y este valor se mantiene aún con la aplicación de 1 o 4 dosis de hCG.

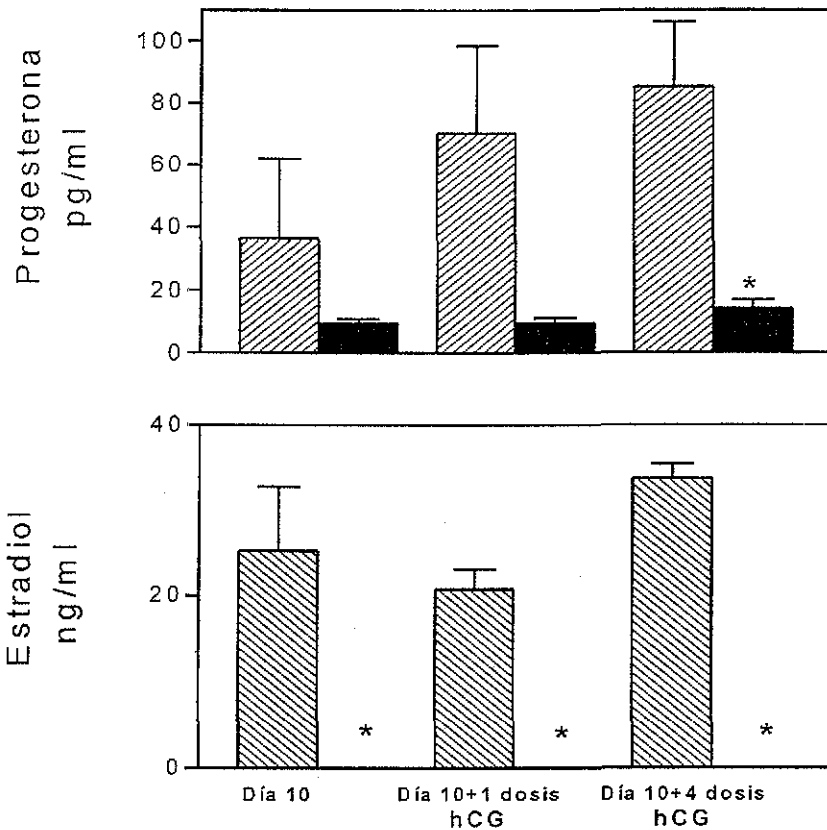


Figura 11. Concentraciones séricas de progesterona y estradiol de ratas de los grupos control (barras rayadas) y nefrótico (barras negras) determinadas en el día 10 antes y después de 1 o 4 dosis de hCG. Los valores se expresan como el promedio \pm EEM de dos diferentes experimentos. Se aplicó la Prueba de t de Student. * $P < 0.05$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. DISCUSIÓN.

Los resultados del presente trabajo demuestran la existencia de alteraciones en las unidades hipofisaria y gonadal del eje hipotálamo-hipófisis-gónada como consecuencia del establecimiento del síndrome nefrótico experimental. Particularmente los resultados indican que aun con diferencias entre los géneros, en ambos sexos se presentan fallas en la respuesta hipofisaria al estímulo con LHRH, así como en la respuesta gonadal al estímulo con hCG

Con el fin de determinar si las alteraciones endocrino-reproductivas se inician a nivel hipofisario o gonadal, en la primera etapa del estudio se evaluó cronológicamente el perfil hormonal en ratas de ambos sexos con síndrome nefrótico en estado agudo. Los resultados del perfil hormonal en machos (Figura 1) muestran que desde el día 3 posterior a la aplicación del ANP, todas las hormonas evaluadas presentan una tendencia a disminuir, la cual hacia el día 7 y 10 alcanza significancia estadística. Tomando en cuenta que se ha informado previamente que el estado agudo del síndrome nefrótico experimental se presenta entre los días 7-10 posteriores a la inducción del síndrome (102), los resultados indican, que las anomalías hormonales aparecen al mismo tiempo que las principales alteraciones bioquímicas de la nefrosis. Por otro lado la evaluación temporal del perfil hormonal de la rata hembra nefrótica, la cual fue previamente reportada por nuestro grupo (98), indica que a diferencia de los machos los cambios hormonales en la hembra nefrótica no se presentan en el mismo día (Figura 4). Así, a partir del día 3 la concentración de estradiol disminuye, a partir del día 7 la concentración de LH disminuye significativamente, y la concentración de progesterona disminuye hasta el día 10, la FSH no presenta cambio aparente a lo largo de todo el estudio. Esta evaluación nos permite observar que las alteraciones endocrino gonadales se presentan de manera diferente entre los géneros ya que, en la rata macho nefrótica, todas las hormonas cambian al mismo tiempo, y no es posible definir en qué unidad se inicia el daño endocrino. Sin embargo, en la rata hembra la disfunción hormonal reproductiva parece iniciarse en el ovario, o al menos la síntesis de estradiol parece ser la primera manifestación en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada por efecto de la nefrosis en la hembra. Este dato es muy interesante dado que en otra enfermedad del riñón como la falla renal se sabe que los valores de estradiol tienden a incrementarse sustancialmente (108), lo cual nos da un indicio de que el hipostrogenismo es una característica no solo importante desde el punto de vista reproductivo, sino distintiva de la nefrosis.

Adicionalmente, los datos de las mediciones temporales del perfil hormonal en ratas nefróticas de cualquier sexo nos conducen a las siguientes observaciones: a) la disminución en la concentración de esteroides sexuales circulantes tiene un impacto directo sobre sus actividades intracelulares en tejido blanco, así en los machos nefróticos el peso de próstata ventral y vesícula seminal disminuyen significativamente y en las hembras nefróticas es evidente la pérdida del ciclo estral, b) la disminución de esteroides sexuales como androstendiona y progesterona que se forman en las reacciones iniciales de la ruta esteroidogénica gonadal sugiere fuertemente la existencia de un daño en la esteroidogénesis testicular y ovárica en el síndrome nefrótico, y c) el hecho de que las concentraciones de ambas gonadotropinas no se eleven como respuesta a los niveles bajos y a veces casi indetectables de esteroides sexuales circulantes, también muestran una pérdida de los mecanismos de control por retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada asociado al síndrome nefrótico

En la segunda etapa del estudio se evaluó la función hipofisiaria de la rata nefrótica en base a una prueba dinámica con LHRH. En la rata macho, los resultados muestran una clara falla hipofisiaria ya que a pesar de que la concentración de ambas gonadotropinas aumentó a lo largo de los 80 minutos posteriores al estímulo con LHRH (Figura 2), tanto LH como FSH se liberaron en menor concentración con respecto a los animales control. Por su parte el estudio realizado en hembras nefróticas indica que solamente la respuesta hipofisiaria en términos de LH se altera (Figura 6), lo cual nos lleva a especular que ciertamente hay disfunción hipofisiaria, pero, que si esta unidad es capaz de liberar FSH en forma normal durante el síndrome nefrótico, tanto en condiciones basales como estimuladas con LHRH, se asume la existencia de mecanismos específicos involucrados en el control de la síntesis y liberación de cada gonadotropina y que aquel que regula a LH se encuentra específicamente afectado en la hembra con síndrome nefrótico. Estos resultados apoyan las evidencias reportadas respecto a la existencia de un factor liberador para FSH o FSHRH diferente del LHRH. Por ejemplo, el empleo de suero anti LHRH o el uso de antagonistas puede suprimir la liberación de LH sin alterar el pulso de FSH (103-104). Además, algunos péptidos inhiben la liberación de LH pero no la de FSH, mientras otros estimulan FSH sin afectar LH (103). En conjunto podemos decir que además de que los mecanismos hipofisiarios de control de LH y FSH puedan ser diferentes entre sí, estos se alteran de manera distinta según el género durante el síndrome nefrótico.

Condición semejante se ha reportado en otras enfermedades renales como la falla renal, en la que los hombres son más afectados que las mujeres (105-107)

Por otro lado, sabiendo de la necesidad de un apropiado estímulo de gonadotropinas para la síntesis de esteroides gonadales, el cual comprende un ritmo de liberación pulsátil y la glicosilación específica de LH y FSH (108-113), es posible pensar que durante el síndrome nefrótico pudiera haberse perdido el ritmo de liberación hormonal o que existan fallas a nivel de la glicosilación de las gonadotropinas, lo cual constituya el factor neuro-endocrino a partir del cual se desencadenan las alteraciones hormonales asociadas a la nefrosis.

En la siguiente etapa del estudio se evaluó la función gonadal en base a una prueba dinámica con hCG. Se emplearon dos diferentes esquemas de dosis del estímulo con hCG. En los machos nefróticos, ambos tratamientos resultaron en una respuesta testicular normal *in vivo* en términos de la biosíntesis de testosterona (Figura 5), lo que indica que la actividad biológica testicular de las gonadotropinas así como la maquinaria esteroideogénica aparentemente se preserva durante el síndrome nefrótico. Sin embargo, ya que las concentraciones de estradiol en ratas nefróticas antes y después de los estímulos con hCG fueron indetectables, y considerando que la síntesis de estradiol es responsabilidad de la enzima P450 aromataasa (P450arom) (testicular y periférica) (36), podemos concluir que en la condición nefrótica se presenta un efecto dañino sobre la P450arom el cual podría implicar un factor o elemento común que afecte a todos los promotores tejido-específico que se sabe regulan a la P450arom (114). Los resultados del estudio en animales hembra nefróticos son igualmente interesantes aunque diferentes. Encontramos que con los dos esquemas de aplicación de hCG a las hembras nefróticas no fue posible estimular la síntesis de progesterona y estradiol. En este caso los resultados sugieren que la enzima determinante en la síntesis de esteroides sexuales gonadales, la P450scc (side cleavage chain), la cual convierte pregnenolona a progesterona se alteran durante la nefrosis de la hembra, así como la P450arom mencionada en el caso de los machos nefróticos. Si bien estos resultados pueden ser explicados en base a fallas en la calidad de las gonadotropinas hipofisarias o por alteraciones sobre los receptores de LH y FSH, los hallazgos fueron inesperados dado que en un estudio previo (101) encontramos que las feromonas del macho intacto estimulan la síntesis de estradiol y restauran la función reproductiva en la hembra nefrótica. A este respecto podemos especular que a diferencia de uno o más bolos de hCG, las feromonas probablemente ofrecen un mecanismo más fino y positivo sobre el propuesto eje órgano vomeronasal-hipotálamo-hipófisis-gónada (115-120)

Los resultados del presente estudio amplían el conocimiento acerca de la disfunción endocrino reproductiva asociada al síndrome nefrótico. En conjunto los datos indican claramente que en la condición nefrótica se presenta disfunción hipofisiaria y gonadal, cuya manifestación es específica del género.

VI. CONCLUSIONES.

1. En el síndrome nefrótico experimental agudo inducido por ANP se presentan alteraciones hormonales que se instalan al mismo tiempo que las anormalidades bioquímicas características de este síndrome, es decir se inician en el día 3 posterior a la aplicación del ANP y alcanzan significancia estadística en los días 7 y 10
2. Durante el proceso de instalación y establecimiento del síndrome nefrótico se perdieron los mecanismos de control por retroalimentación que regulan el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, ya que, permanecen circulando concentraciones muy bajas de gonadotropinas con niveles de estradiol indetectables
3. La disfunción endocrino-reproductiva que se presentó en el síndrome nefrótico se manifestó de diferente manera entre los géneros.
 - a) En la rata macho nefrótica se dañan las funciones de la hipófisis y de la gónada al mismo tiempo (día 7) y como consecuencia de ello es en ese día en donde se observa una disminución significativa en las concentraciones de gonadotropinas y hormonas esteroides circulantes
 - b) En la rata hembra nefrótica la disfunción hormonal reproductiva parece iniciarse en el ovario debido a la disminución significativa de estradiol desde el día 3.
4. El síndrome nefrótico tuvo un efecto dañino sobre la función de las unidades del eje hipófisis-gónada y el resultado de esta disfunción se manifestó también de diferente manera en cada género.

- a) La hipófisis de ratas macho nefróticas respondió de manera atenuada al estímulo con LHRH para la secreción de LH y FSH. En las ratas hembra solo se alteran los mecanismos involucrados en el control de la síntesis y secreción de LH ya que la concentración de FSH se mantiene sin diferencias significativas al compararlas con el grupo control.
- b) La respuesta de las gónadas de animales nefróticos al estímulo con hCG reflejó una alteración en la ruta esteroidogénica que en los machos se presentó en la síntesis de estradiol y en las hembras desde la síntesis de progesterona.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1 Yen SSC. 1991. The hypothalamic control of pituitary hormone secretion 1991. En. Reproductive endocrinology Yen SSC, Jaffe RB, eds. Saunders, Filadelfia. 65-104
- 2 Green JD, Harris GW 1949 Observation of the hypophysoportal vessels of living rat J Physiol (Lond) 108:359-361
- 3 Oliver C, Mical RS, Porter JC 1977 Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk Endocrinology 101:598-604.
- 4 Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM 1979 Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by media eminence terminals in vitro Endocrinology 104:1749-1757
- 5 Evans WS, Rogol AD, MacLeod RM 1980 Dopaminergic mechanisms and luteinizing hormone secretion I Acute administration of dopamine agonist bromocriptine does not inhibit luteinizing hormone release in hyperprolactinemic women. J Clin Endocrinol Metab 50:103-107.
- 6 Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. 1971. Structure of porcine LH- and FSH- releasing hormone I. The proposed amino acid sequence. Biochem Biophys Res Commun 43:1334-1339
- 7 Seeburg PH, Adelman JP. 1984. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone Nature 311:666-668
- 8 Rasmussen DD, Gambacciani M, Swartz W, Tueros VS, Yen SSC. 1989. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from the human medio basal hypothalamus in vitro: Opiate receptor-mediated suppression Neuroendocrinology 49:150-156
- 9 Krsmanovic Iz, Stojilkovic SS, Cat KJ. 1996 Pulsatile gonadotropin releasing hormone release and its regulation Trends Endocrinol Metab 7:56.
- 10 OK-Kyong Park, Ramirez VD 1989 Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in same female rats Neuroendocrinology 50:66-72.
- 11 Conn PM 1986 The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action Endocr Rev 7:3-10.
- 12 Huseman CA, Kelch RP. 1978 Gonadotropin response and metabolism of synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during constant infusion of GnRH in men with delayed adolescence J Clin Endocrinol Metab 47:1325-1331.
- 13 Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW 1990. Molecular biology of pituitary gonadotropins. Endocr Rev 11:177-199.
- 14 Fiddes JC, Talmadge K 1984. Structure, expression and evolution of the genes for human glycoprotein hormones Recent Prog Horm Res 40:43-78.
- 15 Vaitukaitis JL, Ross GD, Braunstein GD 1976. Gonadotropin and their subunits basic and clinical studies Recent Prog Horm Res 32:289-331

16. Ulloa- Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S 1984. Production of all follicle - stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuroaminidase digestion. *Biol Reprod* 30:382-387
17. Ulloa-Aguirre A, Espinosa R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Dominguez R. 1988. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle- stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 38:70-78
18. Van-Hall EV, Vaitukaitis JL, Ross GT 1971 Effects of progressive desialylation on the rate of disappearance of immunoreactive hCG from plasma in rats *Endocrinology* 89 11-15
19. Veldhuis JD, Fraioli F, Rogoi AD 1986 Metabolic clearance of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 77.1122-1128
20. Keller PJ 1970 The renal clearance of follicle-stimulating and luteinizing hormone in serum following surgical hypophysectomy in man *J Clin Endocrinol* 30:325-329
21. Yen SSC, Llerena LA, Pearson OH. 1970. Disappearance rates of endogenous follicle-stimulating hormone in serum following surgical hypophysectomy in man *J Clin Endocrinol* 30.325-329.
22. Coble YD, Kohler PO, Tullner WW, Cargille CM 1971 Clearance of iodinated human follicle-stimulating hormone in *Macaca mulatta* *J Endocrinol* 51:783-4
23. Ying SY 1988 Inhibins, activins and follistatins: Gonadal proteins modulating the secretion of follicle- stimulatings hormone. *Endocr Rev* 9:267-293
24. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Roseblit N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH 1989. Lutropin-choriogonadotropin receptor: An unusual member of the G protein-coupled receptor family *Science* 245 494-499
25. Hekert LL, Daley II, Griswold MD. 1992. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene *Mol Endocrinol* 6 70-80
26. Luderer U, Schwatz NB. 1994. Acute changes in pulsatile LH y FSH secretion after ovariectomy in rats: treatment with estradiol for 24 h suppresses LH, but not FSH, for at least 48 h. *J Reprod Fertil* 100 613-621
27. Costagliola S, Niccoli P, Carayon P 1994. Glycoprotein hormone isomorphism and assay discrepancy: The paradigm of luteinizing hormone (LH) *J Endocrinol Invest* 17 291-299.
28. Leigh AJ, Chapman AJ, Shakil T, Wilson CA. 1994 The physicochemical, immunological and biological properties of rat pituitary and plasma LH *J Reprod Fertil* 101 489-499
29. Simpson ER 1979. Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P 450 and the control of steroidogenesis *Mol Cell Endocrinol* 13 213-217
30. Omura T, Morohashi K 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53 19-25

31. Lejeune H, Sánchez P, Saez JM 1998. Enhancement of long-term testosterone secretion and steroidogenic enzyme expression in rat testicular cell by co-cultured by human Sertoli cell-enriched preparations *Int J Androl* 21:129-140.
32. Genissel C, Levallet J, Carreau S 2001. Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production *J Endocrinol* 168:95-105
33. Muffly KE, Nazian SJ, Cameron DF Effects of immediate and delayed testosterone replacement on the Sertoli cell cytoskeleton and daily sperm production in hypophysectomized rats. *Biol Reprod*. 1994
34. Cooke BA. 1999 Signal trasduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanism in the control of steroidogenesis *Mol Cell Endocrinol* 151 25-35
35. Mc Lachlan RJ, Wrwford NG, O'Donnell L, de Kretser DM, Robertson DM 1996 The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148 1-9.
36. Simpson ER. 2000. Role of aromatase in sex steroid action *J Mol Endocrinol* 25 149-56.
37. Lejeune H, Habert R and Saez JM. 1998 Origin, proliferation and diferentiation of Leydig cells. *J Mol Endocrinol* 20 1-25
38. Stewart EA 2001 Gonadotropins and the uterus: is there a gonad-independent pathway?. *J Soc Gynecol Investig* 8 319-26
39. Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology *Recent Prog Horm Res* 43:231-276.
40. Camp TA, Rahal JO, Mayo KE 1991 Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary *Mol Endocrinol* 5:1405-1417
41. Piquette GN, Lapolt PS, Oikawa M, Hsueh AJM. 1991. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin- releasing hormone in culture rat granulosa cells *Endocrinology* 128 2449-2456
42. Segaloff DL, Wang H, Richards JS 1990. Hormonal regulation of luteinizing hormone/ chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4. 1856-1865
43. Miller WL 1988. Molecular biology of steroid hormone syntesis. *Endocr Rev* 9:295-318
44. Labrie F, Simard J, LuuThe V, Bélanger A, Pelletier G 1992 Structure, function and tissue- specific gene expresión of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissue *J Steroid Biochem Mol Biol* 43 805-826
45. Bruchovsky N, Wilson JD 1968. The conversion of testosterone to 5-androstan-17 β -ol-3 one by rat prostate in vivo and in vitro *J Biol Chem* 243:2012-2021.

- 46 Massa K, Stupnicka E, Kniewald Z, Martini L. 1972 The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and anterior pituitary *J Steroid Biochem* 3:385-399.
- 47 Richards JS. 1979 Hormonal control of ovarian follicular development: 1978 perspective. *Res Prog Horm Res* 35: 343-369
- 48 Peluso JJ, Luttmner S, Gruenberg ML 1984 Modulatory action of FSH on LH induced follicular growth in rats *J Reprod Fertil* 72 173-177
- 49 Hsueh AJW, Billing H, Tsafirri A 1994 Ovarian follicle atresia. a hormonally controlled apoptotic process *Endocr Rev* 15: 707-723.
- 50 Richards JS. 1980 Maturation of ovarian follicles and interaction of pituitary and ovarian hormones on follicle cell differentiation *Physiol Rev* 60 51-89
- 51 Louvet J-P, Vaitukaitis JL. 1976 Induction of follicle stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming *Endocrinology* 99 758-764
- 52 Tsonis CG, Carson RS, Findlay JK. 1984 Relationships between aromatase activity, follicular fluid estradiol 17β and concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles *J Reprod Fertil* 72 153-163
- 53 Schipper Y, Hop WCJ, Fauser CJM. 1998. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: Duration, rather than magnitude, of FSH increase effects follicle development *J Clin Endocrinol Metab* 83:1292-1298
- 54 Amnsterdan A, Rotmensch S 1990 Structure-function relationships during granulosa cell differentiation *Endocr Rev* 8: 309-337.
- 55 Baird DT 1990 The Ovary In Austing CR, Short RV, eds *Reproduction in mammals. Book 3 Hormonal Control of Reproduction Great Britain* Cambridge University Press pp 91-114
- 56 Graham JD, Clarke ChL 1997 Physiological action of progesterone in target tissues *Endocr Rev* 18:502-519
- 57 Freeman ME 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En Knobil E, Neil J eds *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, vol 1 pp 613-658
58. Turek FW, Van Cauter E 1994. Rhythms in reproduction. En Knobil E, Neil J, eds *The Physiology of reproduction* Raven Press, New York, vol 1, pp 487-540
59. O'Donnell 2001. Mechanisms and importance of hypertriglyceridemia in the nephrotic syndrome *Kidney Int* 59 380-382.
60. Hutchinson FN. 1993 Proteinuria, hyperlipidemia, and the kidney *Miner Electrolyte Metab* 19 127-136
61. Glasscock RJ y Brenner BM.1986 Glomerulopatías Importantes. En *Principios de medicina interna* Harrison TR ed Saunders, Filadelfia 294 2277-2290
62. Eddy AA, Schnaper WH 1998 The nep

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

63. Tencer J, Frinck I-G, Oquist BW, Alm P, Rippe B. 1998. Size- selectivity of the glomerular barrier to high molecular weight proteins:Upper size limitations of shunt pathways *Kidney Int* 53:709-715.
64. Tisher CC, Madsen KM 1991 *Anatomy of the Kidney* En Brenner BM, Rector FC. The Kidney. WB Saunders, Philadelphia pp 3-75
65. Hovart R, Hovorka A, Dekan G, Poczewski H, Kerjaschki D, 1986. Endotelial cell membranes contain podocalixin the mayor sialoprotein of viceral glomerular ephitelial cells. *J Cell Biol* 102:484-491.
66. Míner JH 1999. Renal basement membrane components *Kidney Int* 56:2016-2024
67. Pavenstädt H. 2000 Roles of the podocyte in glomerular function *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F173-F179
68. Messina A, Davis DJ, Dillante PC, Ryan GB 1987 Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis *Am J Pathol* 126:220-229.
69. Kanwar YS, Rosenzweig LJ 1982 Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of the viceral epithelium *Kidney Int* 21:565-574
70. Pedraza-Chaverrí J, Calderón P, Cruz C, Peña JC 1993 Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside- induced nephrotic syndrome *Renal Failure* 15:149-155
71. Yamauchi A, Imai E, Noguchi T, Takana T, Yamamoto S, Mikami H et al 1988. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats *Am J Physiol* 254:E676-E679
72. Pedraza-Chaverrí, J, Huberman A. 1991. Actinomycin D bloks the hepatic functional albumin mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats *Nephron* 59:648-650
73. Donckerwolcke RA, Vande Walle JG. 1997 Pathogenesis of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 51:S-72 - S-74
74. Hoedemaeker J *Experimental glomerulonephritis* En: Davidson Am eds *Nephrology*. Vol I Xth Int Congress of Nephrology Cambridge University Press, 1988:409-440.
75. Lesard J, Pestka S 1972. Studies on the formation of transference ribonucleic acid-ribosome complex *J Biol Chem* 247:6909-6912
76. Rabinovitz M, Fisher JM. 1962 A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein synthesis by Erlich ascites tumor cells *J Biol Chem* 23:477-481
77. Nathans D, Von Eherenstein G, Monro R, Lipmann F.1962 Protein synthesis from aminoacyl soluble ribonucleic acid *Fed Proc* 21:127-130
78. Baker BR, Joseph JP, Williams JH.1954 Puromycin synthetic studies VII Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 76:2838-2839.
79. WeeningJJ, Beukers JJB, Grond, Elema JD 1986. Genetic factors in focal segmental glomeruloesclerosis *Kidney Int* 29:789-798.
80. Borowsky BA, Kessner DM, Recant L.1958 Structural analogues of puromycin in production of experimental nephrosis in rats *Proc Soc Exp Biol Med* 97:857-860

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

81. Karnotsky DA, Clarkson BD 1965. Cellular effects of anticancer drugs. *Annu Rev Pharmacol* 3:57-428
82. Dickie N, Alexander CS, Nagasawa HT 1965. Inhibition of nucleic acid synthesis in *Escherichia coli* B by puromycin aminonucleoside. *Biochim Biophys Acta* 95: 156-169.
83. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky DA 1986. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 29: 478-483.
84. Nagasawa HT 1972. Identification and synthesis of the major nucleoside metabolite in rabbit urine after administration of puromycin aminonucleoside. *J Med Chem* 15: 177-181.
85. Nussenzveig I, Villela de Faria C, López de Faria J, Barros Magaldi J 1964. Aminonucleoside induced nephrotic syndrome in human beings: report of five cases. 2° Int Congress of Nephrol, *Experta Med Found Amsterdam* 506-510
86. Michael AF 1962. Experimental renal disease in monkeys I. Aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 11:1266-1278
87. Yamauchi H, Cheu D, Rooney P, Hopper J 1964. Renal lesions induced by aminonucleoside in dogs. *Arch Pathol* 77: 20-26
88. Nagasawa HT, Swingle KF, Alexander CS 1967. Metabolism of aminonucleoside-8-14C in the rat and guinea pig. *Biochem Pharmacol* 16:2211-2219
89. Frenk S, Antonowics VM, Craig JM, Metcoff J. 1955. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by puromycin aminonucleoside. Renal lesions and body electrolytes composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 89 424-427
90. Derr RF, Alexander CS, Nagasawa HT. 1967. Metabolism of puromycin aminonucleoside in the normal, "pre-nephrotic" and nephrotic rat. *Proc Soc Exp Biol Mex* 125: 248-252
91. Bohrer MP, Baylis V, Humes HD, Glasscock RJ, Robertson CR, Brenner BM 1978. Permeability of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations. *J Clin Invest* 61:72-78
92. Christensen EI, Carone FA, Rennke HG 1981. Effect of molecular charge on endocytic uptake of ferritin in renal proximal tubule cells. *Lab Invest* 44:351-356
93. Bertolatus JA, Hunsicker LG 1985. Glomerular sieving of anionic and neutral bovine albumins in proteinuric rats. *Kidney Int* 28 467-476.
94. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J 1993. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En *Tratado de Nefrología* Martínez-Maldonado M ed. Ediciones Norma, Madrid. 685-694
95. Brenner B, Coe F, Rector FC. 1987. Structure and function of the renal circulations. En *Renal Physiology in Health and Disease* Brenner B, Coe F, Rector F Eds. WB Saunders Co, Filadelfia
96. Glass AR, Beach J, Vigersky RA 1985. Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increase sensitivity to negative feedback effects of testosterone. *Metabolism* 34:574-579

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

97. Elias AN, Carreon G, Vaziri ND, Pandian MK, Oveisi F. 1992 The pituitary-gonadal axis in experimental nephrotic syndrome in male rats. *J Lab Clin Med* 120:949-954.
98. Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Merchant H, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J. 1995 Pituitary- ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome. *Eur J Endocrinol* 132: 502-506
99. Menjivar M, Vilchis F, Cardenas M, Cruz C, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J. 1997 Transient alteration of the reproductive function in nephrotic rats. *Life Sciences* 61: 1159-1167.
100. Ortiz G, Vilchis F, Cardenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri, Menjivar M. 1999 Reproductive function in rats with chronic nephrosis. *J Reprod Fertil* 117:223-228
101. Menjivar M, Cárdenas M, Ortiz G, Pedraza-Chaverri J. 2000. Fertility diminution in female rats with experimental chronic nephrosis. *Biol Reprod* 63: 1549-1554.
102. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chavez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña IC. 1990 Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin aldosterona system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 42: 29-38
103. McCann SM, Marabayashi U, Sun H-Q, Yu WH. 1993 Control of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone release by hypothalamic peptides. In GP. Chrousos, G. Tolis (eds) *Intraovarian regulators and polycystic ovarian syndrome: recent progress on clinical and therapeutic aspects*. Ann NY Acad Sci, New York, pp 687-55
104. Culler MD, Negro-Vilar A. 1987. Pulsatile follicle-stimulating hormone (LHRH) pulsatile replacement of LHRH bioactivity in LHRH-immunoneutralized rats. *Endocrinology* 120:2011-2021.
105. Pincus S, Veldhuis J, Mulligan T, Iranmanesh A and Evans W. 1997 Effects of age on the irregularity of LH and FSH serum concentrations in women and men. *Am J Physiol* 273: E 989- E995
106. Silbiger SR, Neugarten J. 1995. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 25:517-533.
107. Baylis C. Age-dependent glomerular injury damage in the rat. Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a primary risk factor. *J Clin Invest* 94: 1823-1829
108. Kaiser UB. 1998. Molecular mechanism of regulation of gonadotropins gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cells* 8: 647-56
109. Marshal JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. 1991. Gonadotropin-releasing hormone pulses regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 47: 155-87.
110. Baenziger JU, Brodbeck RM, Smith PL, Beranek MC. 1992. Circulatory Half-Life but not interaction with the Luteotropin/Chorionic Gonadotropin Receptor is Modulated by Sulfation of bovine luteotropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:334-338

111. Smith PL, Baenziger JU 1992 Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N acetylglactosamine-transferase 89:129-333.
- 112 Filicori M, Flamingni C 1988 Physiology and pathophysiology of pulsatile gonadotropin secretion. *Gynecol Endocrinol* 2:73-85
- 113 Veldhuis JD, Pincus SM 1998. Orderliness of hormone release patterns a complementary measure to conventional pulsatile and circadian analyses *Eur J Endocrinol* 138:358-362.
- 114 Simpson E, Davis S 2001 Minireview. Aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis-some new perspectives *Endocrinology* 142:4589-4594.
- 115 Wirsing-Wiechmann CD, Wiechman AF 2001 The prairie vole vomeronasal organ is a target for gonadotropin-releasing hormone *Chem Senses* 26:1193-202.
- 116 Rössler P, Kroner C, Krieger J, Löbel D, Beerlt, Boekhoff I 2000 Cyclic adenosine monophosphate signalling in the rat vomeronasal organ. role of an adenylyl cyclase type VI. *Chem Senses* Band 25. S 313-322.
- 117 Berliner DL, Monti-Bloch L, Jennings-White C, Diaz-Sanchez V 1996 The functionality of the human vomeronasal organ (VNO). evidence for steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:259-65
- 118 Dudley CA, Rajendren G, Moss RL 1996 Signal processing in vomeronasal system modulation of sexual behavior in female rat *Cerit Rev Neurobiol* 10:265-90
119. Rajendren G, Dudley CA, Moss RL 1993 Influence of male rats on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in female rats role of the vomeronasal organ. *Neuroendocrinology* 57:898-906
- 120 Singer AG, Clancy AN, Macrides F, Agosta WC, Bronson FH 1988. Chemical properties of a female mouse pheromone that stimulates gonadotropin secretion in males *Biol Reprod* 38:193-9

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ARTICULOS ORIGINALES

Los datos del presente trabajo se publicaron en los artículos que a continuación de muestran y fueron presentados en el congreso: Endocrine Society's 84th Annual Meeting celebrado en San Francisco California, Estados Unidos de América el 21 de junio de 2002



ELSEVIER

Life Sciences 70 (2002) 2769–2782

Life Sciences

Evaluation of the pituitary-testicular function during experimental nephrosis

M. Menjivar^{a,*}, M.G. Ortiz-López^b, F. Vilchis^c, L. Díaz-Bonilla^a,
E. Zambrano^c, T. Zariñán^d, J. Pedraza-Chaverri^a

^aDepartment of Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, Mexico City, Mexico

^bDepartment of Reproductive Biology, Hospital Juárez de México, CP 07760, Mexico

^cDepartment of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, CP 14000, Mexico

^dResearch Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Ginecobiología N 4 "Luis Castelazo Ayala", IMSS CP 01090, Mexico City, Mexico

Received 19 June 2001; accepted 7 December 2001

Abstract

To investigate the pituitary-testicular function in nephrotic rats, a sequence of experiments was undertaken in adult male rats after a single dose of puromycin aminonucleoside (PAN). Endocrine modifications were evaluated chronologically throughout the experimental disease in order to determine the appearance of hormone alterations which lead to the axis dysfunction. Serum concentration of LH, FSH, androstenedione, total and free testosterone, estradiol as well as urine testosterone were measured by specific RIAs on days 3, 7 and 10 after treatment on nephrotic and control groups. Prolactin was also evaluated on day 10. Likewise, total weight of various androgen responsive tissues from both groups was recorded, and the number of androgen receptor (AR) binding sites were determined. To know the functional status of the hypophyseal-testicular unit, groups of nephrotic and control rats were stimulated with LHRH (300 ng/100 g b w) or with one or four doses of hCG (8 UI), respectively. Additionally, the relative *in vitro* biological activity of FSH from nephrotic and control rats before and after LHRH stimulus was determined. The results from the hormonal profile revealed clear endocrine disorders characterized by a progressive diminution of all serum hormones except prolactin and urine testosterone, which remained unmodified. The weight of the main androgen responsive tissues, the ventral prostate and the seminal vesicle, decreased parallelly to androgen diminution. The binding analysis of AR shows

* Corresponding author. Facultad de Química, Edif B, 2 piso, Lab 209, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Mexico City, Mexico. Fax: +52-55-56-22-35-15

E-mail address: menjivar@servidor.unam.mx (M. Menjivar)

a significant elevation of the available androgen sites in all analyzed tissues except kidney and hypothalamus. The secretion of LH and FSH from nephrotic animals after LHRH administration was lower than that from intact animals at the registered times. Interestingly, the biological activity of FSH from nephrotic rats was not detectable at both, before and after LHRH administration. Testicular response to hCG stimuli, in terms of testosterone synthesis was not significantly different in the two groups analyzed with respect to the intact animals. By contrast, no response was observed in terms of estradiol production at either one or four doses of hCG. On the whole, the results presented herein allow us to conclude that experimental nephrosis has a harmful effect on the pituitary-testicular axis, and strongly suggests that the endocrine dysfunction is initiated at the hypophyseal level; even though a specific testicular damage is also present © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Nephrosis; Sex steroid hormones; Gonadotropins; LHRH; hCG; Bioactivity

Introduction

Human and experimental nephrotic syndrome are mainly characterized by profound alterations in the metabolism of plasma proteins [1]. In children this illness has been associated with poor growth at puberty and delayed secondary sexual development [2]. Likewise, during adulthood endocrine disorders have been related to nephrotic syndrome. However, most endocrinological studies of this illness concern themselves with the investigation of the pituitary-thyroid axis function [3,4]. Thus, although it is well known that the gonadal function is adversely affected by renal diseases, such as chronic renal failure [5], only few studies have examined this important issue in the nephrotic syndrome. To our knowledge, the pituitary-gonadal axis in male nephrotic rats has been the object of two reports; unfortunately, however, their findings are not consistent. Glass et al. found hypogonadotropic-hypogonadism [6] and Elias et al. hypergonadotropic-hypogonadism [7].

In an attempt to obtain more precise information about the endocrine disorders associated with the nephrotic syndrome, our group has previously established the existence of pituitary-ovarian dysfunction in the nephrotic syndrome [8] as well as the effect of the nephrotic stage upon fertility capacity [9] using the rat experimental model. In the present study, in a time course experiment the reproductive hormonal profile was characterized, and the pituitary and the testicular function was separately evaluated in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome.

Methods

Reagents

Puromycin aminonucleoside (PAN) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). LHRH 0.1 mg/ml (Relefact LHRH, Hoechst AG, Frankfurt, Germany) hCG 5000 U/ml (gonadotropyl-c, Hoechst Marion Roussel, Mexico City, México) [17 -methyl- 3 H]dimetilnor-

testosterone (DMNT; ca=89 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear Boston, MA. All other chemicals were reagent grade and available commercially.

Animals

Adult male Wistar rats weighing 200-250 g were maintained under 14:10 h light:darkness cycles. Water and food pellets were available *ad libitum*

Experimental design

Nephrotic syndrome was induced by a single subcutaneous injection of a 2% PAN solution (15 mg/100 g body weight) in 0.9% saline [10]. The control groups received a sham-injection of saline. Rats were kept in metabolic cages for 24 h before the experiments to collect urine samples. Animals were killed by decapitation on days 3, 7 and 10 after treatment. Serum samples were then collected and stored at 20 °C until assayed. Prostate and seminal vesicles were excised, cleaned and weighed.

Pituitary function

On day 10 five groups of nephrotic (n=5) as well as five groups of intact animals (n=5) were selected to receive a single i.p. dose of LHRH (300 ng/100 g body weight), one group from each treatment killed at 0, 20, 40, 60 and 80 minutes respectively, after releasing factor administration. Serum samples were stored to measure LH and FSH concentrations. The same experiment was performed five times.

Testicular function

Two groups of nephrotic (n=5) as well as two groups of intact animals (n=5) were stimulated with hCG (8 UI/dose); one of each group received a single dose on day 10 while the other group received a daily dose of hCG for four days, from day 7 to 10 after PAN administration. The animals were killed on day 10 and serum was stored at 20 °C until testosterone and estradiol measurements were made. The experiment was performed twice.

Hormone assay

Serum LH, FSH, and prolactin were measured by specific radioimmunoassay using the double antibody technique with reagents and protocol supplied by the National Hormone and Pituitary Program (NIDDK, Baltimore, MD). The intra- and inter-assay coefficients of variations were 5.1% and 6.5% for LH, 4% and 7.9% for FSH, and 5.2% and 7.1% for prolactin respectively. The results were expressed in ng/ml of the international reference standard NIH LH-RP-3, FSH-RP-2 and PRL-RP-3. Serum concentrations of androstenedione, total and free testosterone and estradiol were measured by radioimmunoassay using kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA). The intra- and inter-assay coefficients of variation

Table 1

Biochemical determinations in serum and urine from control (C) and nephrotic (N) rats

Days	Serum total protein ^a g/dl	Serum cholesterol ^a md/dl	Serum albumin ^a g/dl	Urine protein ^a mg/24 h	n
3 C	73 ± 0.2	56.3 ± 3	3.2 ± 0.1	15.3 ± 2	3
N	5.9 ± 0.4	80.4 ± 7	3.4 ± 0.2	27.7 ± 4	7
7 C	7.7 ± 0.2	76.6 ± 4	3.4 ± 0.1	24.9 ± 4	3
N	4.4 ± 0.1	357.0 ± 21	1.4 ± 0.06	570.0 ± 44	7
10 C	8.3 ± 0.4	62.2 ± 7	3.1 ± 0.08	29.8 ± 7	3
N	5.0 ± 0.1	324.0 ± 16	1.2 ± 0.03	410.0 ± 56	9

Results are expressed as mean ± SEM

^a Two-way ANOVA; p < 0.0001

were 6.1% and 8.3% for androstenedione, 4.4% and 8.2% for total testosterone, 3.6% and 9.7% for free testosterone, and 6.1% and 7.4% for estradiol respectively.

Androgen receptor

[17-³H]-methyl-³H] dimethylornitesterone ([³H]DMNT) (1-2 nmol/L) was used as the radioligand in the incubation of cytosolic fraction extracted from the ventral prostate, the seminal vesicle, the kidney, the hypothalamus and pituitary of control and nephrotic animals on day 10 after PAN administration. Non-specific binding was determined by the addition of an excess (100 fold) of radioinert DMNT [11].

Analytical determinations

The total protein in serum and urine as well as cholesterol in serum were measured by colorimetric methods, as described previously [8,10].

In vitro bioassay of FSH

The human embryonic kidney-derived 293 cell line transfected with the human FSH receptor cDNA was kindly donated by Dr. Aaron J.W. Hsueh, Stanford University, CA,

Table 2

Body weight and androgen-dependent tissue weights from control (C) and nephrotic (N) rats

Days	Body weight ^a g	Ventral prostate ^b g	Seminal vesicle ^b g	n
3 C	298 ± 9.2	0.20 ± 0.01	0.63 ± 0.01	3
N	250 ± 8.7	0.16 ± 0.01	0.36 ± 0.02	7
7 C	307 ± 14	0.30 ± 0.03	0.71 ± 0.04	3
N	297 ± 8.7	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.05	7
10 C	310 ± 15	0.23 ± 0.02	0.72 ± 0.07	3
N	276 ± 8.6	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.01	9

Results are expressed as mean ± SEM.

^a Two-way ANOVA; p=0.003.^b Two-way ANOVA; p < 0.0001.

USA. The origin, handling, ligand specificity and biochemical properties of the recombinant human FSH receptor expressed by this cell line have been described elsewhere [12]. Trans-

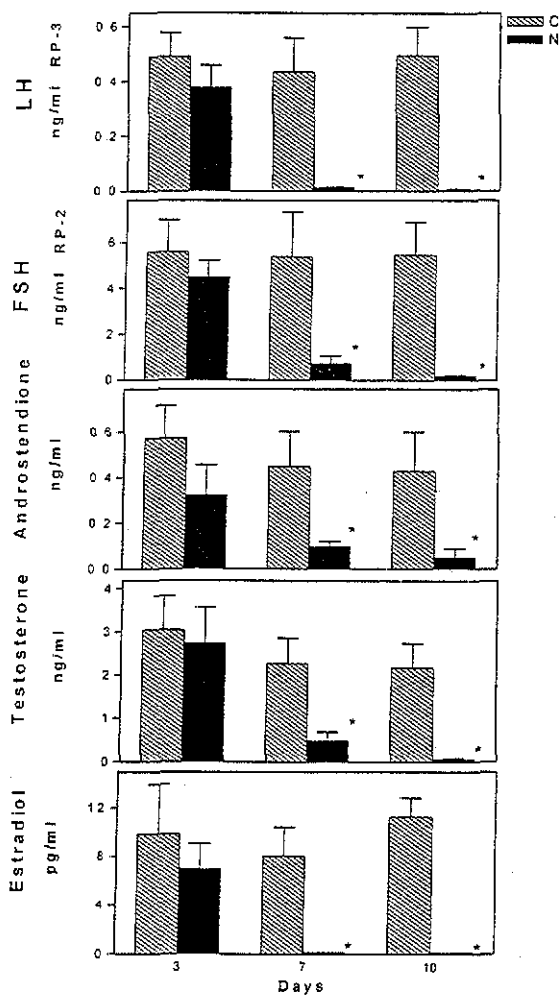


Fig 1 Serum hormone concentrations from control (C) and nephrotic (N) rats determined on days 3, 7 and 10 after PAN administration. Values show the mean \pm SEM. *two way ANOVA, $p < 0.0001$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

61

fectured 293 cells (2×10^5 cells/culture dish) were exposed to increasing doses of each serum samples from control and nephrotic rats, obtained before and 40 minutes after LHRH stimulus. Each serum samples were added to the cells in the presence of 0.125 mM 3-isobutyl-/methylxanthine (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) for 24 h at 37 °C. After incubation,

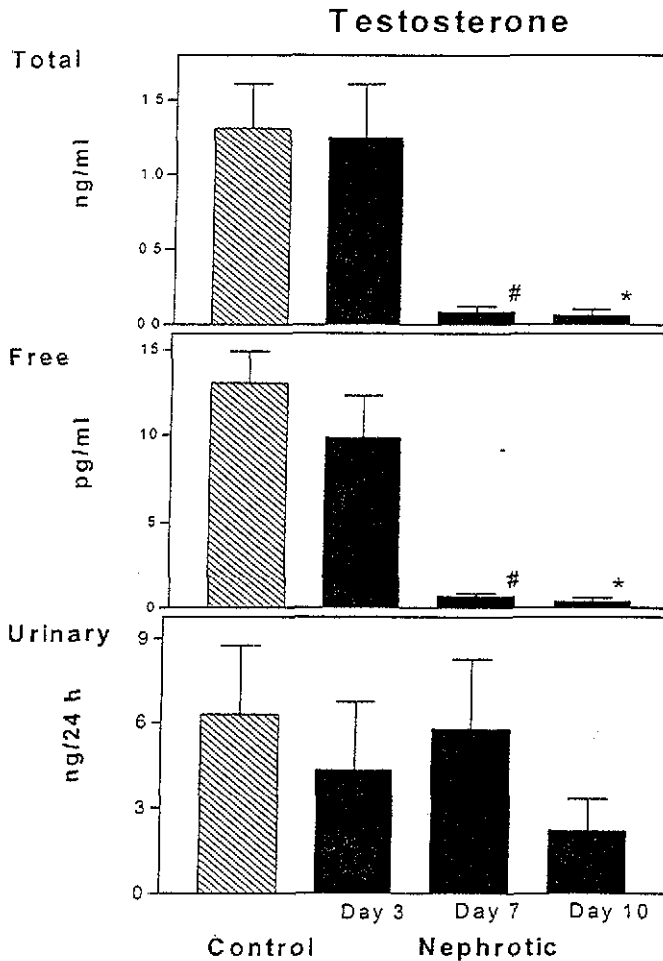


Fig. 2. Serum total, free and urine testosterone data from control and nephrotic males at all time points. Values show the mean \pm SEM. # one way ANOVA, $p < 0.05$ of control vs nephrotic group on day 7. * one way ANOVA, $p < 0.001$ of control vs nephrotic group on day 10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

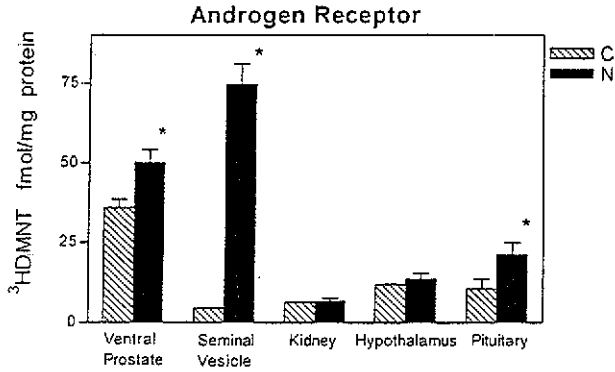


Fig. 3 Specific binding of [³H]dimethylnortestosterone (DMNT) in cytosol from various tissues obtained from control (C) and nephrotic (N) rats. Cytosol fractions (100 μl) were incubated overnight with saturating amount of [³H]DMNT (4.0 nM) with or without a 100-fold excess of unlabelled DMNT. Data are presented as the mean value (±SEM) of specifically bound [³H]DMNT for four determinations. * Student's *t*-test, *p* < 0.05 of control vs nephrotic

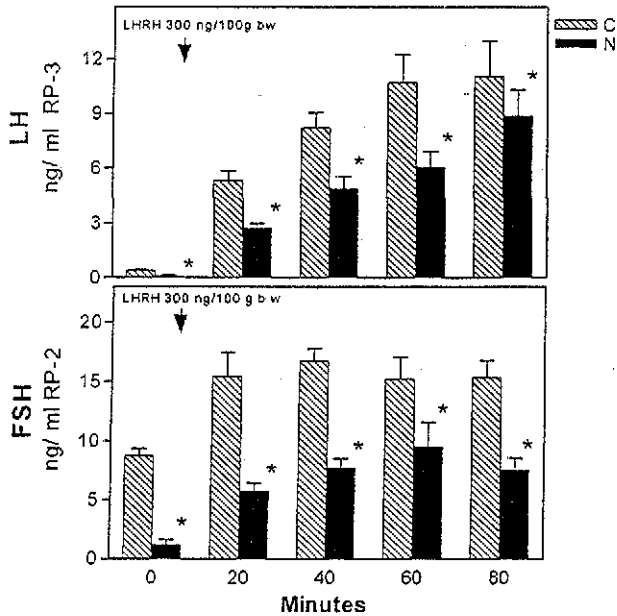


Fig. 4. Serum LH and FSH concentrations determined at each time point after LHRH stimulation in control (C) and nephrotic (N) groups. Values are expressed as the mean ± SEM. * = two way ANOVA for the effect of group (nephrotics or controls), *p* < 0.0001. Arrow shows the time when LHRH was administered.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

total (intra- and extracellular) cAMP concentrations were determined by radioimmunoassay after acetylation of both the samples and cAMP standards.

cAMP radioimmunoassay

The radioimmunoassay of cAMP was performed as previously described by Zambrano et al. 1996 [13]. The assay employed 2-*O*-monosuccinyl cAMP tyrosylmethyl ester (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) iodinated by the chloramin-T method as the labelling ligand and the CV-27 cAMP antiserum (NIDDK) at a final dilution of 1:150,000. After incubation at 4 °C for 24 h, antibody-bound and free cAMP were separated by ethanolic precipitation followed by centrifugation at 1200 g at 4 °C. The intra- inter-assay coefficients of variation were <6% and <12%, respectively. The standard curve was constructed using rat FSH-RP-2 (NIDDK) and human recombinant FSH (rec-FSH;Org32489, Organon International BV, Oss; Holland) as the FSH standards. Each serum sample from control or nephrotic rats was tested for *in vitro* bioactivity at 4 different doses ranging from 12.5 to 75 IU/culture dish, in triplicate incubations. The relative *in vitro* biological activity of FSH was calculated considering each dose analyzed and is expressed as the bioassay/immunoassay (B/I) activity ratio, in this case, the ratio of activity in the *in vitro* bioassay relative to the activity in the radioimmunoassay (B/RIA).

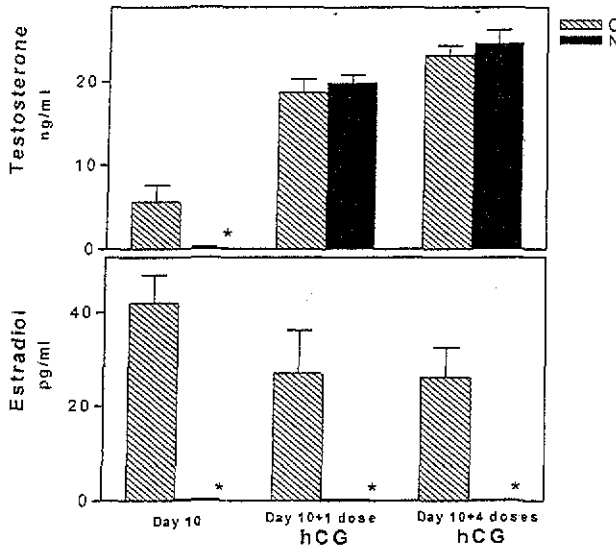


Fig. 5 Serum testosterone and estradiol concentrations from control (C) and nephrotic (N) rats, determined on day 10 before and after 1 or 4 doses of hCG. * Student's *t*-test, $p < 0.05$ of control vs. nephrotic.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

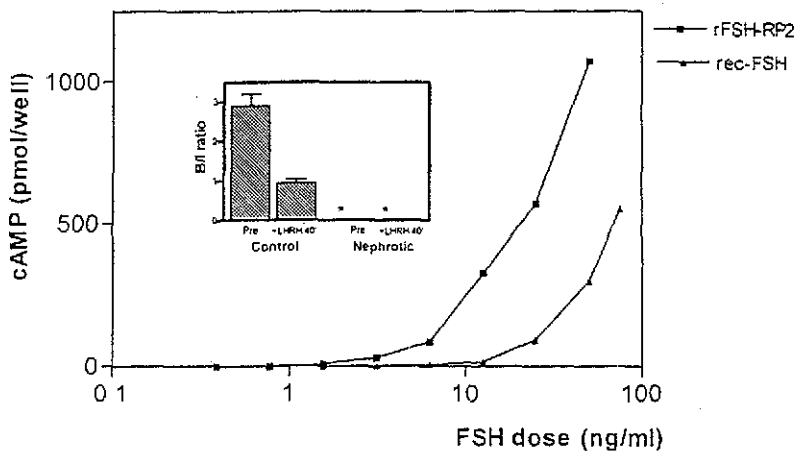


Fig 6. Bioactivity of FSH in terms of cAMP production by 293 cells transfected with hFSH receptor. Standard curves were performed with rat rFSH-RP2 and human rec-FSH. *Inset*: the B/I ratio for control and nephrotic groups, before (Pre) and 40 minutes after LHRH stimuli. Values show the mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

Statistical analysis

The results of biochemical determination and tissue weights (Tables 1 and 2), as well as hormonal measurements on days 3, 7 and 10, or after LHRH stimulus (Figs 1 and 4), were evaluated by two-way ANOVA. Data from total, free and urinary testosterone (Fig. 2) were analyzed by one way ANOVA and the Dunnett test. The unpaired student's t-test was used to assess data from binding of androgen receptor (Fig. 3), results of testosterone or estradiol concentrations released after gonadotropin stimulus (Fig 5), as well as to evaluate differences between FSH B/I ratio (Fig 6). $P < 0.05$ was considered to be significant. Statistical analysis was performed by using analyzing Data with Graph Pad Prism (version 3; Graph Pad Software, San Diego, CA).

Results

The nephrotic stage in male rats was evident in PAN-injected animals on days 7 and 10 by the presence of proteinuria, hypoproteinemia, hypoalbuminemia and hypercholesterolemia (Table 1). The reproductive profile evaluated on days 3, 7 and 10 is shown in Fig. 1. A common pattern for all evaluated hormones can be observed in all nephrotic groups, on days 7 and 10, LH, FSH, androstenedione, testosterone and estradiol levels were found significantly reduced in nephrotic groups respect control rats. Similarly, as shown in Fig 2, total testosterone as well as free testosterone concentrations dropped drastically from day 7, whereas, the urine tes-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

65

tosterone remained unchanged. Besides, on day 10, no differences were detected in prolactin concentration in nephrotic males compared with control groups (nephrotics = 2.64 ± 0.26 versus controls = 2.95 ± 0.30 ng/ml, $n=10$).

The changes in the body weight and male sex accessory organ weights from control and nephrotic groups are summarized in Table 2. The average of the initial body weight was 265 ± 21 g, which mostly decreased on day 3 after PAN administration; however, on days 7 and 10 we have to consider that these animals presented intraperitoneal fluid retention. The weight of ventral prostate decreased markedly on days 7 and 10 from nephrotic rats, in the same way, the weight of seminal vesicle decreased significantly from day 3, in all PAN-treated animals.

To assess whether the nephrotic stage induced changes in the concentrations of androgen receptors, experiments were conducted in cytosolic fractions from different target tissues. As can be seen in Fig. 3, the tissues from nephrotic animals contained more [3 H]DMNT-binding sites than those of the control group. The androgen binding sites concentration showed significant differences in prostate, seminal vesicles and pituitary, but not in the kidney or hypothalamus.

The in vivo effect of gonadotropin-releasing hormone (LHRH) on the pituitary in terms of LH and FSH released, is presented in Fig. 4. The results show the mean of five experiments performed. After LHRH administration, nephrotic animals consistently exhibited a minor LH and FSH concentrations respect to the control groups. Even though, the circulating gonadotropin concentrations increased in nephrotic rats after pituitary stimulus, they never reached the control values.

We next studied the functional status of the testicular unit by in vivo hCG administration. Fig. 5 shows a fairly similar testosterone response in nephrotic as well as in control animals, either with one dose of hCG on day 10 or 4 doses of hCG administered during the acute phase of the illness. In contrast, no changes were noticed in estradiol concentration from nephrotic males after both, one or 4 doses of hCG.

In the present study, we also examined the capacity of FSH to induce a measurable response in a bioassay system. A cell line transfected with the human FSH receptor which has been optimized in a heterologous test for rats [12] was employed and to properly interpret the results, pituitary standards from human and rats were included. As can be observed in Fig. 6, using increasing doses of both rat (RP-2) and human (rec) FSH standards an appropriate cAMP production by transfected 293 cells were observed. However, the relative in vitro bioactivity of FSH from nephrotic rats was not able to induce response in the bioassay system (Fig. 6, inset). The discrepancy between B/I ratio in serum from control before (Pre) and 40 minutes after LHRH administration has been observed by other authors [14] and explained by the limited pituitary reserve to synthesize bioactive forms of gonadotropin under highly demanding conditions such as the administration of pharmacological doses of exogenous LHRH.

Discussion

To address the relevance of reproductive dysfunction during the nephrotic syndrome, in this study we investigated the pituitary-testicular axis status on the experimental model of this

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

important disease. The findings can be numbered as follows; 1) diminution of gonadotropin and steroid hormones, 2) decrease of both total and free testosterone in serum without urinary losses, 3) increase in the number of androgen receptor binding sites on ventral prostate, seminal vesicle and pituitary, 4) diminution of pituitary response to LHRH stimuli, 5) undetectable *in vitro* FSH bioactivity, and 6) abnormal testicular response to hCG, particularly in terms of estradiol biosynthesis.

The time-course study was designed to know if the hormonal changes were initiated at the pituitary or at the gonadal level. Taking into account the fact that the acute stage of experimental nephrotic syndrome is presented between days 7 to 10 [15], the results indicate that all hormones were affected and that all those hormonal abnormalities appear once the main biochemical characteristics of nephrosis were installed (Fig. 1 and Table 1). By contrast, in previous report from female nephrotic rats [8] it was found that among other important changes, estradiol decrease significantly since day 3 and FSH do not change along the study. Thus, even though with these results we could not clarify in which part of the reproductive axis the dysfunction was initiated, we can conclude that axis abnormalities are different between the gender and, as we have previously established in female nephrotic rats [8], hypogonadotropic-hypogonadism is the hallmark of male nephrosis.

The data from hormonal measurements also showed a lack of elevation of gonadotropin levels in spite of the steroid withdrawal in nephrotic rats, which reflected a lack of feed back control of hypothalamic-pituitary unit. However, the significantly diminution of steroid hormones from androstenedione to estradiol could also indicate a damage in the testicular steroid synthesis pathway. Likewise, the diminution of ventral prostate and seminal vesicle weights revealed the impact of steroid hormone diminution upon those tissues during the study. To know if such hormonal alterations were the result of an hypersensitivity to the negative feedback effect of testosterone, as mentioned by Glass et al. [6], we first investigated, using the time-course experiment design, the concentration of total, free and urinary testosterone in male nephrotic rats. Interestingly, the results showed that neither testosterone (free or total) nor the urinary testosterone increased during the experimental nephrosis; on the contrary, they tended to decrease (Fig. 2), thus indicating that the hypogonadotropic-hypogonadism can not be explained by the effect of an increased free fraction of the circulating testosterone upon the pituitary or hypothalamic unit. Secondly, we made the analysis of the androgen receptor by measuring the number of the available androgen binding sites in nephrotic tissues. We found that the receptor sites increased not only in the androgen dependent tissues of the ventral prostate and seminal vesicle but also in the pituitary. Even though these data supported the idea of a possible hypersensitivity of the pituitary to testosterone via an increase in the number of androgen receptors, these phenomenon could be simply due to the androgen depletion [16].

Next, the study was conducted to evaluate the pituitary and the testicular function during the acute stage of the nephrotic syndrome. The results of the evaluation of the pituitary function clearly revealed a pituitary failure in the nephrotic rats. The amount of LH and FSH secreted by nephrotic males during the 80 minutes evaluated after the injection of hypothalamic releasing factor (LHRH), significantly decreased, as compared with untreated males. The results showed a minor (or delayed) but sustained increase in serum LH and FSH

concentrations, which could describe either a partially loss of LHRH pituitary response via its own receptor or a significant reduction in gonadotropin synthesis. These data support the hypothesis that states that an aberrant neuroendocrine regulation of LHRH or LH/FSH secretion could be the starting point of the endocrine dysfunction associated with nephrotic syndrome [8]. Similarly, alterations in the hypothalamic-pituitary unit have been reported in both human and animal model of chronic renal failure [17,18]. Interestingly, the endocrine alterations are not the same in chronic renal failure than those observed during the acute or chronic state of nephrotic syndrome [19,20]. For example, though hyperprolactinemia is common in uremia [21], our results show consistently normal prolactin concentrations. Taken together, these data strongly suggest the existence of more than one factor or mechanism by which the hypothalamic and/or the pituitary unit are affected at each specific disease. This interesting issue deserves future research.

Throughout this study we have analyzed the testicular function in nephrotic rats with dynamic test, specifically by using two different doses schemes of the hCG stimuli. Both treatments resulted in a normal *in vivo* testicular response of nephrotic males in terms of testosterone biosynthesis (Fig 5), indicating that the testicular biological activity of gonadotropins as well as the steroidogenesis machinery were apparently preserved. However, since circulating estradiol concentrations from nephrotic rats were not detectable at time zero and after either of the hCG stimuli, and considering that it is known that testicular Leydig cells possess the capacity to synthesize estrogen [22,23], we speculate that the nephrotic condition has a specific harmful effect upon aromatase (P450 arom, testicular and peripheral). Indeed, the results from this dynamic test as well as from previous reports of acute and chronic nephrosis show that hypoestrogenism is a predominant feature of nephrotic syndrome [8,9,19,20].

In order to explore if the minor pituitary response to LHRH stimuli as well as the low capability of the testis to respond to hCG, specifically in terms of estradiol production, were related not only with FSH quantity but also with its quality, a bioassay system was performed. The results clearly show that FSH from nephrotic rats has lost the ability to bind to the target cell receptor even though it can survive in the circulation and be detected by immunological assay. Likewise, based on the fact that the regulation of P450 arom is controlled by gonadotropin hormones via a cAMP-dependent mechanism [24], the loss of FSH bioactivity is in accordance with the failure observed in estradiol biosynthesis from nephrotic rats (Fig 5). These data strongly suggest that during the nephrotic syndrome the pituitary production and secretion of gonadotropin is highly altered.

In conclusion, the results of this study demonstrate the existence of pituitary-testicular axis dysfunction during the experimental nephrotic syndrome. The present data also show that the pituitary function is highly diminished and the estradiol biosynthesis is completely suppressed.

Acknowledgments

The authors thank the National Hormone and Pituitary Program (Bethesda, MD) for providing rat LH, FSH and prolactin biological materials for assay performance.

References

1. Glasscock RJ, Adler SG, Ward HJ, Cohen AH. Primary glomerular diseases. In: Brenner BM, Rector FC, editors. *The Kidney*. Philadelphia: WB Saunders, 1991. pp 1181–253
2. Rees L, Greene SA, Adlard P, Jones J, Haycock GB, Rigden SP, Preece M, Chantler C. Growth and endocrine function in steroid sensitive nephrotic syndrome. *Archives of Disease in Childhood* 1988;63: 484–90
3. Ito S, Kano K, Ando T, Ichimura T. Thyroid function in children with nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology* 1994;8:412–5.
4. Adlkofer F, Hain H, Meinhold H, Kraft D, Ramsden D, Herrmann J, Heller W. Thyroid function in patients with proteinuria and normal serum creatinine concentration. *Acta Endocrinologica* 1983;102:367–76.
5. Emmanouel DS, Lindheimer MD, Katz AI. Pathogenesis of endocrine abnormalities in uremia. *Endocrine Reviews* 1980;1:28–33
6. Glass AR, Beach J, Vigersky RA. Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increased sensitivity to negative feedback effects of testosterone. *Metabolism* 1985;34:574–9
7. Elias AN, Carreon G, Vaziri ND, Pandian MR, Oveisi F. The pituitary-gonadal axis in experimental nephrotic syndrome in male rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1992;129:949–54
8. Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Merchant H, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J. Pituitary-ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome. *European Journal of Endocrinology* 1995;132: 502–6
9. Menjivar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J. Transient alteration of the reproductive function in nephrotic rats. *Life Sciences* 1997;61:1159–67
10. Pedraza-Chaverri J, Calderón P, Cruz C, Peña JC. Electrophoresis analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Renal Failure* 1981;15:149–55
11. Griffin JE, Punyashthiti K, Wilson JD. Dihydrotestosterone binding by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from control subjects and from patients with hereditary male pseudohermaphroditism due to androgen resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 1976;57:1342–51
12. Tilly JL, Aihara T, Nishimori K. Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* 1992;131:799–806
13. Zambrano E, Barrios-de-Tomasi J, Cárdenas M, Ulloa-Aguirre A. Studies on the relative in vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Molecular Human Reproduction* 1996;2:563–71.
14. Zariñán I, Olivares A, Söderlund D, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Changes in the biological: immunological ratio of basal and GnRH-releasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. *Human Reproduction* 2001;16:1611–8.
15. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chavez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. *Revista de Investigación Clínica* 1990;42:29–38
16. Burgess LH, Handa RJ. Hormonal regulation of androgen receptor mRNA in the brain and anterior pituitary gland of the male rat. *Brain Research. Molecular Brain Research* 1993;19:31–8.
17. Veldhuis JD, Wilkowski MJ, Zwart AD, Urband RJ, Lizarralde G, Iranmanesh A, Bolton WK. Evidence for attenuation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) impulse strength with preservation of GnRH pulse frequency in men with chronic renal failure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993;76:648–54
18. Handelsman DJ, Spaliviero IA, Turtle JR. Hypothalamic-pituitary function in experimental uremia hypogonadism. *Endocrinology* 1985;117:1984–95.
19. Ortiz G, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, Menjivar M. Reproductive function in male rats with chronic nephrosis. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999;117:223–8

20. Menjivar M, Cárdenas M, Ortiz G, Pedraza-Chaverri J. Fertility diminution in female rats with experimental chronic nephrosis. *Biology of Reproduction* 2000;63:1559-64.
21. Handelsman DJ. *Hypothalamic-pituitary gonadal dysfunction in renal failure, dialysis and renal transplantation*. *Endocrine Reviews* 1985;6:151-82.
22. Carreau S, Papadopolus V, Drosowsky MA. Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology* 1988;122:1103-9.
23. Lanzino M, Catalano S, Genissel C, Ando S, Carreau S, Hamra K, McPhaul MJ. Aromatase messenger RNA is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli, and germ cells of the rat testis. *Biology of Reproduction* 2001;64:1439-43.
24. Wickings EJ, Hillier SG, Reichen Jr LE. Gonadotropin control of steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 1986;76:677-84.

**Dynamic tests and FSH biological activity in female rats
with acute nephrotic syndrome.**

¹María Guadalupe Ortiz-López, ²Mario Cárdenas, ³Teresa Zariñán, ⁴Laura Díaz-Bonilla,
²Elena Zambrano, ⁴José Pedraza-Chaverrí, ⁴Marta Menjívar.

¹Department of Reproductive Biology, Hospital Juárez de México, ²Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ³Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Ginecobstetricia N°4 "Luis Castelazo Ayala", IMSS, ⁴Department of Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México Mexico City, MEXICO.

Keywords: Nephrosis, sex steroid hormones, gonadotropins, LHRH, hCG, FSH bioactivity.

Short title: Dynamic test and FSH bioactivity in nephrotic syndrome.

Address correspondence to:

Dra Marta Menjívar, Facultad de Química, Edif. B, 2° piso, Lab. 209, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Mexico City, MEXICO.

Fax: (52) --55-56-22-35-15, e-mail: menjivar@servidor.unam.mx

Abstract

To investigate the pituitary-ovarian status during the acute state of the nephrotic syndrome, a sequence of experiments were undertaken in adult female rats after a single dose of the puromycin aminonucleoside (PAN). The functional condition of the hypophyseal-ovarian unit was determined in control and nephrotic rats by two dynamic tests. In the first one, 10 days after PAN or placebo administration female rats were stimulated with LHRH (300 ng/100 g b.w.) and samples were collected at 0, 20, 40, 60 and 80 minutes after releasing factor administration. The second dynamic test, which was performed in control and nephrotic rats, consists of one (day 10 after PAN) or four (between days 7 to 10 after PAN) doses of hCG (8 UI), respectively. In all cases, serum samples were collected on day 10. In addition, the relative *in vitro* biological activity of FSH from control and nephrotic rats before and after LHRH stimulus was determined. The results reveal that after a stimulatory dose of LHRH the secretion of LH was significantly diminished in nephrotic rats at all registered times. By contrast, normal response was observed in terms of FSH secretion in nephrotic females. On the other hand, no ovarian response, in terms of progesterone or estradiol synthesis, was observed in nephrotic rats after either one or four stimuli with hCG. Interestingly, in spite of the normal or high concentrations of FSH, the biological activity of FSH was totally abolished in nephrotic rats. On the whole, the results from this study indicate that the nephrotic syndrome had a harmful effect on the pituitary-ovarian unit, and strongly suggest that the endocrine dysfunction could be initiated at the hypophysial level; even though a specific ovarian damage is also predictable.

Introduction

Renal diseases are complex disorders where usually, in addition to the specific damage upon renal structures, alterations in the endocrine system are also present (1-5). In this context, our group has characterized the reproductive-endocrine alterations associated specifically to the nephrotic syndrome at both, experimental model and male patients (6-11). Particularly, using the puromycin aminonucleoside (PAN) compound, which reproduces the nephrotic syndrome, similar to the minimal changes human disease (12), we have reported that female nephrotic syndrome is characterized by loss of estrous cycle, follicular atresia, low circulating LH and undetectable levels of estradiol as well as fertility diminution (6-7, 9). However, the existence of specific alterations at the pituitary and/or ovarian unit remain unknown. Accordingly, the present study was designed to assess, based on two different dynamic tests and the evaluation of the FSH biological potency, the status of the pituitary and the ovary during the acute stage of the experimental nephrotic syndrome.

Materials and methods

Reagents

Puromycin aminonucleoside (PAN), 1-methyl-3-isobutyl-xanthine and 2-O-monosuccinyl cAMP tyrosylmethyl ester were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Reagents for RIA of LH and FSH were kindly provided by the National Hormone and Pituitary Program (NIH) (Baltimore, MD). RIA kits for progesterone and estradiol were purchased from Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA, USA). LHRH 0.1 mg/ml (Relefact LHRH), was from Hoechst AG (Frankfurt, Germany). hCG 5000 U/ml (gonadotrophyl-c), was from Hoechst Marion Roussel (Mexico City, México). All other chemicals were of reagent grade and available commercially.

Animals

Adult female Wistar rats of 2-month-old, weighing 220 to 250 g at the start of the experiments, were used. Only those animals showing 4-day estrous cycles were included. The animals were fed with Lab Diet brand animal food containing not less than 23% crude protein from PMI Feeds (St Louis, MO). Water and food pellet were available *ad libitum*.

Monitoring the estrous cycle

The ovarian cycle was monitored throughout the study based on the vaginal smear patterns, considering that ovulation occurs around every 4 days with proestrus, estrus, diestrus 1 and diestrus 2 phases, and classifying the stages accordingly to Fox *et al.* (13) and Freeman *et al.* (14) criteria.

Experimental design

Nephrotic syndrome was induced by a single subcutaneous injection of a 2% PAN solution (15 mg/100 g body weight) in 0.9 % saline (15). Control rats received a sham-injection of

saline. On day 9 rats were kept in metabolic cages for 24 hours to collect urine samples. Animals were killed by decapitation on day 10 after each dynamic test was performed and serum samples were collected and stored at 20°C until assayed

LHRH dynamic test

The pituitary function was evaluated by the measurement of the LH and FSH released in response to LHRH administration. On day 10 five groups of nephrotic as well as five groups of control rats (n=5) received a single i.p. dose of LHRH (300 ng/ 100 g body weight) and thereafter, one group from each treatment was killed at 0, 20, 40, 60 and 80 minutes respectively.

hCG dynamic test

The ovarian function was evaluated by the measurement the progesterone and estradiol released in response to hCG administration. Two groups of nephrotic as well as two groups of intact animals (n=5) were stimulated with (8 UI/ dose); one of each group received a single dose on day 10 while the other group received a daily dose of hCG for four days, from day 7 to 10 after PAN administration. The animals were killed on day 10 and blood serum was stored until the performance of steroid hormone measurement

Hormonal assays

Serum LH and FSH were measured by specific RIA by using the double antibody technique with reagents and protocol supplied by NIH. The intra- and inter-assay coefficients of variations were 5.1% and 6.5% for LH and 4% and 7.9% for FSH, respectively. The results are expressed in ng/ml of international reference standards NIH LH-RP-3 and FSH-RP-2. The steroid hormones, progesterone and estradiol, were also measured by specific RIA. The intra and inter-assay coefficients of variations were 2.1% and 6.0% for progesterone and 3.8% and 7.1% for estradiol, respectively.

Analytical determinations

Considering that nephrotic syndrome is characterized by proteinuria, hypoproteinemia and hypercholesterolemia, total protein in serum and urine as well as cholesterol in serum were measured by spectrophotometric methods, as reported by Pedraza-Chaverri *et al.* (6, 15)

In vitro bioassay of FSH

The human embryonic kidney-derived 293 cell line (HEK-293) transfected with the human FSH receptor cDNA was kindly donated by Dr. Aaron J.W. Hsueh, Stanford University, CA, USA. The origin, handling, ligand specificity and biochemical properties of the recombinant human FSH receptor expressed by this cell line have been described by Tilly *et al.* (16). This system has been optimized as a heterologous test for rats where standards from human and rats have been included (16, 10). Transfected 293 cells (2×10^5 cells/culture dish) were exposed to increasing doses of each serum samples from control and nephrotic rats, obtained before and after LHRH stimulus. Each serum sample was added to the cells in the presence of 0.125 mM 1-methyl-3-isobutyl-xanthine for 24 h at 37°C. After incubation, total (intra- and extracellular) cAMP concentrations were determined by RIA after acetylation of the samples and cAMP standards.

cAMP radioimmunoassay

The RIA of cAMP was performed as previously described by Zambrano *et al.* 1996 (17). The assay employed 2-*O*-monosuccinyl cAMP tyrosylmethyl ester iodinated by the chloramin-T method as the labeling ligand and the CV-27 cAMP antiserum (NIDDK) at a final dilution of 1:150,000. After incubation at 4°C for 24 h, antibody-bound and free cAMP were separated by ethanolic precipitation followed by centrifugation at 1,200xg at 4°C. The intra- and inter-assay coefficients of variation were <6% and <12%, respectively.

The standard curve was constructed using rat-FSH RP-2 and human LER-907 as the FSH standard. Each sample was tested for *in-vitro* bioactivity at 4 different doses ranging from 12.5 to 75 μ l/culture dish, in triplicate incubations. The relative *in vitro* biological activity of FSH was calculated considering each dose analyzed and is expressed as the bioassay/immunoassay (B/I) activity ratio, the ratio of activity in the *in vitro* bioassay relative to the activity in the RIA (B/RIA).

Statistical analyses

The results are expressed as mean \pm SEM. Biochemical determinations (Table 1) were analyzed by unpaired student's *t*-test. Serum LH and FSH concentration measured after LHRH (Figure 1) as well as differences between FSH B/I ratio (Figure 3) were analyzed by two-way ANOVA. The unpaired student's *t*-test was used to assess the progesterone and estradiol released after hCG dynamic test (Figure 2). $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed by the program Analyzing Data with Graph Pad Prism version 3, 1999 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA).

Results

PAN-injected rats developed marked proteinuria, hypoproteinemia, hyperlipidemia and ascitis on day 10 (Table 1) which revealed the nephrotic stage of the female animals. Likewise, as we have reported previously, female nephrotic rats lost the normal estrous cycle and set the animals at diestrous stage. Table 1 shows the results as percentage of diestrus (D), proestrus (P) and estrus (E) stage in both groups of rats.

The results of the LHRH dynamic test is presented in Figure 1. As can be observed LH increased slightly after the LHRH stimulus in nephrotic females compared to control rats. In contrast, the FSH discharge increased in parallel in nephrotic and control females.

The effect of the hCG dynamic test is shown in Figure 2. The data revealed that gonadal response, in terms of progesterone and estradiol released after one dose of hCG on day 10 or four doses of hCG between days 7 to 10, was null in nephrotic females.

The evaluation of the FSH biological potency of serum samples from control and nephrotic females is shown in Figure 3. This figure shows the B/I FSH ratio from nephrotic and control rats before (Pre) and after (20' and 40') the LHRH administration. It is observed that the FSH bioactivity from nephrotic rats was significantly lower than the ratio yielded by control groups. The inset of Figure 3 shows a parallel dose dependent cAMP production in response to increased doses of both human and rat standards. The discrepancy between B/I ratio in serum from control before (Pre) and 20 and 40 minutes after the LHRH administration has been observed by other authors (18) and explained by the limited

pituitary reserve to synthesize bioactive forms of gonadotropin under highly demanding conditions such as the administration of pharmacological doses of exogenous LHRH.

Discussion

The result of the present set of experiments demonstrates that the nephrotic syndrome leads to an important dysfunction upon the pituitary-ovarian unit. Particularly in nephrotic females the minor LH concentration released under baseline and after the LHRH-stimulated condition, in addition to the low biological potency of the circulating FSH, clearly reveals the harmful effect of nephrosis upon the pituitary function. Likewise, the limited response to hCG stimulation in terms of progesterone and estradiol released from nephrotic female rats strongly suggests ovarian damage associated with the nephrotic condition.

So that GnRH can stimulate gonadotropin secretion, it is important that be released in pulsatile fashion from the hypothalamus to the hypophysial portal circulation (19). In a previous report (6) we speculated that the hypothesis proposed by Handelsman and Dong with respect to uremia model, which state that the aberrant neuroendocrine regulation of GnRH secretion is the pivotal point from which all changes on the pituitary-gonadal function follow could be applied to explain the endocrine dysfunction observed in the nephrotic syndrome. Now with the results of the LHRH and hCG dynamic tests, we think that the endocrine dysfunction associated to the nephrotic syndrome is an even more complex phenomenon. Indeed, the fact that the pituitary gland from nephrotic rats was able to release FSH in a normal fashion, but not LH, after LHRH stimulation indicates that even though there exists an activation via LHRH receptor, there are different mechanisms involved in the synthesis and releasing process of each gonadotropin and that one specifically involved with LH is affected during the nephrotic syndrome. These results are in agreement with the evidence that indicates that there must be a separate FSH-releasing

factor (FSHRF) because the pulsatile release of LH and FSH can be dissociated. For example, LHRH antisera or antagonists can suppress the pulsatile release of LH without altering the FSH pulses (20, 21). In addition, a number of peptides inhibit LH but not the FSH release while a few stimulate FSH without affecting LH (20). On the other hand, since the biological activity of FSH decreases significantly in nephrotic females (Figure 3), and since it is well established that biological potency, the metabolic clearance rate and the circulating half-lives of FSH are a consequence of the structural differences of the FSH molecule that differ in the degree of glycosilation (22), an alteration in the glycosilation mechanisms of FSH during the nephrotic syndrome is strongly suggested. Besides, the ovarian inability from nephrotic rats to synthesize estradiol (Figure 2), which is highly dependent on bioactive FSH (23), supports this issue. Recently has been reported that (10) contrary to what occurs in this study in nephrotic females, in male nephrotic rats not only the amount of LH but also the FSH secreted by the pituitary gland on baseline and after LHRH stimulation were significantly lower than the controls, thus suggesting a gender difference in the pituitary status during the nephrotic syndrome. On the whole, the results presented here clearly show a pituitary failure associated with the female nephrotic syndrome, which include alterations in the synthesis, releasing and glycosilation process of gonadotropins.

The results of the ovarian function evaluation (Figure 2) indicate on baseline or after the hCG dynamic test that nephrotic rats lose the capacity to synthesize two of the most important steroid hormones in females, progesterone and estradiol. This finding was unexpected since in previous investigation of female chronic nephrosis, the ovarian capacity to synthesize estradiol was restored with pheromone stimulation (9). Perhaps the

delicate regulatory mechanism that orchestra the female follicular development (24) requires a more precise stimuli that one or four bolus of hCG. Moreover, considering that during folliculogenesis LH and FSH stimulate the steroid production in granulosa and theca cells by inducing, through their specific receptors, the expression of steroidogenic enzymes, particularly P450scc and P450arom (25), it is possible to assume the existence of alterations on the gonadotropin receptors and/or steroidogenic enzymes during the acute stage of the nephrotic syndrome.

In summary, the results of the present study extend the current knowledge about the endocrine-reproductive dysfunction associated to the nephrotic syndrome. The undoubted alterations upon the pituitary and the ovarian unit found in this study suggest that the impact of the endocrine disorders may be clinically important in women with nephrotic syndrome.

Acknowledgment

The authors thank to the National Hormone and Pituitary Program (Bethesda, MD) for providing rat LH and FSH biological materials for assay performance.

References

1. Haack D, Scharer K, Asam-Taucher A, Vecsei P: Glucocorticoid receptor in idiopathic nephrotic syndrome *Pediatr Nephrol* 13: 653-656, 1999.
2. Ito S, Kano K, Ando T, Ichimura T: Thyroid function in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 8: 412-415, 1994.
3. Holdsworth S, Atkins RC, de Kretser DM: The pituitary-testicular axis in men with chronic renal failure. *N Engl J Med* 296: 1245-1249, 1977.
4. Handelsman DJ, Spaliviero JA, Turtle JR: Hypothalamic-pituitary function in experimental uremic hypogonadism. *Endocrinology* 117: 1984-1995, 1985.
5. Ramirez G, Butcher D, Brueggemeyer CD, Ganguly A: Testicular defect: the primary abnormality in gonadal dysfunction of uremia. *South Med J* 80: 698-701, 1987.
6. Menjívar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Merchant H, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J. Pituitary-ovarian dysfunction in rats with induced nephrotic syndrome: *Eur J Endocrinol* 132: 502-506, 1995.
7. Menjívar M, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pérez-Palacios G, Pedraza-Chaverri J: Transient alteration of the reproductive function in nephrotic rats. *Life Sci* 61: 1159-1167, 1997.

8. Ortiz G, Vilchis F, Cárdenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, Menjivar M: Reproductive function in male rats with chronic nephrosis. *J Reprod Fertil* 117: 223-228, 1999.
9. Menjivar M, Cárdenas M, Ortiz G, Pedraza-Chaverri J: Fertility diminution in female rats with experimental chronic nephrosis. *Biol Reprod* 63: 1559-1564, 2000.
10. Menjivar M, Ortiz-López MG, Vilchis F, Díaz-Bonilla L, Zambrano E, Zariñán T, Pedraza-Chaverri J: Evaluation of the pituitary-testicular function during experimental nephrosis. *Life Sci* 70: 1-14, 2002.
11. Menjivar M, Ortiz G, Vilchis F, Pedraza-Chaverri J, Larrea F, Correa-Rotter R: Pituitary-testicular axis alterations in men with nephrotic syndrome. In: Program of 81st annual meeting of the Endocrine Society; 1999; San Diego, CA. Abstract P2-435.
12. Lewandowski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kent JD, Jeferson LS: Effect of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 254: C634-C642, 1988.
13. Fox R.R: Sexual cycles. In: E.S.E. Hafez (ed). *Reproduction and Breeding Techniques of Laboratory Animals* Lea & Febiger; Philadelphia, 1970, pp 115-125.
14. Freeman ME: The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil, J.D. Neill, G.S. Greenwald, L.M. Clement, W.P. Donald (eds), *The Physiology of Reproduction*, vol. 2, 2nd ed Raven Press, New York, 1994, pp 613-658.
15. Pedraza-Chaverri J, Calderón P, Cruz C, Peña JC: Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Ren Fail* 15: 149-155, 1981
16. Tilly JL, Aihara T, Nishimori K: Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding signal transduction, and

- identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* 131: 799-806, 1992.
17. Zambrano E, Barrios-de-Tomasi J, Cárdenas M, Ulloa-Aguirre A: Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 2: 563-571, 1996.
18. Zariñán T, Olivares A, Söderlund, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A: Changes in the biological:immunological ratio of basal and GnRH-releasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 16: 1611-1618, 2001.
19. Themmen APN, Huhtaniemi I: Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21: 551-583, 2000.
20. McCann SM, Marabayashi U, Sun H-Q, Yu WH: Control of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone release by hypothalamic peptides. In: GP. Chrousos, G. Tolis (eds). *Intraovarian regulators and polycystic ovarian syndrome: recent progress on clinical and therapeutic aspects*. Ann NY Acad Sci, New York, 1993; pp 687-55.
21. Culler MD, Negro-Vilar A: Pulsatile follicle-stimulating hormone (LHRH): pulsatile replacement of LHRH bioactivity in LHRH-immunoneutralized rats. *Endocrinology* 120: 2011-2021, 1987.
22. Flack MR, Froehlich J, Bennet AP, Anasti J, Nisula BC: Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. *J Biol Chem* 269: 14015-14020, 1994.
23. Wicking EJ, Hillier SG, Reichert Jr LE: Gonadotropin control of steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. *J Reprod Fertil* 76: 677-684, 1986.

24. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil, J.D. Neill, G.S. Greenwald, L.M. Clement, W.P. Donald (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1994, pp 613-58.
25. Burns KH, Yan C, Kumar TR, Matzuk MM: Analysis of ovarian gene expression in follicle-stimulating hormone β knockout mice. *Endocrinology* 142: 2742-2751, 2001.

Table 1:

Estrous cycle and biochemical data from control (C) and nephrotic (N) rats on day 10

Group n=5	Cycle phase			Serum total protein ^a g/dl	Serum cholesterol ^a (mg/dl)	Urine protein ^a (mg/24 h)
	D%	P%	E%			
C	50	16	33	10.1±0.21	59.8±2.6	7.3±1.5
N	100	0	0	6.0±0.19*	302.4±33*	377.9±44*

^aValues represent mean±SEM. *p<0.05

Figure legends

Figure 1.

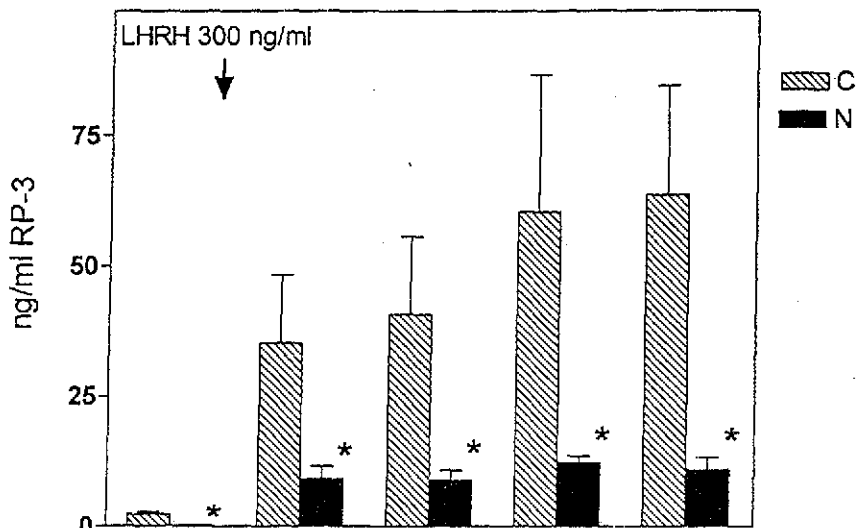
Serum LH and FSH concentrations measured at each time point after LHRH stimulation in control (C) and nephrotic (N) groups. Values are expressed as the mean \pm SEM of three different experiments. *= two way ANOVA for the effect of group (nephrotic or control), $p < 0.0001$. Arrows show the time when LHRH was administered

Figure 2.

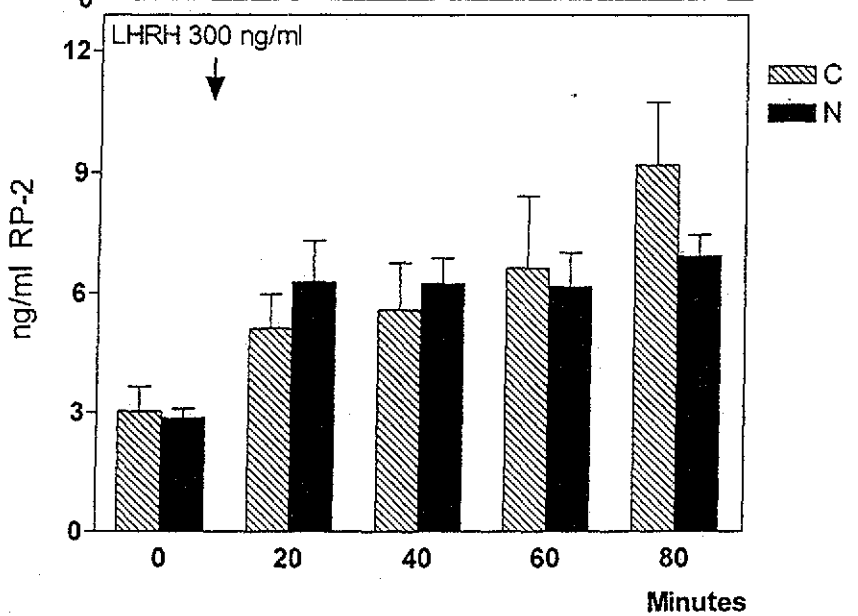
Serum progesterone and estradiol concentrations from control (C) and nephrotic (N) rats, determined on day 10 before and after 1 or 4 doses of hCG. Values are expressed as the mean \pm SEM of three different experiments.* Student's *t*-test, $p < 0.05$ of control vs nephrotic.

Figure 3. Bioactivity of FSH in terms of cAMP production by 293 cells transfected with hFSH receptor. The B/I ratio for control and nephrotic groups, before (Pre) as well as 20 and 40 minutes after LHRH dynamic test Inset: standard curves were performed with rat rFSH-RP2 and human rec-FSH. Values show the mean \pm SEM. *= two way ANOVA for the effect of group (nephrotic or control), $p < 0.0001$

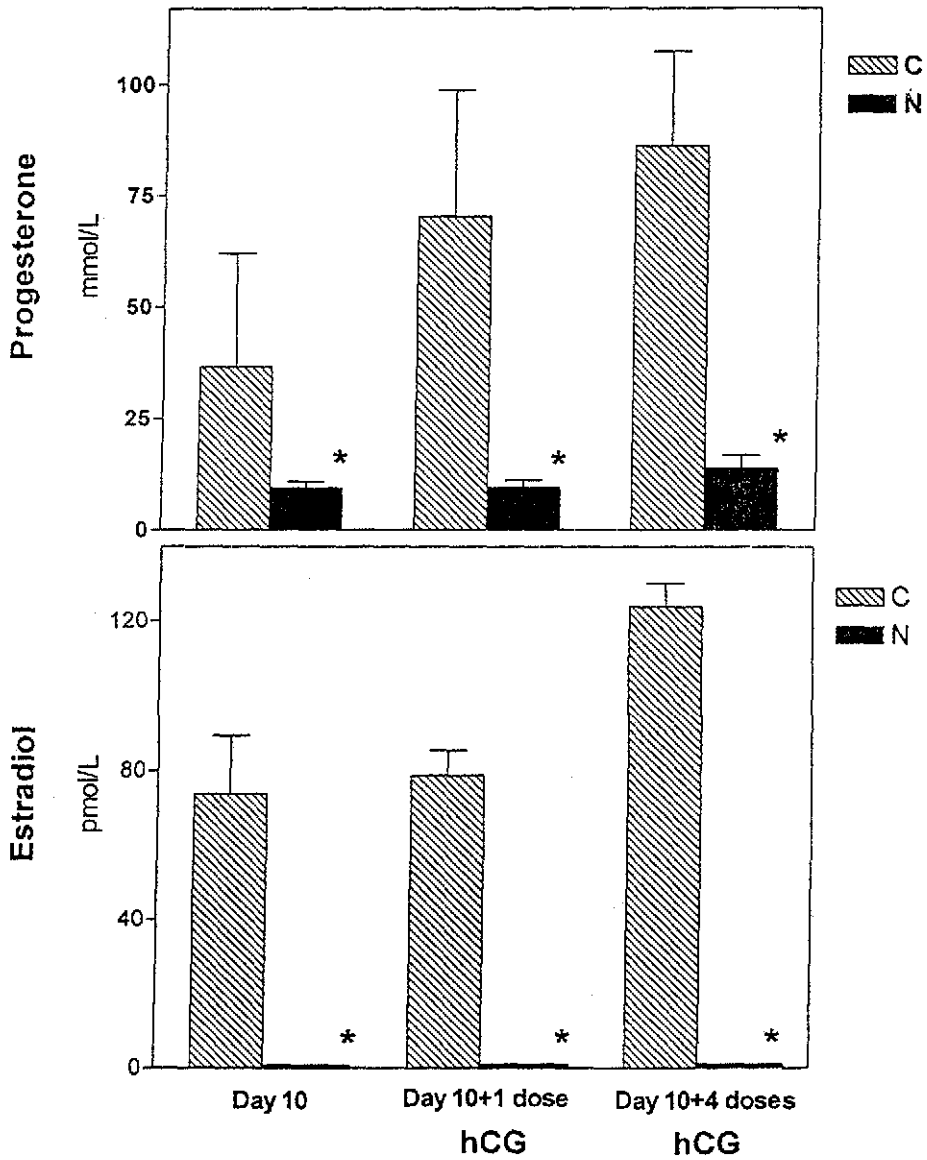
LH



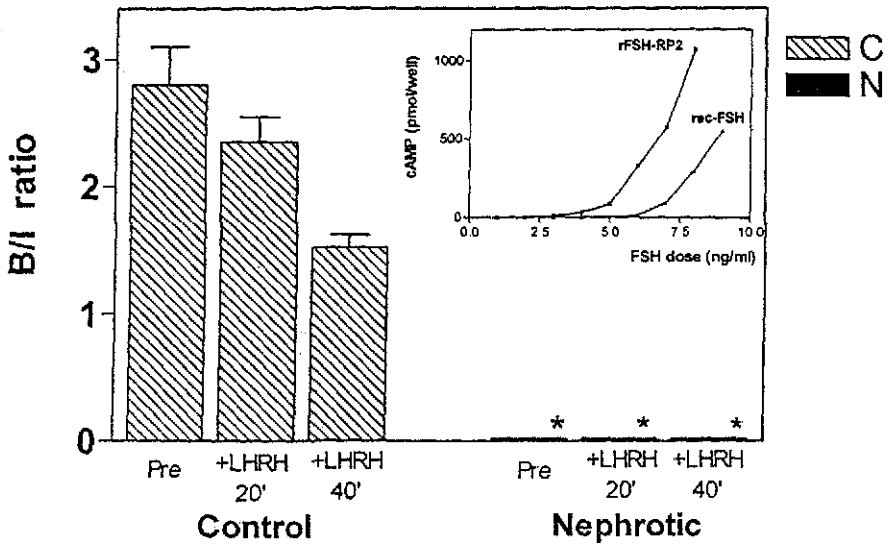
FSH



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ELSEVIER

Life Sciences

Published by Elsevier Science Inc
655 N. Alvernon Way, Suite 119
Tucson, Arizona 85711
Phone: (520) 321-7778
Fax: (520) 321-7781

Friday, December 07, 2001

Dr. M. Menjivar
Facultad de Quimica
Edif B, 2 piso
Lab. 209
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Ciudad Universitaria
04510 Mexico City
Mexico

RE: Manuscript #LS-0330-01

Dear Dr. Menjivar,

Your manuscript has been reviewed by the editors who are of the opinion that it is acceptable for publication in LIFE SCIENCES.

Before we can submit it to the publisher, it must be printed again to conform to the format requirements of the Journal. If you have questions about the format, please contact us.

Carefully proofread and edit the manuscript before returning it to us. We cannot make any changes to the manuscript after it has been sent to the publisher. Any corrections made after this time can only be made by an erratum in a future issue. We want to avoid errata if at all possible.

Enclosed are a Reprint Order form and a Transfer of Copyright Agreement. Sign and return these forms to us with the final manuscript. The Copyright Agreement is a requirement of the publisher. If you choose not to order reprints, please indicate this on the form and return it anyway.

Upon receipt of the retyped manuscript and the signed forms, we will schedule your article into the next available issue of the Journal and notify you of the publication date.

Sincerely yours,

Christine K. Wade
Managing Editor

CKW:st

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Post-it [®] Fax Note	7671	Date	12/7	# of pages	8
To	DR. MENJIVAR		From		
Co./Dept			Co		

22

Please select Print from the file menu to print your Abstract.

The Endocrine Society's 84th Annual Meeting

Filename: 851162

Contact Author Marta Menjivar, Ph.D.

Department/Institution: Facultad de Química, Edif.B, 2º piso., Universidad Nacional Autónoma de Méx

Address: Ciudad Universitaria

City/State/Zip/Country: Mexico, D F, 04510, Mexico

Phone: (52)55-22-35-15 Fax: (52)55-22-35-15 E-mail: menjivar@servidor.unam.mx

Abstract Format and Category:

Session Type : Regular Abstract Session

Presentation Type: Poster Presentation Only

Basic Science Category: 6 GnRH-Gonadotropins

Awards: No award information selected.

Title: Evaluation of the pituitary-ovarian unit in rats with acute nephrotic syndrome by dynamics tests.

Marta Menjivar ^{1*}, Mario Cardenas ², Laura Diaz-Bonilla ¹, Jose Pedraza-Chaverri ¹ and Guadalupe Ortiz-Lopez ³. ¹Department of Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, D F, Mexico, 04510; ²Department of Biology of Reproduction, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S.Z., D.F., Mexico, 14000 and ³Laboratory of Molecular Endocrinology, Hospital Juárez de México, D.F., Mexico, 07760

To investigate the pituitary-ovarian status during the acute state of nephrotic syndrome, a sequence of experiments were undertaken in adult female rats after a single dose of puromycin aminonucleoside (PAN). The functional condition of the hypophyseal-ovarian unit was determined in control and nephrotic rats by two dynamic tests. In the first one, 10 days after PAN or placebo administration female rats were stimulated with LHRH (300 ng/100 g b w) and samples were collected at 0, 20, 40, 60 and 80 minutes after releasing factor administration. The second dynamic test, which was performed in control and nephrotic rats, consist of one (on day 10 after PAN) or four (between days 7 to 10 after PAN) doses of hCG (8 UI), respectively. In both cases, serum samples were collected on day 10. The results revealed that after a stimulatory dose of LHRH the secretion of LH was significantly diminished in nephrotic rats at all registered times. By contrast, normal response was observed in terms of FSH secretion in nephrotic females. On the other hand, no ovarian response, in terms of progesterone or estradiol synthesis, was observed in nephrotic rats after either one or four stimuli with hCG. On the whole, the results from this study indicate that nephrotic syndrome had a harmful effect on the pituitary-ovarian unit, and strongly suggest that the endocrine dysfunction could be initiated at the hypophyseal level; even though a specific ovarian damage is also predictable.

Keyword 1: Pituitary

Keyword 2: Ovary

Keyword 3: Kidney

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN