



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA S_tAR
EN TESTICULO DURANTE EL SINDROME NEFROTICO
EXPERIMENTAL EN FASE AGUDA Y POSTERIOR A UNA
PRUEBA DINAMICA CON hCG.

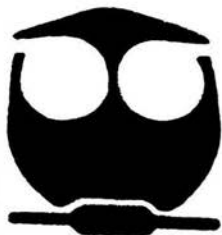
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente Prof. Omar Noel Medina Campos
Vocal Prof. Ma. De los Angeles Granados
Secretario Prof. Marta A. Menjivar Iraheta
1er. Suplente Prof. María Guadalupe Ortiz López
2º. Suplente Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 209 Bioquímica Clínica, Edificio B, 2º piso, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Laboratorio de Endocrinología Molecular, Hospital Juárez de México, México, D.F.

Departamento de Biología de la Reproducción Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

Asesor: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta



Supervisor Técnico: M. en C. Mario Cárdenas León



Sustentante: Luz del Carmen Camacho Castillo




Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Camacho Castillo

Luz del Carmen

FECHA: 23 de abril de 2004

FIRMA: 

A mis padres **Marciano y Carmen** por todo su amor y apoyo

A mis hermanas **Lorena y Liliana** por su ayuda y cariño

A **Miguel** por todo su cariño y paciencia

A **Dulce, Juan y Jaime** por su gran amistad

A todos mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, en particular al departamento de Biología de la Reproducción y al laboratorio de Bioquímica Clínica del departamento de Biología de la Facultad de Química, por las facilidades para la realización de esta tesis.

A la Dra. Marta Menjívar Iraheta por su enseñanza y guía para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado: M. en C. Omar Medina Campos, M. en C. Ma. De los Angeles Granados y la Dra. Guadalupe Ortiz López por sus sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

Al M. en C. Mario Cárdenas León por su asesoría técnica.

A la Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez por su asesoría en la cuantificación de proteínas oxidadas.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 TESTÍCULO	3
2.1.1 Espermatogénesis	3
2.2 EJE HIPOTÁLAMO–HIPÓFISIS–TESTÍCULO	5
2.3 SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES	7
2.3.1 P450 _{scc}	7
2.4 EJE HIPOTÁLAMO–HIPÓFISIS–ADRENAL	9
2.5 PROTEÍNA StAR	10
2.5.1 Regulación transcripcional del gen StAR	11
2.5.2 Mecanismo de acción	12
2.6 EL RIÑÓN	14
2.7 SÍNDROME NEFRÓTICO (SN)	17
2.7.1 Causas de SN	18
2.7.2 Enfermedad de cambios mínimos	18
2.7.3 Inducción experimental del SN	19
2.7.4 Síndrome Nefrótico y alteraciones endocrino-reproductivas	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
7. MATERIAL Y MÉTODOS	25
8. RESULTADOS	39
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	53
11. REFERENCIAS	54
12. APÉNDICE	59

1. RESUMEN

La síntesis de hormonas esteroideas en el testículo está regulada por el eje hipotálamo–hipófisis–testículo. El funcionamiento correcto de este eje permite secretar hormonas como progesterona, testosterona y estradiol, las cuales regulan la reproducción, además de otras funciones. La infertilidad puede presentarse en enfermedades renales como la insuficiencia renal crónica y el síndrome nefrótico. El síndrome nefrótico se caracteriza por diversas manifestaciones como proteinuria, hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia e hipercoagulabilidad, además se presentan alteraciones en la síntesis de hormonas esteroideas, dando como resultado bajos niveles de progesterona, testosterona y niveles indetectables de estradiol, lo cual señala una falla en la ruta esteroideogénica. Las hormonas esteroideas tienen como precursor al colesterol, el cual es un compuesto hidrofóbico, por lo que no puede atravesar el espacio acuoso intermembranal de la mitocondria. A este respecto se ha reportado que el paso limitante en la esteroideogénesis es el transporte del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, función que realiza la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory). De esta manera, con el fin de investigar si la falla en la esteroideogénesis durante el síndrome nefrótico se encuentra en el paso limitante de la misma, en el presente trabajo se evaluó la expresión del ARNm de la proteína StAR en el testículo de rata nefrótica en fase aguda y posterior al estímulo con hCG. El síndrome nefrótico se indujo mediante una inyección de aminonucleósido de puomicina a una dosis de 15 mg/100 g de peso. En el día 10 se colectaron muestras de sangre, tejido y orina, cuantificándose proteínas y colesterol en suero y proteínas en orina. Las hormonas progesterona, testosterona y estradiol se midieron mediante radio inmunoanálisis. La expresión del ARNm de la proteína StAR se evaluó por Northern Blot en los tejidos esteroideogénicos testículo y glándula adrenal. Las hormonas esteroideas evaluadas se encontraron por debajo de los niveles normales durante el síndrome nefrótico. Después de la administración de hCG (hormona gonadotropina coriónica) la respuesta hormonal de las ratas nefróticas fue similar a la de los controles, excepto en el estradiol, que permaneció indetectable. En cuanto a la expresión del ARNm de la proteína StAR en testículo, se observó que al día 10 se pierde totalmente, todos los grupos de animales estimulados con hCG presentaron un incremento en la expresión del

ARNm de la proteína StAR, particularmente el grupo que recibió 1 dosis de hCG. En conjunto estos resultados demuestran claramente la existencia de una falla en la esteroidogénesis testicular, específicamente en la expresión del ARNm de la proteína StAR durante la etapa aguda del síndrome nefrótico. Adicionalmente nos permiten conocer más sobre las alteraciones endocrinas asociadas al síndrome nefrótico, lo cual puede contribuir al planteamiento de nuevas alternativas en el manejo terapéutico del paciente nefrótico.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 TESTÍCULO

En el hombre los testículos están alojados en la cavidad escrotal (Figura 1A), están compuestos por hasta 900 túbulos seminíferos, estos túbulos a su vez están formados por diversos tipos celulares: células de Leydig, células epiteliales y células de Sertoli (Figura 1B). Los testículos se encargan de la producción de hormonas esteroideas y de la espermatogénesis. Las hormonas hipofisiarias regulan dichas funciones, por medio de un eje hormonal (1) (Figura 2).

2.1.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis se lleva a cabo en todos los túbulos seminíferos durante la etapa fértil. Los espermatozoides producidos en dichos túbulos viajan hacia el epidídimo, el cual desemboca en el conducto deferente, que se ensancha para formar la ampolla del conducto deferente inmediatamente antes de que el conducto penetre en el cuerpo de la glándula prostática. El contenido de la ampolla prostática junto con el de la vesícula seminal pasa al conducto eyaculador que desemboca en la uretra interna. Finalmente, la uretra es el último eslabón de la comunicación del testículo con el exterior (2) (Figura 1A).

Los túbulos seminíferos contienen gran cantidad de células germinales llamadas espermatogonias, las cuales proliferan continuamente para reponer su número y una porción de ellas se diferencia siguiendo etapas definidas de desarrollo para formar espermatozoides. En la primera etapa de la espermatogénesis las espermatogonias primordiales denominadas espermatogonias tipo A se dividen cuatro veces para formar 16 células llamadas espermatogonias tipo B, estas células migran hacia el centro entre las células de Sertoli. Las células de Sertoli poseen extensas cubiertas de citoplasma que se extienden desde las capas de las espermatogonias hasta la luz central del túbulo. Después de un periodo que dura en promedio 24 días, cada espermatogonia que penetra entre las células de Sertoli se modifica y aumenta de tamaño para formar un

espermatozoides, dividiéndose para formar dos espermatozoides secundarios. Esta división se denomina primera división meiótica, ya que cada espermatozoides recibe 23 cromosomas de los 46 que tenía originalmente el espermatozoides primario. Después de 2 ó 3 días tiene lugar la segunda división meiótica que da lugar a las espermátides, durante las siguientes semanas cada espermátide cambia su forma física por acción de la célula de Sertoli que la rodea, convirtiéndose en un espermatozoides, cada espermatozoides aporta sólo la mitad de los genes al huevo fecundado y el óvulo la otra mitad. Todo el proceso de la espermatogénesis dura aproximadamente 64 días (1).

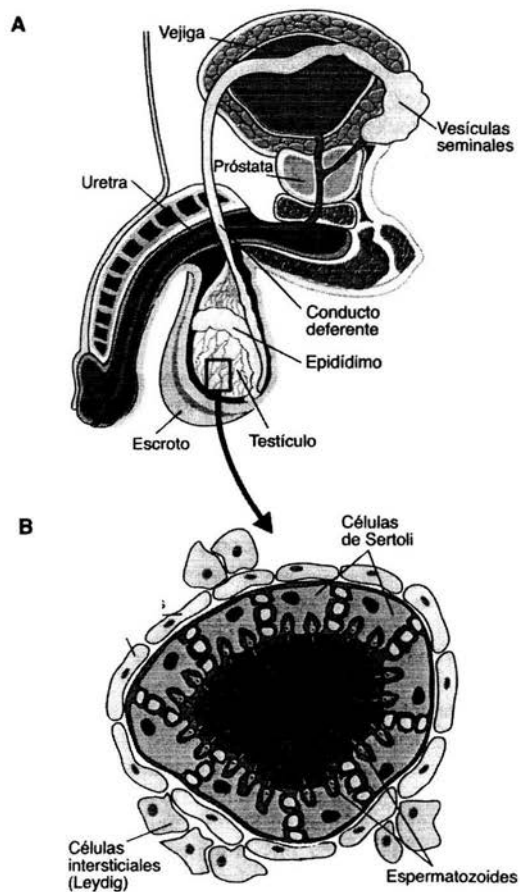


Figura 1. A. esquema del aparato reproductor masculino. B. Corte transversal del túbulo seminífero.

2.2 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULO

El funcionamiento del eje hipotálamo–hipófisis–testículo inicia con la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por el hipotálamo, la GnRH es conducida hasta la hipófisis a través de los vasos portales hipotalámico-hipofisarios. En la hipófisis regula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) (Figura 2). Estas hormonas son glucoproteínas que poseen una subunidad α idéntica y una subunidad β que les confiere especificidad biológica (1).

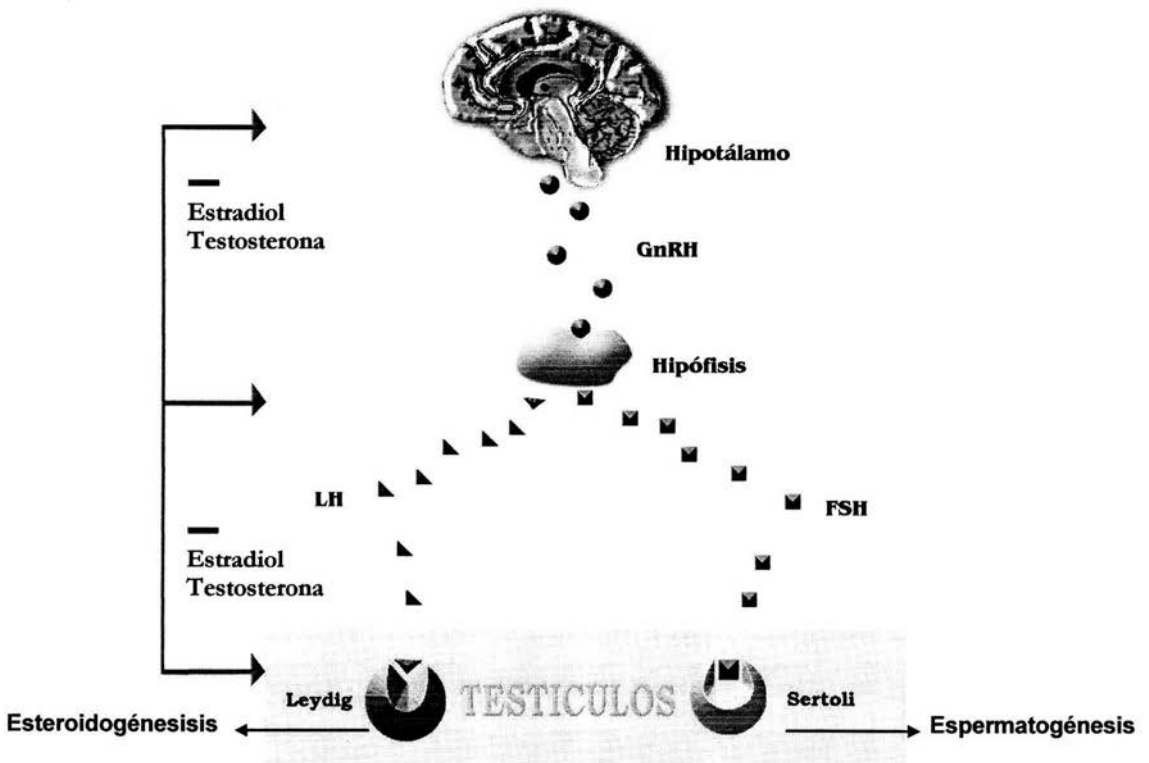


Figura 2. Eje Hipotálamo–Hipófisis–Testículo

Desde el punto de vista fisiológico la hipófisis se puede dividir en dos, la hipófisis anterior o adenohipófisis y la hipófisis posterior o neurohipófisis. La primera secreta hormonas que regulan funciones metabólicas en todo el organismo, entre las que se encuentran las hormonas gonadotrópicas: la FSH y la LH que controlan el crecimiento gonadal, la actividad hormonal y reproductora (2).

La LH llega a las células de Leydig y se une a receptores de membrana acoplados a proteína G, activando a la adenilato ciclasa y como consecuencia generando AMPc, el cual al unirse a la proteína cinasa A provoca la disociación de las subunidades reguladoras y la activación de las subunidades catalíticas. Finalmente, mediante diversos pasos se desencadena la síntesis de hormonas esteroideas sexuales (3) (figura 3). La secreción de LH y FSH es inhibida por retroalimentación negativa, ya que la elevación de los esteroideas sexuales tiene un efecto inhibitor en la hipófisis y el hipotálamo. Por otra parte, la FSH se une a su receptor específico en las células de Sertoli regulando la maduración de los tubos seminíferos y de las células de Leydig, las cuales se encargan de la espermatogénesis y la aromatización de la testosterona para producir estradiol (4,5).

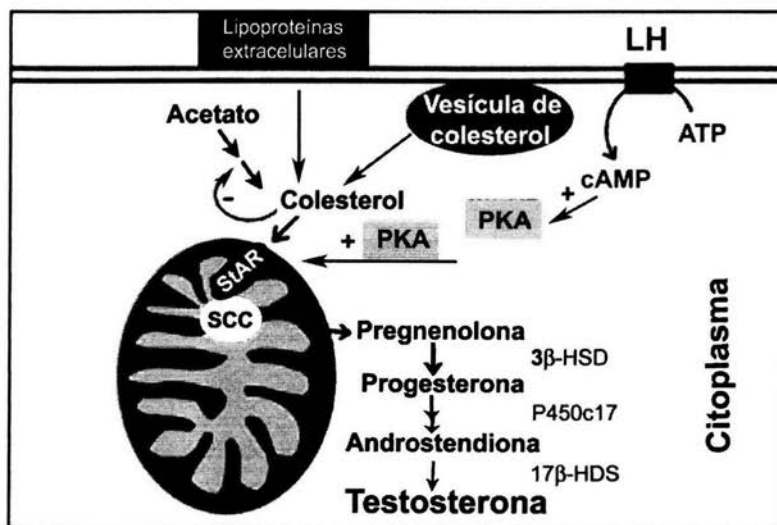


Figura 3. Acción de la LH en las células de Leydig. PKA: Proteína cinasa A; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450c17: P450 17α-hidroxilasa; 17β-HDS: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

2.3 SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

Existen en general 5 grupos de hormonas esteroides: a) mineralocorticoides, los cuales regulan la retención renal de sodio, b) glucocorticoides, implicados en el metabolismo de carbohidratos, c) estrógenos, responsables de las características sexuales secundarias femeninas, d) progestagenos, esenciales para la reproducción y d) andrógenos, que inducen las características sexuales secundarias masculinas (6).

Los tejidos esteroideogénicos pueden sintetizar colesterol *de novo* desde acetato, pero generalmente las células de estos órganos toman la mayor parte del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (7)

Los principales esteroides sexuales son: progesterona, testosterona y estradiol, la fuente más importante de estas hormonas son las gónadas. El paso inicial de la esteroideogénesis es la ruptura de la cadena lateral del colesterol para dar como resultado pregnenolona, esta reacción es catalizada por la enzima P450scc.

2.3.1 P450scc

Esta enzima se encuentra en la membrana interna mitocondrial de todas las células esteroideogénicas y es producto del gen CYP11A1. Su función es la conversión de colesterol a pregnenolona e involucra tres reacciones químicas distintas, la 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y el corte de la cadena lateral del colesterol en la unión entre los carbonos 20 y 22 dando pregnenolona y ácido isocaproico (8) (Figura 4).

Una vez producida la pregnenolona sale de la mitocondria y puede seguir una de dos vías denominadas $\Delta 5$ y $\Delta 4$. La pregnenolona y otros esteroides se denominan $\Delta 5$ porque poseen un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, mientras que la progesterona, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los andrógenos se denominan $\Delta 4$ porque tienen un doble enlace entre los carbonos 4 y 5. De esta manera la pregnenolona puede sufrir una 17 α -hidroxilación catalizada por la enzima P450c17 dando como resultado la 17 α -OH-pregnenolona o ser transformada en progesterona, por la enzima 3 β -

hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) que se encarga de convertir la pregnenolona en progesterona catalizando la isomerización del doble enlace del anillo B al anillo A y la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenación (6).

La progesterona es transformada a androstendiona por acción de la 17α -hidroxilasa (P450c17). La androstendiona pasa a testosterona por acción de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa mediante una reacción reversible. La testosterona puede ser convertida a estradiol por medio de la enzima P450 aromataasa (3).

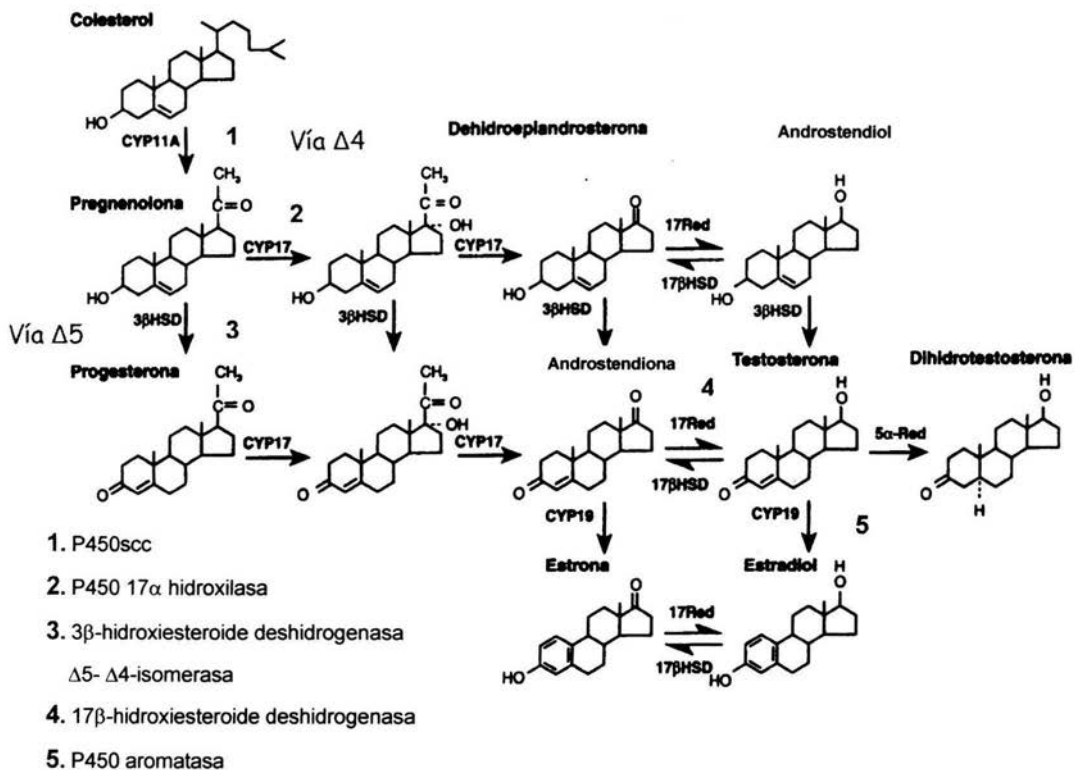


Figura 4. Síntesis de esteroides sexuales.

2.4 EJE HIPÓTALAMO-HIPÓFISIS- ADRENAL

El hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual llega a la hipófisis anterior y estimula la producción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Esta hormona llega a la glándula adrenal y regula la secreción de glucocorticoides y esteroides androgénicos (1) (Figura 5).

Las glándulas adrenales se encuentran por encima y detrás de los polos superiores de los riñones. Histológicamente se componen de tres zonas: una glomerulosa externa, en la cual se produce principalmente aldosterona, una fasciculada y una reticular, ambas productoras de cortisol y andrógenos (5).

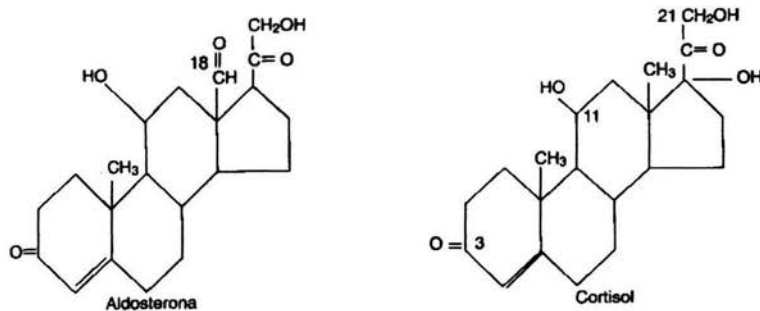


Figura 5. Estructura de la aldosterona y cortisol.

2.5 PROTEÍNA StAR (Steroidogenic Acute Regulatory)

El precursor de las hormonas esteroideas es el colesterol, un compuesto hidrofóbico que no puede atravesar el espacio acuoso intermembranal de la mitocondria. Recientemente se ha encontrado que el verdadero paso limitante en la esteroidogénesis es el transporte del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, en donde está localizada la enzima P450_{scc} (7). Esta función es realizada por la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory), esta proteína es sintetizada como un precursor de 37 KDa que es fosforilado por la proteína cinasa A y posteriormente seccionado para generar la forma activa de 30 KDa (9, 10).

Existen otras proteínas que se encargan de la transferencia de lípidos en diversas células, entre ellas se encuentra la proteína MNL64, que posee una secuencia homóloga a la proteína StAR, esta secuencia fue nombrada dominio START. Este dominio consiste de aproximadamente 200-210 aminoácidos y su importancia radica en que es capaz de unirse a los lípidos (11). Debido a la dificultad de purificar y cristalizar el dominio START de la proteína StAR se ha estudiado el dominio START de la proteína MNL64 ya que ha sido demostrado *in vitro* que el colesterol se une a ambas proteínas manera idéntica. La estructura cristalina de MNL64-START muestra que contiene nueve láminas β antiparalelas, cuatro α -hélices y dos asas Ω que forman un barril β incompleto (figura 6). La estructura terciaria revela que se trata de un túnel hidrofóbico que posee el tamaño suficiente para unirse a una molécula de colesterol (11,12).

La proteína StAR se localiza en corteza adrenal, ovarios, testículos y cerebro. Los activadores son LH, hCG, ACTH, FSH, angiotensina II, análogos de AMPc, agentes inductores de AMPc intracelular y estradiol. En general los agentes que incrementan la síntesis de esteroideas también aumentan la expresión de la proteína StAR (13, 14).

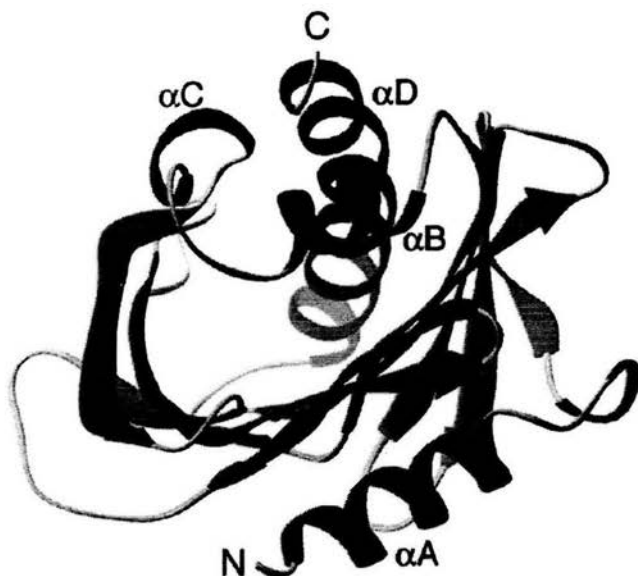


Figura 6. Dominio START, posee 4 α -hélices (A-D) y 9 láminas β antiparalelas.

2.5.1 Regulación transcripcional del gen StAR

Un factor de transcripción importante en la regulación del gen StAR es SF-1 (Steroidogenic factor-1), se ha encontrado que ratones SF-1 Knockout no expresan el ARNm de la proteína StAR, indicando que SF-1 se requiere para la expresión del gen (15). La transcripción del gen StAR también puede ser reprimida por un miembro de la superfamilia de receptores nucleares DAX-1, el cual se encuentra unido a una estructura de horquilla en el promotor del gen StAR cercano al sitio de unión de SF-1, esto sugiere que DAX-1 actúa evitando la unión de SF-1 y por lo tanto inhibiendo la transcripción de la proteína StAR (16).

2.5.2 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la proteína StAR aún no se conoce con exactitud pero se han propuesto diversos modelos. El primer modelo indica que la proteína StAR es sintetizada en el citosol y posteriormente se dirige hacia la mitocondria, gracias a la secuencia de señalización que posee en el extremo N-terminal, funcionando como un puente hidrofóbico entre la membrana mitocondrial externa e interna (17). Este mecanismo ha sido muy discutido ya que ha sido probado que la proteína StAR producida en bacterias y carente de los primeros 62 aminoácidos de la región N-terminal, al ser adicionada a mitocondrias aisladas realiza su función transportando colesterol de manera equivalente a la proteína que sí posee dicha secuencia, a pesar de que en esta región se localiza la secuencia de señalización mitocondrial. Esto indica que no es necesario que la proteína StAR se introduzca en la mitocondria para que ejerza su función y por lo tanto actúe en la membrana mitocondrial externa (18). De esta manera se propuso un mecanismo alternativo el cual indica que la proteína StAR, utilizando la secuencia C-terminal, produce alteraciones en la membrana mitocondrial externa, funcionando como una proteína lanzadera de colesterol (19).

Después de determinar las características de la proteína StAR bajo diferentes condiciones fisicoquímicas, se demostró que la proteína a pH de 3.5–4 sufre cambios conformacionales de manera que la proteína pasa a un estado desplegado (20), pierde parcialmente su estructura terciaria, pero retiene su estructura secundaria íntegra. En base a esta información y suponiendo que el pH del medio que rodea a la mitocondria es ácido debido a la expulsión de protones de la matriz mitocondrial, se ha propuesto otro mecanismo, el cual indica que el cambio conformacional sufrido por la proteína StAR por el pH ácido alrededor de la mitocondria, provoca que la proteína se “abra” exponiendo la región hidrofóbica (el dominio StAR-START), y de esta manera se forme un túnel hidrofóbico lo suficientemente grande para que una molécula de colesterol se una y atraviese el espacio intermembranal (12) (Figura 7).

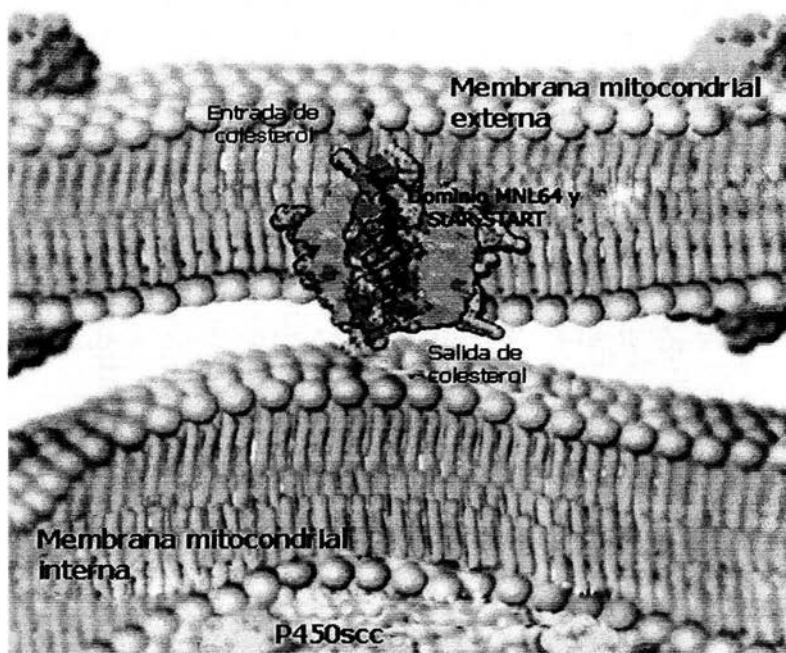


Figura7. Posible mecanismo de acción de la proteína StAR.

2.6 EL RIÑÓN

Los riñones se encuentran ubicados en la pared posterior del abdomen. La cara interna tiene una región llamada hilio, por la cual pasan la arteria y la vena renales, los vasos linfáticos, los nervios y los uréteres, que llevan la orina hacia la vejiga (Figura 8) (2).

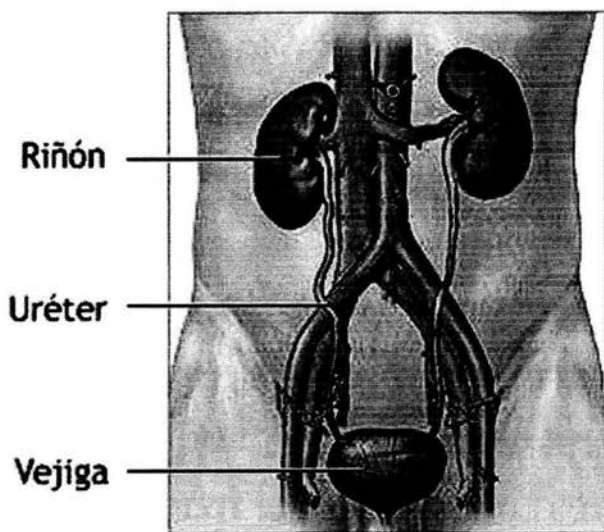


Figura 8. Ubicación de los riñones

En el riñón se pueden distinguir dos regiones, una externa la corteza y otra interna, la médula (Figura 9 A). La unidad funcional del riñón es la nefrona, el ser humano posee aproximadamente 1 millón de nefronas en cada riñón. Cada nefrona consta de dos partes principales: El glomérulo, a través del que se filtra la sangre, y un túbulo donde el líquido filtrado se convierte en orina. El túbulo renal se divide en: túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulo colector (Figura 9 B).

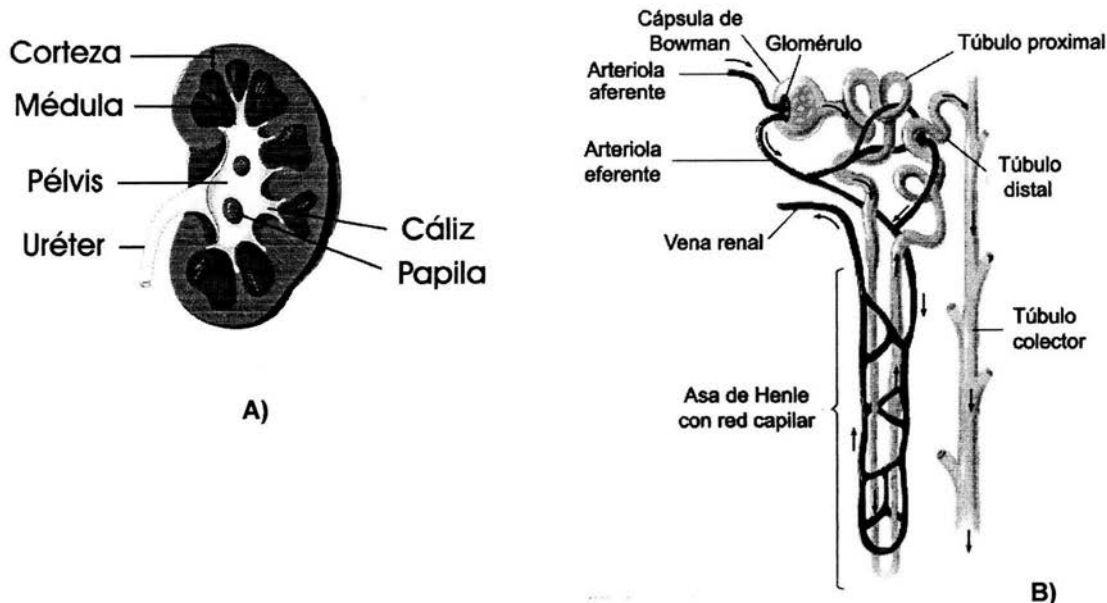


Figura 9. **A)** Corte longitudinal del riñón. **B)** Diagrama de la nefrona.

El glomérulo está formado por una red de capilares, revestidos por la cápsula de Bowman. Las células del epitelio glomerular se llaman podocitos, poseen una forma estrellada y presentan prolongaciones primarias radiales que rodean a los capilares subyacentes y dan lugar a ramificaciones secundarias denominadas prolongaciones podocitarias. Estas prolongaciones están separadas entre sí por las ranuras de filtración (Figura 10) (21).

La membrana basal glomerular está situada entre el epitelio y el endotelio, tiene un espesor de 0.1 a 0.15 μm y posee tres capas, una adyacente a los podocitos, lámina rara externa (LRE), una central denominada lámina rara densa (LRD) y la lámina rara interna (LRI) adyacente al endotelio (Figura 10) (22). Entre los componentes que la forman está la fibronectina, la cual fija a las células endoteliales y epiteliales a la lámina densa (23). La lámina densa está formada por colágeno tipo IV y laminina que forman una red en la cual

se unen moléculas de proteoglicanos heparán sulfato proporcionando una carga negativa (24).

En condiciones normales la filtración de proteínas aniónicas de bajo peso molecular a través de la membrana basal glomerular y los podocitos es prevenida por la barrera de filtración glomerular, la cual es selectiva a la carga, tamaño y estructura de las moléculas (25).

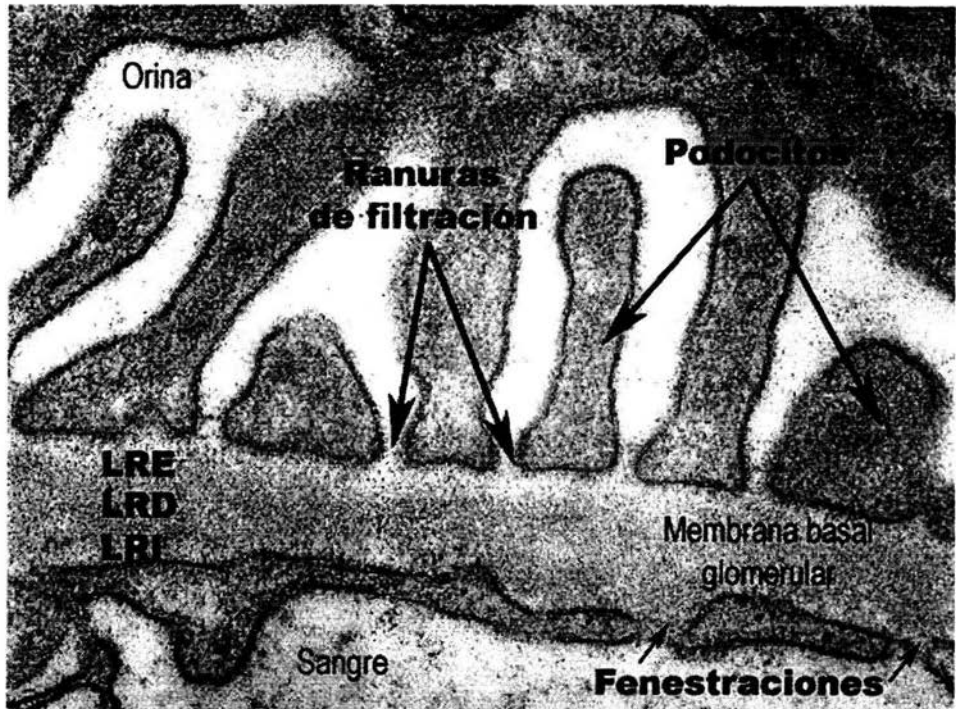


Figura 10. Barrera de filtración glomerular. LRE lámina rara externa, LRD lámina rara densa y LRI lámina rara interna.

2.7 SÍNDROME NEFRÓTICO

El síndrome nefrótico es un complejo clínico caracterizado por diversas manifestaciones renales y extrarrenales como proteinuria, hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia e hipercoagulabilidad (26).

Debido al aumento de la permeabilidad glomerular se presenta proteinuria masiva (>3.5 g / 24 horas) y en consecuencia hipoalbuminemia. La hipoalbuminemia provoca una disminución de la presión oncótica intravascular y el líquido extracelular sale de la sangre al intersticio produciendo edema. La hiperlipidemia es consecuencia del aumento en la síntesis de lipoproteínas por el hígado, como consecuencia de la disminución en la presión oncótica. La mayoría de los enfermos presentan niveles altos de colesterol y lipoproteínas de baja densidad. La hipercoagulabilidad se debe a la pérdida de antitrombina III en la orina, niveles alterados de proteína C y S, hiperfibrinogenemia por aumento de la síntesis hepática de fibrinógeno, la fibrinólisis anómala y aumento de la capacidad de agregación plaquetaria. Otros trastornos ocasionados por la pérdida urinaria de proteínas son la malnutrición proteica, anemia microcítica hipocrómica secundaria a la pérdida de transferrina, mayor susceptibilidad a infecciones por niveles reducidos de IgG. También se presenta hipocalcemia e hiperparatiroidismo por deficiencia de vitamina D, debido a la excreción urinaria aumentada de la proteína fijadora del colecalciferol (27).

2.7.1 Causas de SN

El SN puede dividirse en:

Primario	Secundario
Derivado de enfermedades glomerulares primarias como: - Enfermedad de cambios mínimos. - Glomerulonefritis membranoproliferativa. - Glomerulopatía membranosa.	Provocado por enfermedades infecciosas: - Bacterias: sífilis, lepra, glomerulonefritis postestreptocócica, tuberculosis. - Virus: hepatitis B o C, citomegalovirus, Epstein-Bar, VIH. - Protozoarios: malaria, toxoplasmosis.
	Enfermedades metabólicas: - Diabetes Mellitus.
	Enfermedades heredofamiliares: - Síndrome nefrótico congénito, síndrome de Alport.
	Fármacos, toxinas y alérgenos: - Mercurio, heroína, pólenes, venenos, vacunas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tolbutamida, entre otros.

Tomado de (28).

2.7.2 Enfermedad de cambios mínimos

Esta glomerulopatía se presenta en un 80% de los casos de SN en niños menores de 16 años y en un 20% en adultos. Recibe el nombre de enfermedad de cambios mínimos porque el tamaño y arquitectura de los glomérulos parecen normales al ser observados en el microscopio óptico. Con el microscopio electrónico se observa la fusión de los

podocitos (Figura 11). La etiología de la enfermedad se desconoce y la mayoría de los casos son idiopáticos (26).

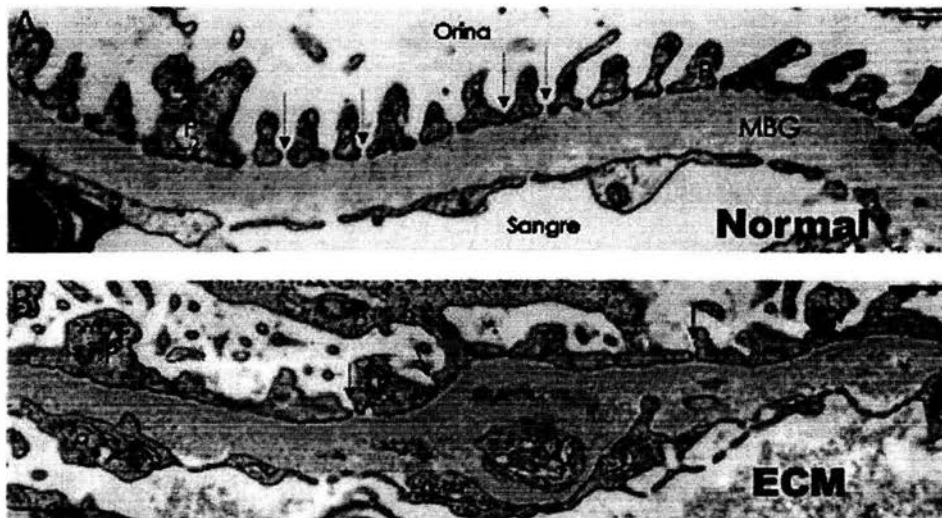


Figura 11. Micrografía electrónica de la barrera de filtración glomerular. A. En condiciones normales. B. Con enfermedad de cambios mínimos, se observa la fusión de los podocitos (P).

2.7.3 Inducción experimental del SN

El síndrome nefrótico puede inducirse experimentalmente, inyectando aminonucleósido de puomicina (ANP) 6-dimetilamino-9-(3'-amino-3'-desoxi- β -D-ribofurasonil)purina (Figura12), es un derivado de la puomicina (29). La administración de ANP a ratas produce proteinuria severa y cambios glomerulares ultraestructurales semejantes a la enfermedad de cambios mínimos en el humano (30).

Posterior a la inyección de ANP los cambio ultraestructurales observados son la fusión de los podocitos, lo cual se ha asociado a la reducción de la carga aniónica. Además otro estudio muestra que el ANP daña directamente el citoesqueleto de los podocitos (31).

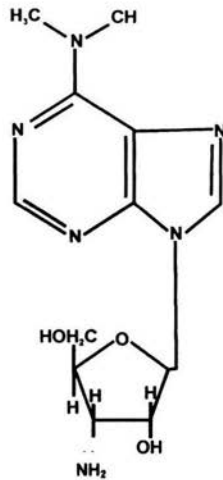


Figura 12. Estructura del ANP.

No se conoce el mecanismo exacto por el cual el ANP produce el daño, pero ha sido detectada una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 , OH^\cdot , O_2^- , durante las enfermedades glomerulares severas, incluyendo la nefrosis inducida por ANP (30). Estos hallazgos sugieren que parte del daño causado por el ANP es producido por estas especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente, otros estudios demuestran que los antioxidantes protegen del daño causado por el ANP, reduciendo la proteinuria y evitando la fusión de los podocitos, pero no impiden el daño que ocurre en los cuerpos celulares de los podocitos (32, 33).

2.7.4 Síndrome Nefrótico y alteraciones endocrino–reproductivas

La insuficiencia renal crónica y el síndrome nefrótico, han sido asociados con infertilidad y disfunción endocrina (34,35), lo cual indica que existe una estrecha relación entre el adecuado funcionamiento renal y la regulación de la función reproductiva, por esto resulta interesante el estudio las alteraciones endocrinas durante el SN.

En el modelo experimental de SN agudo inducido por ANP ha sido reportado que las ratas macho desarrollan hipogonadismo–hipogonadotrópico, condición que en dicho trabajo fue evidenciada por las bajas concentraciones de gonadotropinas (LH y FSH) y hormonas esteroides sexuales (35). Estos cambios hormonales tuvieron como efecto un deterioro en la función reproductiva de los animales nefróticos, ya que también se evaluó la capacidad reproductiva de los animales en base a la fertilidad, los machos nefróticos se mantuvieron en cajas individuales con dos hembras normales por un periodo de cuatro días, se encontró que solamente el 37% fueron fértiles durante la fase aguda de la enfermedad. Por otro lado se observó una remisión espontánea de este estado al día 30 (35).

En estudios posteriores se reportó que al recibir un estímulo con GnRH la secreción de LH y FSH aumentó sin alcanzar los niveles normales, lo que indica una pérdida parcial de la respuesta hipofisiaria al estímulo de GnRH, asimismo, se demostró mediante experimentos *in vitro* que la FSH de las ratas nefróticas no poseía actividad biológica (36). Adicionalmente se comprobó que la cantidad de receptores de andrógenos en próstata, vesículas seminales e hipófisis aumentó en los animales nefróticos.

En un estudio realizado utilizando como modelo experimental el SN crónico inducido con ANP, se evaluó la función reproductiva en base a la concentración de hormonas gonadotrópicas y esteroides sexuales, peso de los órganos sexuales accesorios y la fertilidad por un periodo de 84 días. Los resultados mostraron que la concentración de LH y FSH es menor en los animales nefróticos, al igual que la testosterona, lo que indica un mal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, además de una falla en la

secreción de GnRH. La fertilidad disminuye en el día 7 y 14 siendo de 0% y 16% respectivamente, después del día 14 las ratas nefróticas recuperan su capacidad reproductiva. Los órganos sexuales presentaron una reducción de tamaño del 50-55% al día 7 y 14, pero posteriormente alcanzaron el tamaño normal (37). Estos resultados son muy semejantes a los encontrados durante el SN agudo experimental.

3. JUSTIFICACIÓN

El síndrome nefrótico ha sido asociado con alteraciones en la esteroidogénesis gonadal. En ratas macho existe una disminución de los niveles circulantes de progesterona, testosterona y estradiol, condición relacionada con alteraciones en la expresión de la enzima P450_{scc}, la cual es nula tanto durante la fase aguda del SN como posterior a la administración de hCG a ratas nefróticas. Sin embargo, dado que después de la prueba dinámica con hCG se presenta un incremento en la concentración de progesterona y testosterona, es posible que otro elemento esté involucrado en la activación de la esteroidogénesis. Por tal motivo la expresión del ARNm de la proteína StAR, la cual se considera actualmente como el verdadero paso limitante de la esteroidogénesis, debe ser evaluada en testículos de animales nefróticos.

4. HIPÓTESIS

En el síndrome nefrótico agudo la expresión del ARNm de la proteína StAR, considerada actualmente como el verdadero paso limitante de la esteroidogénesis gonadal, se encuentra disminuida.

5. OBJETIVO

Evaluar la expresión del ARNm de la proteína StAR testicular durante el síndrome nefrótico experimental en la fase aguda y posterior a una prueba dinámica con hCG.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la expresión del ARNm de la proteína StAR en testículo y glándula adrenal, durante el síndrome nefrótico agudo experimental.
- Evaluar la expresión del ARNm de la proteína StAR en las condiciones mencionadas posteriores a la administración de 1 y 4 dosis de hCG.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos:

Aminonucleósido de puomicina (ANP), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). Gonadotropina coriónica humana (hCG) 5000 U/mL (gonadotropy-c, Hoechst Marion Roussel, México). Trizol™ LS Reagent (GIBCO BRL. Manufacturado para LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, N.Y.). Se utilizó una solución de hibridación Quikhyb Stratagene (La Jolla, CA, USA) y la membrana de nylon Z-probe (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Todos lo demás reactivos químicos utilizados fueron grado reactivo y están comercialmente disponibles.

Animales:

Ratas Wistar macho adultas de 2 meses de edad, de 220 a 250 g de peso al inicio del experimento. Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de 14:10 h luz:oscuridad y alimentados *ad libitum*.

Diseño experimental:

Se utilizaron 6 grupos de animales:

Grupo 1 Control	Grupo 2 Control + 1 dosis hCG (C+1hCG)	Grupo 3 Control + 4 dosis hCG (C+4hCG)
Grupo 4 Nefrótica	Grupo 5 Nefrótica + 1 dosis hCG (N+1hCG)	Grupo 6 Nefrótica + 4 dosis de hCG (N+4hCG)

El síndrome nefrótico fue inducido por una sola inyección subcutánea de solución ANP al 2%, a una dosis de 15 mg por cada 100 g de peso. Las ratas control recibieron una inyección de solución salina. Las ratas control y nefróticas fueron estimuladas con 1 y 4 dosis de hCG (8 U.I.). La dosis única de hCG se administró al día 10, 4 horas antes del sacrificio, las 4 dosis se administraron del día 7 al día 10. Al día 9 todas las ratas fueron colocadas en cajas metabólicas por 24 horas para coleccionar muestras de orina. Al día 10 las ratas fueron decapitadas y se coleccionaron muestras de sangre, testículo, glándula adrenal, riñón e hígado. Se cuantificaron las concentraciones de proteínas y colesterol en suero, proteínas en orina, proteínas oxidadas en testículo y riñón, las hormonas progesterona, testosterona, estradiol y corticosterona en suero. El análisis de la expresión del ARNm de la proteína StAR en testículo, adrenal e hígado se realizó por la técnica de Northern Blot.

Determinaciones bioquímicas

- Colesterol sérico

Para determinar el colesterol se utilizó el estuche CHOD – PAP Spinreact de la marca SPINREACT (Girona, España), el fundamento es el siguiente:

La enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma H_2O_2 y colesterolona. El H_2O_2 se valora por la reacción de Trinder mediante un cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa formando quinonimina cuya coloración es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra. La técnica empleada fue la siguiente:

	Blanco	Estándar (200 mg/dL)	Muestra
Estándar	—	10 μ L	—
Muestra	—	—	10 μ L
Reactivo al uso	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Se mezcló e incubó 10 min a temperatura ambiente.

El espectrofotómetro se ajustó a 0 con el blanco de reactivos.

La D.O. del estándar y de la muestra se leyó a 505 nm.

- **Proteínas totales en suero**

Fueron medidas por el método de Lowry (38), el cual se basa en la reactividad del nitrógeno de los aminoácidos con los iones Cu^{2+} en condiciones alcalinas y en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) a heteropolimolibdeno por la oxidación catalizada por el cobre de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptofano (39). El reactivo Folin reducido es de color azul y detectable en un espectrofotómetro en el rango de 500 a 750 nm.

Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina al (ABS) 0.05%, de acuerdo a la siguiente tabla:

ASB (μ g/0.2mL)	ASB 0.05% (μ L)	H ₂ O (μ L)
Blanco	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

Se realizó una dilución 1:300 de las muestras de suero.

Se colocaron 200 μ L de la dilución en un tubo.

A todos los tubos se les agregó 1 mL de CuSO_4 al 0.5% Solución C (Apéndice). Se agitaron y se esperó 10 min.

A todos los tubos se les agregó 100 μ L de solución Folin Solución D (Apéndice), se agitó y se dejó transcurrir 30 min.

La D.O se leyó a 660 nm contra la curva estándar.

- Proteínas en orina (método turbidimétrico).

Las proteínas presentes en las muestras se precipitan con ácido tricloroacético. La cantidad de proteínas es directamente proporcional a la turbidez producida (40, 41).

Se centrifugó la orina recolectada de la jaula metabólica a 2500 rpm/10 min a temperatura ambiente.

Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina 0.1% de acuerdo a la siguiente tabla:

ASB (mg/mL)	ASB 0.1% (μL)	H₂O (μL)
Blanco	0	1000
0.04	40	960
0.1	100	900
0.2	200	800
0.4	400	600
0.6	600	400
0.8	800	200

La orina de las ratas control se diluyó con agua 1:6 y la de las ratas nefróticas 1:80.

En tubos de vidrio de 12X75 mm se colocó 1 mL de cada muestra.

Se adicionó 0.25 mL de ácido tricloroacético al 12.5% a una de las réplicas (y a todos los tubos de la curva estándar, incluido el blanco).

Se agregaron 0.25 mL de H₂O a la otra réplica (blanco de cada muestra).

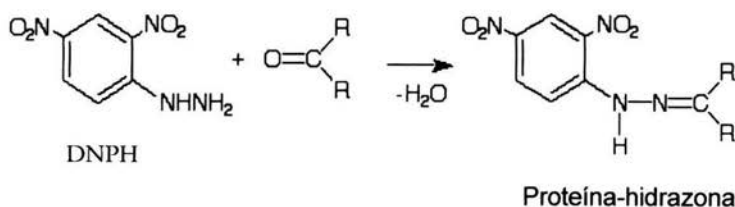
La D.O. se leyó a 420 nm contra la curva estándar.

- Proteínas Oxidadas

Como se mencionó anteriormente, no se conoce el mecanismo exacto por el cual el ANP produce el daño, pero ha sido detectada una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno como H₂O₂, OH[•], O₂⁻, durante la nefrosis inducida por ANP (42). Para determinar si la producción de estas especies es específica del riñón y no se ven afectados los testículos se midieron las proteínas oxidadas en ratas que recibieron una inyección de ANP. Las ratas se sacrificaron 1 hora después de la administración de ANP y se colectaron riñones y testículos.

Las especies reactivas de oxígeno tienen una vida muy corta y son difíciles de detectar por un método directo. Una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidativo es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas, ejemplo de ello son los grupos carbonilo (C=O) que se originan por la acción de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas convirtiendo algunos aminoácidos a derivados carbonilo (43). Debido a que los derivados carbonilo son formados por diferentes procesos, se han desarrollado algunos métodos sencillos y altamente específicos para medir los carbonilos en las proteínas.

Este método da evidencia indirecta de la actividad de las especies reactivas de oxígeno y se basa en la reactividad de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNHP) para formar un complejo proteína-hidrazona (44).



Método

1. Se pesaron 100 mg de tejido y se homogenizaron en 900 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM con EDTA 1mM y tritón 0.1%.
2. Las muestras se centrifugaron 20 min a 15300 rpm a 4°C.
3. Se trataron con sulfato de estreptomicina al 10% durante 24 horas a 4°C, colocando 200 μL de sulfato de estreptomicina más 600 μL de homogenado.
4. Transcurrido el tiempo se centrifugaron 10min a 5000 rpm a 4°C.
5. Se hicieron dos tubos por muestra:
Blanco: 150 μL de homogenado más 600 μL de HCl 2.5 M.
Problema: 150 μL de homogenado más 600 μL de DNPH 10 mM.
6. Los tubos se agitaron e incubaron 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Se adicionaron 750 μL de ácido tricloroacético al 20%. Los tubos se agitaron en el vortex e incubaron a 4°C por 10min.
8. Se centrifugaron por 10min a 5000 rpm a 4°C.
9. Se decantó el sobrenadante.
10. El botón se resuspendió con 600 μL de ácido tricloroacético al 10% a temperatura ambiente.
11. Los tubos se centrifugaron por 10 min a 5000 rpm a 4°C.
12. El sobrenadante se decantó.
13. Se realizaron 3 lavados con etanol-acetato de etilo (600 μL).
14. Los tubos se centrifugaron 10 min a 5000 rpm a 4°C.
15. Se dejó evaporar el etanol en el último lavado.
16. El botón se resuspendió en 1 mL de guanidina 6 M.
17. Se leyó la D.O. a 370 nm.

Para cuantificar la cantidad de proteínas en las muestras se preparó una curva de albúmina al 0.4% en guanidina como se indica a continuación:

ABS (mg/mL)	ASB 0.4% (μ L)	Guanidina 6 M (μ L)
0.26	65	935
0.5	125	875
1	250	750
2	500	500

La D.O. de los tubos blanco se leyó para obtener el contenido de proteínas en el ensayo a 280 nm.

En ambos casos se calibró con guanidina 6 M.

Cuantificaciones hormonales

Las hormonas fueron cuantificadas por el método de radioinmunoanálisis (RIA), utilizando estuches disponibles comercialmente.

Fundamento:

Se tiene una cantidad fija de anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido. La hormona marcada radiactivamente I^{125} , compete con la hormona presente en la muestra a analizar. Después de la incubación, el antígeno unido se separa del antígeno libre por decantación. Posteriormente se mide la radiactividad en un contador gama. La cantidad de cuentas por minuto es inversamente proporcional a la cantidad de la hormona presente en la muestra (45).

- Progesterona

Se utilizó el estuche DSL-3900 ACTIVE® (Webster, Texas, USA).

Los reactivos y muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante el ensayo. El análisis se realizó por duplicado. Se agregaron los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Estándar A (0 ng/mL)	Estándar B (0.3 ng/mL)	Estándar C (1.0 ng/mL)	Estándar D (5.0 ng/mL)	Estándar E (20.0 ng/mL)	Estándar F (60.0 ng/mL)	Control Nivel I	Control Nivel II	Muestras
25µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Se adicionaron 500 µL de progesterona I¹²⁵ en cada tubo.

Todos los tubos se agitaron e incubaron a 37°C durante 60 minutos.

Se decantaron todos los tubos, excepto los de cuentas totales, invirtiéndolos simultáneamente en un recipiente para desechos radiactivos. Se eliminaron las gotas residuales, se midió la radiactividad en un contador gama (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac) durante un minuto y se calculó la concentración expresada como ng/mL.

- Testosterona

Se utilizó el estuche DSL4000ACTIVE® (Webster, Texas, USA).

Los reactivos y muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante el ensayo. El análisis se realizó por duplicado. Se agregaron los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Estándar A (0 ng/mL)	Estándar B (0.3 ng/mL)	Estándar C (1.0 ng/mL)	Estándar D (5.0 ng/mL)	Estándar E (20.0 ng/mL)	Estándar F (60.0 ng/mL)	Control Nivel I	Control Nivel II	Muestras
50µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Se adicionaron 500 µL de testosterona I¹²⁵ en cada tubo.

Todos los tubos se agitaron e incubaron a 37°C durante 60 minutos.

Se decantaron todos los tubos, excepto los de cuentas totales, invirtiéndolos simultáneamente en un recipiente para desechos radiactivos. Se eliminaron las gotas residuales, se midió la radiactividad en un contador gama (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac) durante un minuto y se calculó la concentración expresada como ng/mL.

- Estradiol

Se utilizó el estuche COAT-A-COUNT[®] Estradiol de DPC (Los Angeles, CA, USA).

Los reactivos y muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante el ensayo. El análisis se realizó por duplicado. Se agregaron los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Estándar A (0 pg/mL)	Estándar B (50 pg/mL)	Estándar C (150 pg/mL)	Estándar D (500 pg/mL)	Estándar E (1800 pg/mL)	Estándar F (3600 pg/mL)	Controles	Muestras
100µL	100µL	100 µL	100 µL	100µL	100 µL	100 µL	100 µL

Se adicionó 1 mL de Estradiol I¹²⁵ en cada tubo

Los tubos se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante tres horas

Se decantaron todos excepto los de cuentas totales, invirtiéndolos simultáneamente en un recipiente para desechos radiactivos. Se eliminaron las gotas residuales. Se midió la radiactividad en un contador gama (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac) durante un minuto y se calculó la concentración expresada como pg/mL.

- Corticosterona

Se utilizó el estuche COAT-A-COUNT[®] Corticosterona de rata, DPC. (Los Angeles, CA, USA).

Los reactivos y muestras durante el análisis se mantuvieron a temperatura ambiente. El análisis se realiza por duplicado.

Estándar A (0 ng/mL)	Estándar B (20 ng/mL)	Estándar C (100 ng/mL)	Estándar D (200 ng/mL)	Estándar E (500 ng/mL)	Estándar F (1000 ng/mL)	Estándar G (2000 ng/mL)
100µL	100µL	100 µL	100 µL	100µL	100 µL	100 µL

Se adicionó 1mL de Corticosterona I¹²⁵ en cada tubo

Todos los tubos se agitaron e incubaron a 37°C durante 60 minutos.

Se decantaron todos los tubos, excepto los de cuentas totales, invirtiéndolos simultáneamente en un recipiente para desechos radiactivos. Se eliminaron las gotas residuales, se midió la radiactividad en un contador gama (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac) durante un minuto y se calculó la concentración expresada como ng/mL.

Evaluación de la expresión del ARNm de la proteína StAR

Se hizo la extracción de ARN total, utilizando el método de Chomczynski y Sacchi modificado (46).

1. El tejido (20 a 100 mg) se homogenizó con un politrón (Brinkmann Instruments) en 2 mL de TrizolTM.
2. El homogenado se incubó durante 5 minutos en hielo
3. A las muestras se les adicionaron 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de solución.
4. Las muestras se agitaron vigorosamente.
5. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C en la centrifuga RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont Instruments, Sorvall^R SN9001003).
6. La fase acuosa se obtuvo y se colocó en otro tubo estéril.
7. Se adicionaron 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de la solución inicial.
8. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.
10. El sobrenadante se decantó.
11. El pellet se lavó con etanol al 75%.
12. Se repitieron los pasos 9 y 10 centrifugando 10 min.
13. El pellet se disolvió con agua tratada con DEPC (Apéndice).

14. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible lambda 20, para determinar la densidad óptica a 260/280nm. La relación 260/280 deberá ser entre 1.7 y 2.0 ya que esto indica una preparación libre de contaminantes. Una unidad de absorbancia a 260nm equivale a una concentración de 40 µg de RNA por cada mL.

Para la técnica de Northern Blot, se realizó una electroforesis en gel de agarosa utilizando el siguiente método:

1) Preparación del gel.

- a) Se disolvieron 0.5 g de agarosa (Easy-Bag™ Agarose. Quantum BioprobeR) en 37.5 mL de agua destilada estéril mediante calentamiento. Se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 50°C.
- b) Se agregó MOPS 12X (Apéndice) 4.15 mL.
- c) Se agregó formaldehído al 37% 8.13 mL.
- d) Se agregó bromuro de etidio 0.5 µL.

2) Preparación de la muestra

- a) Una mezcla de RNA equivalente a 10 µL y 23 µL de solución desnaturalizante (Apéndice), se colocó en baño María a 60°C durante 10 min
- b) Pasado el tiempo se sacó y colocó en hielo inmediatamente.
- c) A cada muestra se le agregó 3 µL de solución de carga (Apéndice).
- d) La cámara de electroforesis se montó y se agregó la mitad del amortiguador de corrida.
- e) Las muestras se colocaron en los pozos del gel y se agregó el resto del amortiguador de corrida. Se corrió a 45 volts por 4 hr.
- f) Se observó el gel con luz UV para confirmar que el ARN ribosomal 28 y 18 S no se ha degradado. Se utilizó el control de peso molecular 0.24-9.5 Kb ARN ladder (Invitrogen life technologies, Cat. No. 15620-016, U.S.A.).
- g) Se tomó una fotografía del gel.

3) Transferencia del ARN del gel de agarosa a la membrana de nylon.

- a) El exceso de formaldehído se removió enjuagando el gel varias veces en agua destilada.
- b) El gel se equilibró incubándolo con SCC 10X (Apéndice) durante 20min a temperatura ambiente.
- c) La membrana (Z-probe Bio Rad) se recortó a la medida exacta del gel
- d) La membrana se humedeció en el SCC 10 X (Apéndice) durante 15 min antes de colocar el gel.
- e) 1 pieza de papel filtro No. 2 se humedeció con SSC 10X y se colocó en el soporte de vidrio elevado, de manera que los extremos del papel quedaron inmersos en el amortiguador.
- f) El gel se colocó sobre el papel filtro.
- g) Se colocaron 4 piezas de papel filtro sobre la membrana.
- h) Se colocaron toallas absorbentes sobre el papel filtro.
- i) Se dejó que continuara la transferencia por 12 hrs.
- j) El gel y la membrana se retiraron como unidad.
- k) Las líneas de aplicación de las muestras en la membrana se marcaron con lápiz del No.2 y se comprobó con luz U.V. la transferencia.
- l) La membrana se lavó con agua estéril desionizada para eliminar los residuos de agarosa.
- m) La membrana se secó con papel filtro a temperatura ambiente.
- n) La membrana se colocó envuelta en papel filtro en un horno "UV Crosslinker Hoefer" para fijar el ARN a la membrana.

4) Preparación de la sonda cADN marcada con P³².

La sonda de la proteína StAR (631 pb) se preparó y probó en base a un juego de oligonucleótidos (sentido/antisentido) diseñados tomando la secuencia del cDNA de rata publicado en el Genbank NM0315581 (StAR ARNm de rata).

StAR F1	5'-GGGCATACTCAACAACCAGGAAGGC-3'
StAR R2	5'-CCAATGGCGTGTCAGGTAGATGTGG-3'

La sonda se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa y se purificó por columna. Se midió la D.O. a 260-280 nm para conocer la concentración de la sonda.

Prehibridación

1. La solución Quikhyb calentó a 68°C durante 15 minutos, se agitó.
2. La membrana se colocó dentro de una bolsa plástica y se agregaron 150 µL de la solución por cada cm² de la membrana.
3. Las burbujas se eliminaron y la bolsa se selló perfectamente.
4. Se incubó a baño María a 68°C durante 15 minutos.

El marcaje se efectuó utilizando el método de random primer utilizando el estuche de Invitrogen life Technologies (RadPrime DNA Labeling System, Cat. No. 184228-011, Invitrogen Co. New Zeland).

1. En un tubo eppendorf se colocaron 1.2 µL (aproximadamente 200ng) de la sonda de la proteína StAR y 20.8 µL de agua destilada estéril.
2. Se desnaturizó durante 5 minutos en agua hirviendo.
3. Al término se puso en hielo inmediatamente.
4. Se agregaron en orden:
1 µL dATP 500 µM
1 µL dGTP 500 µM
1 µL dTTP 500 µM
20 µL Solución Random Primers 2.5X
5 µL de P³²*
5. Se agitó. Se adicionó 1 µL de la enzima "Klenow Fragment", se mezcló muy bien y se incubó a 37°C durante 10 minutos.
6. Se adicionaron 5 µL de "buffer Stop".
7. La sonda se purificó haciéndola pasar a través de una columna (en jeringa de insulina) con Sephadex G50, centrifugando a 200 rpm durante 5 minutos. El eluido se colectó en un tubo.
8. Se desnaturizó durante 5 minutos en agua hirviendo y se pasó a hielo.

5) Hibridación del ARN

1. Se retiraron 1.5 mL de la solución de prehibridación de la bolsa y se mezcló con la sonda marcada preparada anteriormente.
2. La sonda se agregó a la bolsa plástica, la cual fue sellada teniendo cuidado de no dejar burbujas ni fugas de material radioactivo.
3. Se hibridó a 68°C durante 24 hrs en agitación.
4. La bolsa se abrió y la solución radioactiva se recolectó en un tubo para desecharla adecuadamente.
5. La membrana se sacó de la bolsa para lavarla 2 veces con buffer SSC 2X (Apéndice) a temperatura ambiente, con agitación durante 15 minutos por cada lavado.
6. Se lavó con buffer SDS 0.1%-SSC 0.01% (Apéndice) a 58°C durante 40 minutos en agitación.
7. Después del lavado, la membrana se secó con una pieza de papel filtro y se colocó en una bolsa plástica, luego se colocó en un cassette Kodak X-Omat.
8. En el cuarto oscuro se colocó la película sobre la membrana y se cerró el cassette.
9. Se expuso durante 24 horas y la película se reveló.

La membrana se hibridó de nuevo, esta vez con la sonda de la ciclofilina, la cual es una proteína constitutiva de todas las células y se utilizó como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de la placa radiográfica para determinar la intensidad de la mancha. Se utilizó el programa Sigma ScanPro System (Sigma ScanPro, versión 4.0, San Rafael, CA, USA).

Análisis estadístico

Para comparar los resultados para comparar todos los grupos se utilizó una ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Bonferroni, una $p < 0.05$ se consideró significativa. En la determinación de proteínas oxidadas, para comparar al grupo control con el grupo ANP se utilizó una t de Student no pareada. Este análisis se realizó mediante el programa Graph Pad Prism 3.0 (Graphpad Software Inc. San Diego, CA, USA).

7. RESULTADOS

Pruebas bioquímicas

Las siguientes determinaciones bioquímicas se realizaron para comprobar que al día 10 se logró inducir el síndrome nefrótico en las ratas, el cual está caracterizado por proteinuria, hipoproteinemia e hipercolesterolemia.

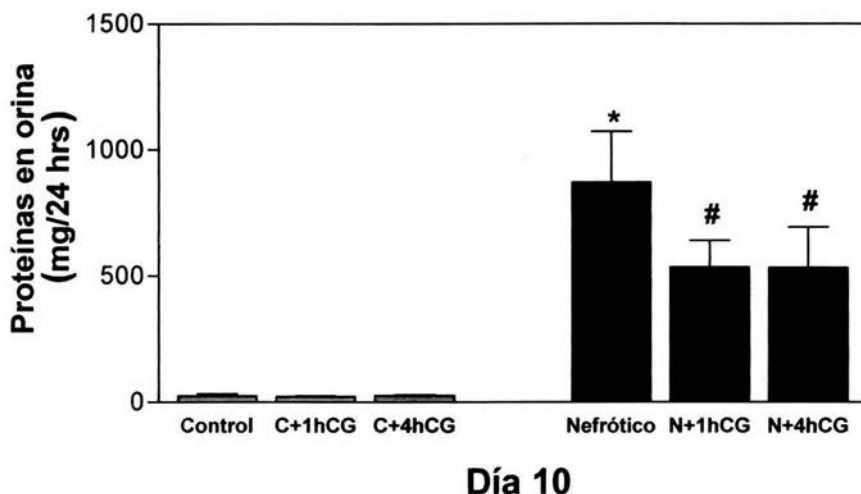


Figura 13. Proteínas en orina al día 10, los resultados se expresan como promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs Control, # $p < 0.05$ vs Nefrótico.

En la figura 13 se observa el aumento de las proteínas en orina de los animales nefróticos sin estímulo, al administrarles 1 y 4 dosis de hCG hay una disminución significativa de las proteínas en orina con respecto al grupo Nefrótico, por lo que el estímulo con hCG mejora la proteinuria.

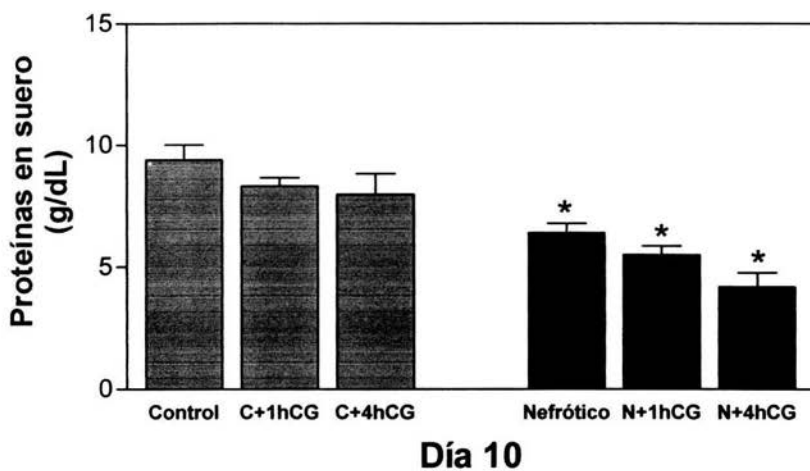


Figura 14. Proteínas en suero los resultados se expresan como promedio \pm EEM * $p < 0.05$ vs Control.

La figura 14 nos muestra una disminución significativa en las proteínas en suero, en las ratas nefróticas, esta condición no mejora después del estímulo con hCG, a pesar de que la proteinuria se reduce en dichos grupos.

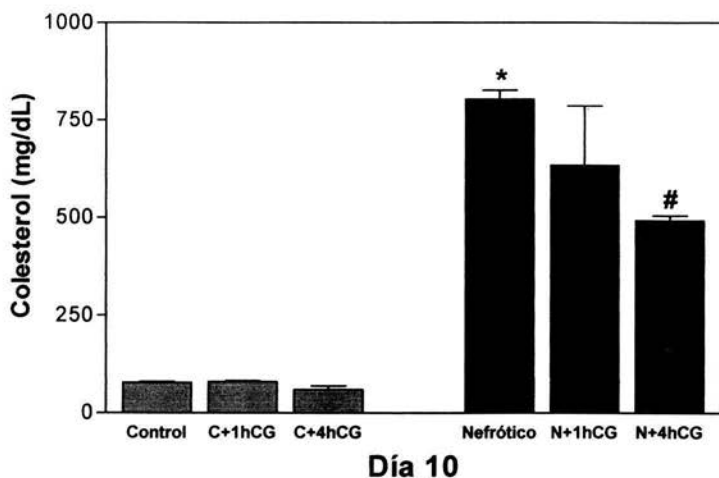


Figura 15. Colesterol en suero, los datos son expresados como promedio \pm EEM * $p < 0.05$ vs Control. # $p < 0.05$ vs Nefrótico.

La figura 15 muestra un aumento significativo en el colesterol sérico en las ratas nefróticas, sin embargo el grupo de animales nefróticos que recibió 4 dosis de hCG presenta una disminución significativa del colesterol con respecto a los animales nefróticos que no recibieron tratamiento.

Proteínas oxidadas

Las proteínas oxidadas son indicio de que existe un daño oxidativo, en la figura 16 se observa que una hora después de la administración de ANP, hay una mayor cantidad de proteínas oxidadas en riñón, mientras que en el testículo no hay diferencia significativa entre el grupo control y el administrado con ANP, estos resultados indican que el daño producido por las especies reactivas de oxígeno es específico sobre riñón y no afecta el testículo.

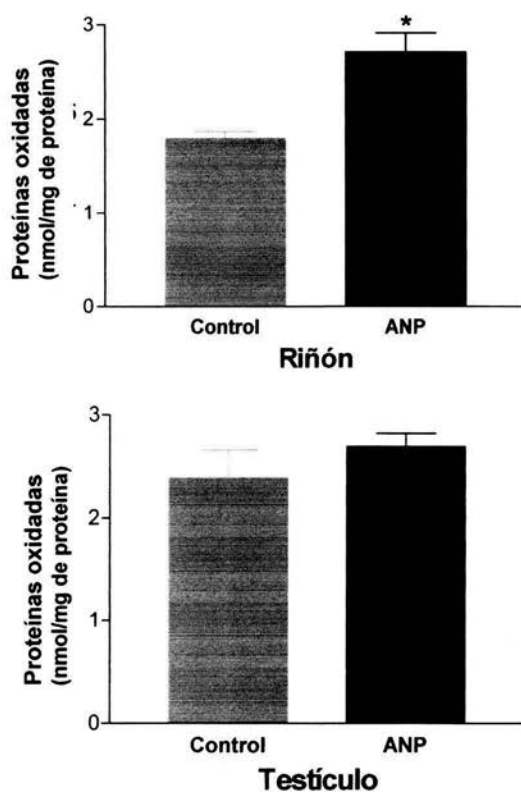


Figura 16. Proteínas oxidadas en riñón y testículo de ratas control y ratas 1 hora después de administrarles ANP. Los datos son expresados como promedio \pm EEM * $p < 0.05$ vs Control.

Perfil hormonal

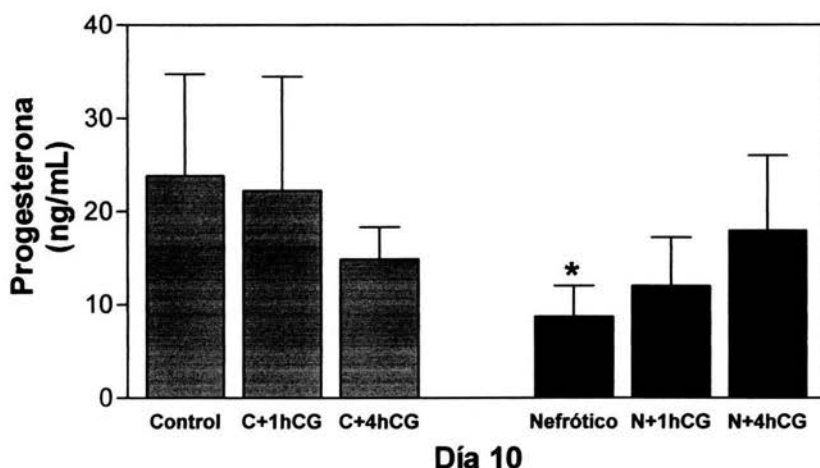


Figura 17. Concentraciones de progesterona en suero. Los datos son expresados como promedio \pm EEM * p < 0.05 vs Control.

La figura 17 muestra que la concentración de progesterona tiene una tendencia a disminuir en el grupo control administrado con 4 dosis de hCG, situación que probablemente se deba al fenómeno de refractariedad, por una sobre estimulación hormonal. Los animales nefróticos que no recibieron estímulo presentan niveles de progesterona significativamente bajos comparados con el control. En las ratas nefróticas que recibieron tratamiento se observa una respuesta positiva, ya que los niveles de esta hormona aumentan y no presentan una diferencia significativa con respecto a los controles, sin embargo, las glándulas adrenales también son capaces de producir progesterona, por lo que en este experimento no se puede determinar si las hormonas cuantificadas son exclusivas de los testículos.

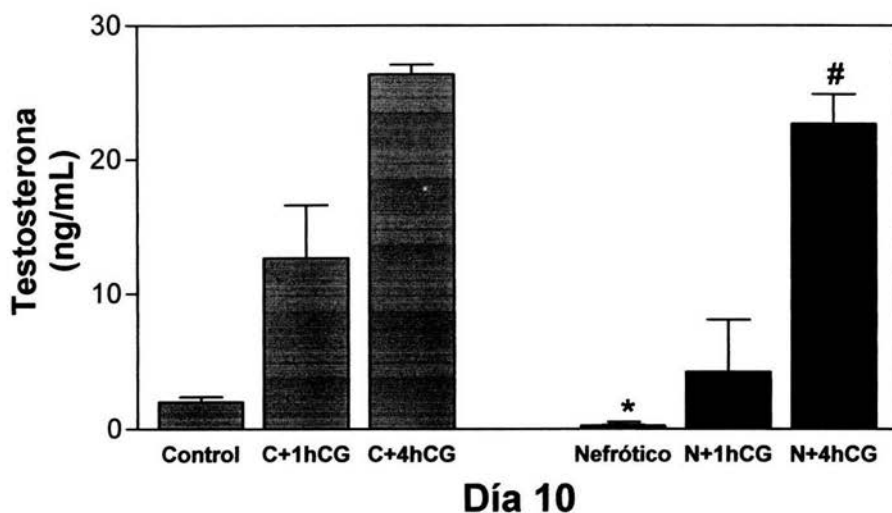


Figura 18. Concentraciones de testosterona en suero. Los datos son expresados como promedio \pm EEM
 * $p < 0.05$ vs Control. # $p < 0.05$ vs Nefrótico.

La figura 18 muestra una disminución de la testosterona en la rata nefrótica al día 10 sin tratamiento, también se observa que las ratas tratadas con 1 y 4 dosis de hCG responden incrementando los niveles de la hormona de manera semejante a los controles, indicando que la síntesis de hormonas esteroideas si responde a dichos estímulos hormonales, sin embargo no se puede determinar si la testosterona producida proviene de los testículos o de la glándula adrenal.

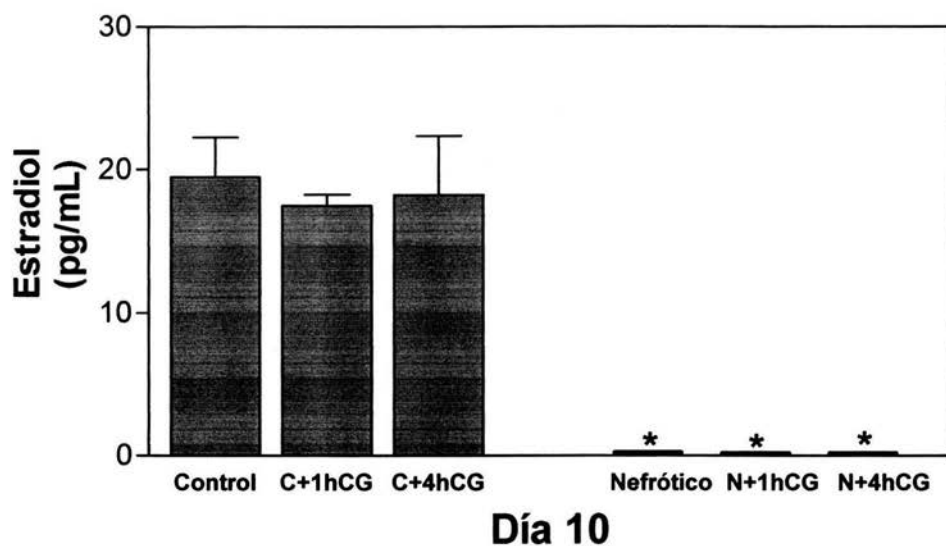


Figura 19. Concentraciones de estradiol en suero. Los datos son expresados como promedio \pm EEM * $p < 0.05$ vs Control.

En la figura 19 se muestra que en los animales nefróticos el estradiol permanece indetectable incluso después del tratamiento con hCG, indicando que la hCG por si sola no es capaz de incrementar la síntesis de estradiol ya que se requiere de la FSH para que esta se lleve a cabo normalmente.

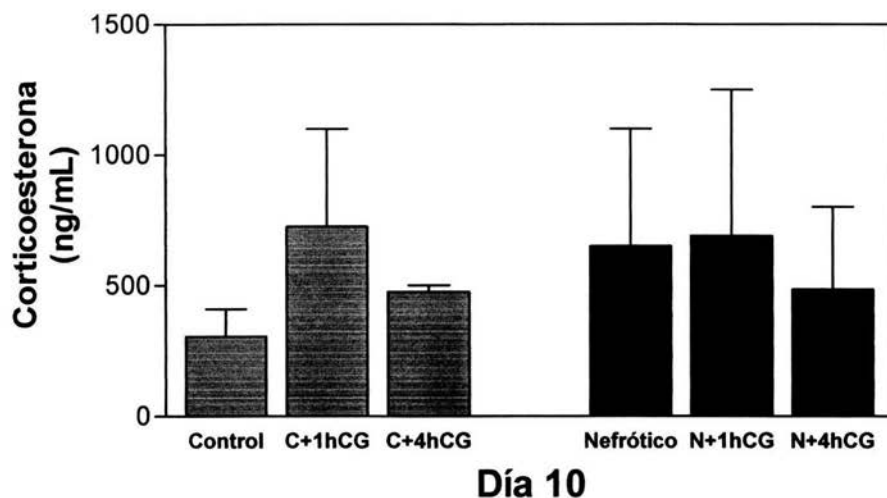


Figura 20. Concentraciones de corticosterona en suero. Los datos son expresados como promedio \pm EEM.

La figura 20 muestra que la concentración de corticosterona presenta una tendencia a aumentar en las ratas control con 1 dosis de hCG sin embargo, en las ratas control estimuladas con 4 dosis de hCG la concentración tiende a disminuir con respecto a las de 1 dosis, este comportamiento puede ser resultado de una sobre estimulación de la glándula adrenal, resultando en la refractariedad. Los animales nefróticos muestran una tendencia similar, aunque se tiene mucha dispersión, la cual puede deberse al estrés generado por la condición nefrótica, lo que provoca que en algunos animales haya una mayor producción de corticosterona.

Expresión génica de la proteína StAR en testículo

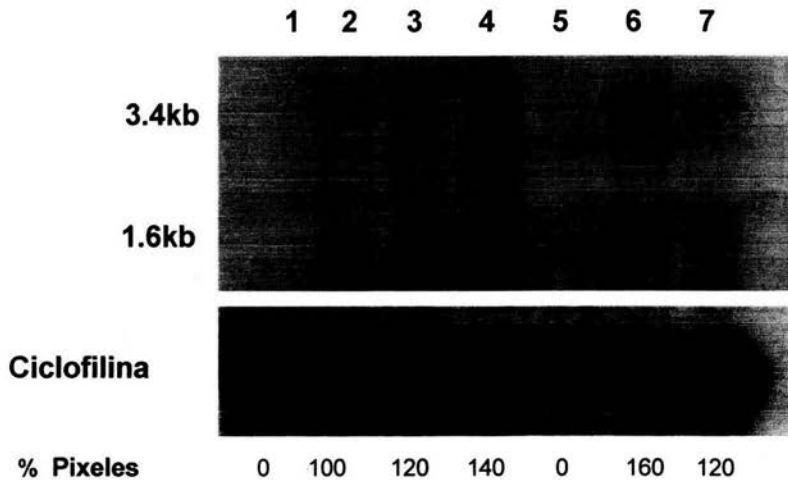


Figura 21. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la proteína StAR en testículo: carril 1 Hígado (control negativo), 2 rata control basal, 3 rata control +1hCG, 4 rata control +4hCG 5 rata nefrótica basal 6 rata nefrótica +1hCG 7 rata nefrótica +4hCG.

Se observa en la figura 21, la expresión de la proteína StAR en testículo. De acuerdo al análisis densitométrico, la expresión en el control estimulado con 1 dosis de hCG aumenta 1.2 veces respecto al control sin estímulo, después de 4 dosis aumenta 1.4 veces. En la rata nefrótica al día 10 no hay expresión de la proteína StAR, pero después del estímulo con una dosis de hCG la expresión aumenta 1.6 veces y después de cuatro dosis de hCG la expresión aumenta 1.2 veces.

Expresión génica de la proteína StAR en glándula adrenal

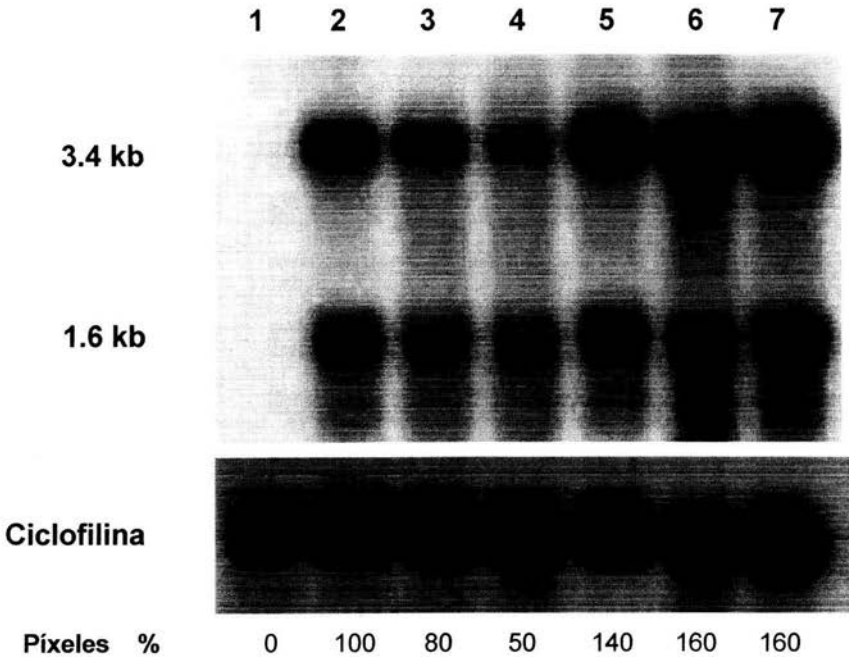


Figura 22. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la proteína StAR en glándula adrenal: carril 1 Hígado (control negativo), 2 rata control basal, 3 rata control +1hCG, 4 rata control +4hCG 5 rata nefrótica basal 6 rata nefrótica +1hCG 7 rata nefrótica +4hCG.

La figura 22 muestra la expresión de la proteína StAR en la glándula adrenal. La rata control estimulada con 1 dosis de hCG muestra una disminución de 0.8 veces con respecto al control, mientras que la rata estimulada con 4 dosis de hCG presenta una disminución de 0.5. La expresión en la rata nefrótica se incrementa 1.4 veces, mientras que en la ratas nefrótica, después de 1 dosis de hCG la expresión aumenta 1.6 veces, al igual que después de 4 dosis de hCG.

8. DISCUSIÓN

El síndrome nefrótico ha sido asociado a hipogonadismo hipogonadotrópico (36), pero son pocos los trabajos que se han realizado a este respecto. En esta investigación se encontró que no hay expresión del ARNm de la proteína StAR en el testículo de la rata con síndrome nefrótico agudo, lo cual explica las alteraciones en la esteroidogénesis testicular, debido a que la proteína StAR es la encargada de transportar el colesterol hacia la membrana interna mitocondrial, paso limitante de la síntesis de esteroides.

Las pruebas bioquímicas evidenciaron el establecimiento del síndrome nefrótico 10 días después de la administración de ANP, ya que las ratas presentaban proteinuria, hipoproteinemia e hiperlipidemia, signos característicos de la enfermedad. Sin embargo, posterior al estímulo con hCG la hipercolesterolemia y la proteinuria presentaron una mejora significativa (Figuras 13 y 15), aunque no alcanzaron los niveles normales. Este resultado puede ser explicado por el hecho de que la testosterona aumenta como resultado de la administración de hCG y se sabe que dicho andrógeno tiene receptores en el riñón e induce la proliferación celular y mejorando la condición renal (48). Este hallazgo permite plantear la posibilidad de utilizar a la hCG como alternativa terapéutica durante el síndrome nefrótico.

Con el fin de conocer si el daño oxidativo causado por el ANP es específico sobre riñón y no afecta al testículo se realizó la determinación de las proteínas oxidadas en ambos órganos. Los resultados confirmaron que el daño fue producido sobre el riñón y no en el testículo (Figura 16), lo cual indica que las alteraciones endocrino-reproductivas presentes en el SN son consecuencia de la enfermedad y no del modelo experimental. Este planteamiento se reafirma con el hecho de que la mayor parte del ANP administrado es metabolizado y excretado en un lapso aproximado de 8 horas y las alteraciones hormonales aparecen después de 7 a 10 días (49).

Se ha reportado que durante el síndrome nefrótico los niveles de FSH y LH disminuyen (35), por lo que se propone que en el modelo experimental la disfunción endocrina se inicia en la hipófisis (36). Con esta referencia y para determinar si el testículo es capaz de

responder al estímulo hormonal exógeno, se utilizó hCG, la cual se une a receptores de LH en las células de Leydig estimulando la síntesis y secreción de hormonas esteroides testiculares (2). Nosotros encontramos un aumento en las concentraciones de testosterona y progesterona indicando que el receptor de LH es funcional y es capaz de activar la maquinaria esteroidogénica. Sin embargo, el estradiol permanece indetectable aún después de los estímulos con hCG lo que indica la posibilidad de una falla en el proceso de aromatización de la testosterona para dar estradiol, en la cual está implicada la FSH, ya que se conoce que este es un proceso que requiere FSH (5) y como se mencionó anteriormente esta hormona no tiene actividad biológica durante el síndrome nefrótico (36). De este modo, la aplicación de estímulos con hCG y FSH de manera simultánea podría confirmar que la falla en el proceso de aromatización es resultado de la falta de estímulo debido a FSH.

En el análisis de Northern Blot que se realizó para evaluar la expresión del RNAm de la proteína StAR en testículo (figura 21), se encontró que en el grupo control que recibió 1 dosis de hCG, la expresión del RNAm de la proteína StAR permanece prácticamente igual con respecto al grupo que no recibió ningún estímulo, pero aumenta en el grupo de animales a los que se les administraron 4 dosis. Este resultado coincide con lo reportado por Sewer (16), ya que menciona que el estímulo de las hormonas trópicas puede ser de dos tipos: agudo (1 dosis de hCG), el cual regula la movilización del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna, por lo que la actividad de la proteína StAR aumenta pero no se promueve su síntesis, y el estímulo crónico (4 dosis), que además de activar el transporte de colesterol, regula la transcripción de los genes que codifican para las enzimas que participan en la esteroidogénesis (16). Por lo que se refiere a los animales nefróticos, al día 10 la expresión del RNAm de la proteína StAR testicular fue nula, lo cual implica que el paso limitante de la esteroidogénesis se encuentra alterado durante esta enfermedad. Esto se ve reflejado en el hecho de que las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol disminuyen de manera significativa en esta etapa aguda de la enfermedad. Sin embargo, los grupos de animales nefróticos estimulados con 1 y 4 dosis de hCG presentaron un incremento en la expresión del RNAm de la proteína StAR, siendo esta mayor después de 1 dosis, sin embargo, de acuerdo a lo señalado anteriormente sobre los estímulos crónicos y agudos, se esperaría que las

concentraciones de progesterona y testosterona aumentarían con ambos estímulos, y que fueran mayores en la prueba con una cuatro dosis de hCG, sin embargo la concentración de dichas hormonas presenta un incremento mayor cuando se administran 4 dosis. Estas discrepancias pueden ser explicadas en base al complejo desorden metabólico asociado a la enfermedad, pero el hecho de que la expresión del ARNm de la proteína StAR aumente ante el estímulo de hCG y estimule la síntesis de esteroides sugiere que la maquinaria esteroidogénica está presente y solo necesita ser activada. Sin embargo, es difícil aceptar esta posibilidad pues aunque la proteína StAR es considerada el paso limitante, se ha reportado que la P450_{scc} no responde ante las pruebas dinámicas con hCG, y ante esta circunstancia es poco probable el incremento en la síntesis de esteroides gonadales. Otra posible explicación a los resultados de esta tesis puede deberse a que el aumento observado en la concentración de la progesterona y la testosterona provenga de la glándula adrenal, dado que se ha reportado que mediante estímulo con hCG es posible encontrar receptores para LH en la glándula adrenal (36). Por lo que al ser estimulado el testículo con hCG se pudo haber producido progesterona, y de esta la testosterona. Esto explicaría el aumento en la concentración de ambas hormonas sin la participación de la P450_{scc} y la proteína StAR. Dicha especulación podría ser probada realizando pruebas con animales adrenalectomizados, de manera que las hormonas esteroides solamente podrían tener su origen en el testículo.

Por otro lado, al evaluar la expresión del ARNm de la proteína StAR en la glándula adrenal (Figura 22) en las ratas control observamos que disminuye en las que recibieron 1 y 4 dosis de hCG, lo cual tal vez se deba al fenómeno de refractariedad (50). Adicionalmente los grupos de animales nefróticos, tanto el que no recibió tratamiento como los que recibieron 1 y 4 dosis de hCG presentan un aumento en la expresión de StAR con respecto a los controles. La concentración de corticosterona también aumenta. Este hallazgo puede ser explicado por diversos factores como la presencia de receptores para LH en esta glándula, así como por el estrés asociado a la condición de enfermedad de los animales, ya que se conoce que el estrés tiene una influencia significativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (51).

En conjunto los resultados presentados en esta tesis demuestran una alteración en la expresión del ARNm de la proteína StAR, lo cual permite explicar el hipogonadismo asociado al síndrome nefrótico.

9. CONCLUSIONES

- Durante la fase aguda del síndrome nefrótico no existe expresión del ARNm de la proteína StAR en el testículo, lo cual indica que la esteroidogénesis gonadal se encuentra alterada como consecuencia del deterioro en el paso limitante de la misma.
- El estímulo con hCG fue capaz de incrementar la expresión testicular del ARNm de la proteína StAR, indicando que los receptores para esta hormona en el testículo son funcionales.
- En base a los datos bioquímicos obtenidos después de la prueba dinámica con hCG podemos concluir que la hormona gonadotropina coriónica ejerce un efecto positivo sobre la función renal.
- El daño oxidativo producido por el ANP es específico contra el riñón y no afecta a la gónada, por lo que concluimos que las alteraciones endocrinas son complicaciones específicas del síndrome nefrótico.

10. REFERENCIAS

1. Braunstein GD. Testículos. En: *Endocrinología Básica y clínica*. Ed. Manual Moderno, México, 9: 451– 461, 1995.
2. Guyton AC. Hormonas hipofisiarias y su control por el hipotálamo. En: *Tratado de fisiología médica*, 9ª edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana. México 74:1019–1021, 1997.
3. Hales DB. Cytokines and Testicular Function. En: *Cytokines and Reproduction*. Ed. John Wiley & Sons, New York 17– 42, 2000.
4. Means AR, Fakunding JL, Huckins C. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 32:477– 527, 1976.
5. Arias P. Endocrinología de la reproducción. En: *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*, 13ª edición, Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina 38: 659-699, 2003.
6. Miller W. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endo Rev* 9:295– 316, 1988.
7. Brown MS, Kovenen PT, Goldstein JL. Receptor mediated uptake of lipoprotein–cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog Horm Res* 35:215, 1979.
8. Farskan Y, Timberg R. Preparation of antiserum to rat cytochrome P450_{scc}, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinol* 118: 1353 – 1365, 1986.
9. Stocco DM. StAR Protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63:193 – 213, 2001.
10. Artemenko I, Zhao D, Hales DB. Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem* 275: 46583 – 46596, 2001.
11. Soccio RE, Breslow JL. StAR–related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem* 278: 22183 – 22186, 2003.
12. Stocco DM. Tracking the role of a StAR in the sky of the new millennium. *Mol Endo* 15:1245 – 1254, 2001.

10. Artemenko I, Zhao D, Hales DB. Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem* 275: 46583 – 46596, 2001.
11. Soccio RE, Breslow JL. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem* 278: 22183 – 22186, 2003.
12. Stocco DM. Tracking the role of a StAR in the sky of the new millennium. *Mol Endo* 15:1245 – 1254, 2001.
13. Liu J, Heikkila P, Kahri AI. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Endocrinol* 150:43–50, 1996.
14. Thompson WE, Powell J, et al., Immunolocalization and expression of the steroidogenic acute regulatory protein during the transitional stages of rat follicular differentiation. *J Histochem Histochem* 47:769–776.
15. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164:247–253, 2000.
16. Sewer MB, Waterman MR. Insights into the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes and StAR. *Rev Endocr Metab Disord* 2: 269 – 274, 2001.
17. Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *Molecular Endocrinology* 11:136-147,1997.
18. Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR); StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J Biol Chem* 273:16339 – 16345, 1998.
19. Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Staybrook SE. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem* 273:26285 – 26288, 1998.
20. Bose HS, Whittal RM, Baldwin MA. The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 7250 – 7255, 1999.
21. Fawcett DW. Sistema Urinario. En: *Tratado de Histología* 12ª edición, ed. Interamericana McGraw-Hill, México 30: 791 – 799, 1995.

25. Roden WR, Karnowsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60: 423-433, 1974.
26. Brady HR, O'Meara YM. Glomerulopatías Principales. En: *Principios de Medicina Interna Harrison TR*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, México 274:1749-1754, 1998.
27. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En: *Tratado de nefrología*. Martínez Maldonado M Ed. Ediciones Norma, España 685 – 694, 1993.
28. Glasscock & Massry, *Textbook of Nephrology*, 4a edición, Ed. Lippincott Williams & Wilkins New York 74: 1357-1371, 1998.
29. Baker BR , Joseph JP, Williams JH. Puromycin syntethic studies VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 76:2838, 1954.
30. Löwenborg EK, Jaremko G. Glomerular function and morphology in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Nephrol Dial Trans* 15: 1547–1555, 2000.
31. Cours W, Huitoma S. Puromycin aminonucleoside and adriamycin disturb cytoskeletal and extracellular matrix protein organization, but not protein synthesis of cultured glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 2: 40–50, 1994.
32. Ricardo SD, Bertram JF. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside treated rats. *J Am Soc Nephrol* 4:1974-1986, 1994.
33. Diamond JR, Bonvebtre JV. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 45:1416-1424, 1994.
34. Glass AR, Beach J, Vigersky RA. Hypogonadotropic hypogonadism in nephrotic rats: increased sensitivity to negative feedback effects of testosterone. *Metabol* 34: 574-579, 1985.
35. Menjivar 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.
36. Menjivar M, Ortiz–López MG, Vilchis F, Díaz–Bonilla L, Zambrano E, Zariñan T, Pedraza–Chaverri. Evaluation of pituitary–testicular function during experimental nephrosis *Life Sci* 70: 2769 – 2782, 2002.

35. Menjivar 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.
36. Menjivar M, Ortiz-López MG, Vilchis F, Díaz-Bonilla L, Zambrano E, Zariñan T, Pedraza-Chaverri. Evaluation of pituitary-testicular function during experimental nephrosis *Life Sci* 70: 2769 – 2782, 2002.
37. 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.
38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265, 1951
39. Dunn MJ, Protein determination of total protein concentration, E.L.V., Angal S, Protein purification Methods, Oxford: IRL Press 1992.
40. Vera JC. Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure. *Anal Biochem* 174: 187-96, 1998.
41. Ebina S, Nagai Y. Re-evaluation of turbidimetry of proteins by use of aromatic sulfonic acids and chloroacetic acids. *Clin Chem* 25:247-51, 1979.
42. Garibaldi S, Aragno I, Odetti P, Marinari UM. Relationships between protein carbonyls, retinol, and tocopherols level in human plasma. *Biochem Molec Biol Int* 34: 729–736, 1994.
43. Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*, 186: 464–478, 1990.
44. Levine RL, William JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*, 233: 343-357, 1994.
45. Abbas AK. Anticuerpos y antígenos. En: *Inmunología Celular y Molecular*. Ed. Interamericana McGraw-Hill, 2ª edición, México 3: 63-64, 1996.
46. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
47. Pavenstädt I, Kriz W. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253-307, 2003.

51. Molitch M, Hou S. Neuroendocrine alterations in systemic disease. Clin Endocrinol Metab 12: 825-851,1983.

11. APÉNDICE

Reactivos para Northern blot

– Agua con DEPC al 0.1%

Agua desionizada estéril	100 μ L
Dietilpírocarbonato (DEPC)	100 μ L
Incubar 24 h a 37°C	
Esterilizar dos veces	

– MOPS 12X

Ácido propanesulfónico 3-N-morfolino (MOPS)	5.65 g
Acetato de sodio 0.06 M	6 mL
Etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) 0.5 M pH 8	2.4 mL
Agua destilada desionizada estéril	100 mL

– Gel de Agarosa al 1%

Agarosa	0.5 g
Agua destilada desionizada estéril	37.5 mL
MOPS 12X	4.15 mL
Formaldehído al 37%	8.13 mL
Bromuro de etidio	0.5 μ L

– Solución desnaturizante

Formamida	500 μ L
MOPS 12X	83 μ L
Formaldehído al 37%	162 μ L

– Solución Buffer de carga

Azul de bromofenol	0.25%
Cianol-Xileno	0.25%
Ficoll 400	15.0%

– MOPS 1X

MOPS 12X	21 mL
Agua destilada desionizada estéril	Aforar hasta 250 mL

– SSC 10X

NaCl	175.3 g
Citrato de Sodio	88.2 g
Agua estéril	Aforar a 1L

– Buffer SSC 2X

SSC 20X	25 mL
SDS al 7%	3.57 mL
Aforar a 250mL	

– Buffer SDS 0.1%

SSC 20X	1.25 mL
SDS al 7%	3.57 mL
Aforar a 250mL	

Reactivos para proteínas en suero

Albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05%.

– Solución A:

Na₂CO₃ al 2%.

NaOH al 0.4%.

Tartrato de sodio al 0.02%.

Almacenar a temperatura ambiente.

– Solución B:

CuSO₄ al 0.5%.

Almacenar a temperatura ambiente.

– Solución C Se prepara al momento del ensayo:

	50 tubos
Solución A	50 mL
Solución B	1 mL

– Solución D Se prepara al momento del ensayo:

Folín 1 N. Folín 2 N + H₂O 1:1

Reactivos para proteínas en orina

Albúmina sérica bovina al 0.1% (p/v) en agua destilada.

Ácido tricloroacético al 12.5% (p/v) en agua destilada.