



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

CONTENIDO MINERAL Y MARCADORES BIOQUIMICOS OSEOS EN RATAS CON SINDROME NEFROTICO INDUCIDO CON AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

FELIPE JIMENEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El síndrome nefrótico (SN) se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, albuminuria, edema, ascitis e hipercolesterolemia. Las alteraciones del metabolismo óseo que se presentan en el SN y el impacto que estas tienen en el esqueleto se han estudiado muy poco. Además, el valor de los marcadores bioquímicos [fosfatasa alcalina (FA), hidroxiprolina (OHPr), hormona paratiroidea (PTH) y osteocalcina (OC)] en este modelo experimental de SN inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP) se desconoce.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo y su impacto en el esqueleto en el SN inducido con ANP.

El SN se indujo en ratas Wistar macho de 130 g de peso con una inyección subcutánea única de 15 mg/100 g de ANP. Los animales control recibieron solución salina. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas durante los 26 días del estudio para recolectar la orina. Los animales se sacrificaron los días 2, 6, 12 y 26 del estudio. En sangre se determinaron calcio ionizado (Cai), PTH, OC, 25-OHD y $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, FA y proteínas; mientras que en orina se determinaron OHPr, AMPc y proteínas. Los fémures se extirparon y se mantuvieron en formol previa cuantificación del contenido mineral (BMC) y la densidad ósea (BMD).

Las ratas presentaron al día 6: hipoproteinemia, edema,

disminución de los metabolitos de la vitamina D y un aumento significativo de la PTH (164 ± 32.06 pg/mL) con respecto a los controles (106.83 ± 11.49 pg/mL). Sin embargo, los valores de AMPc en orina disminuyeron significativamente a pesar del aumento de PTH, lo que puede sugerir que en este modelo la respuesta del complejo hormona receptor (PTH-Adenilatociclasa) a nivel de la membrana basal está alterado. Por otro lado la excreción urinaria de OHPr aumenta los días 6 y 12 con disminución franca de los niveles de FA (día 2) que no regresan a sus niveles normales. El aumento de la concentración de OC del día 6 (14.6 ± 1.74 ng/mL) con respecto a los controles (4.88 ± 0.47 ng/ml), la cual es un marcador específico del remodelamiento esquelético y de la actividad osteoblástica, aunado a la pérdida por orina de OHPr permite pensar que en el SN la actividad ósea metabólica está francamente alterada, fenómeno influenciado por el aumento de PTH para compensar la hipocalcemia característica del SN. Estos hallazgos y el efecto que tienen en el esqueleto se confirma al determinar que el contenido mineral y la densidad del hueso están significativamente bajas en ratas con SN. Este aumento en la desmineralización (actividad osteoclástica) no es compensado por el aumento de OC (actividad osteoblástica) lo que origina un deterioro del esqueleto y, por consiguiente, un desequilibrio del metabolismo mineral en el SN.

I N D I C E

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	i
I. INTRODUCCION.....	1
1. SINDROME NEFROTICO.....	1
2. SISTEMA DE LA VITAMINA D.....	7
3. MARCADORES BIOQUIMICOS DEL METABOLISMO OSEO.....	14
4. DENSITOMETRIA OSEA (BMD) Y CONTENIDO MINERAL OSEO (BMC).....	19
II. ANTECEDENTES.....	21
III. HIPOTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	24
V. MATERIALES Y METODOS.....	25
VI. RESULTADOS.....	44
VII. DISCUSION.....	53
VIII. CONCLUSIONES.....	58
IX. REFERENCIAS.....	59

ABREVIATURAS EMPLEADAS
EN ESTE TRABAJO

AMPc	Adenisín monofosfato cíclico
ANP	Aminonucleósido de puromicina
BMC	Contenido mineral óseo
BMD	Densidad mineral ósea
Bo	Patrón cero
°C	Grados centígrados
Ca _i o Ca ⁺⁺	Calcio ionizado
cm	Centímetro (s)
cpm	Cuentas por minuto
CT	Cuentas totales
DBP	Proteína acopladora de vitamina D
DEXA	Densitometría de doble foton y rayos X
dL	Decilitro
D.O.	Densidad óptica
dpm	Decintegraciones por minuto
E ₄₀₅ /min	Extinción promedio por minuto
FA	Fosfatasa alcalina
Fig.	Figura
g	Gramos
GPT	Glándulas paratiroides
HCl	Acido clorhídrico
¹²⁵ I	Yodo 125 radioactivo
Kg	Kilogramo
M	Molar (Molaridad)
µg	Microgramo (s)

mg	Miligramo (s)
µL	Microlitro (s)
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
N	Normal (Normalidad)
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanometros
nmol	Nanomol (Nanomolar)
NSB	Unión inespecífica
OC	Osteocalcina
25-OHD	25-hidroxivitamina D o calcitriol
1,25(OH) ₂ D	1,25-dihidroxivitamina D o calcidiol
OHPr	Hidroxiprolina
p.e.	Por ejemplo
pg	Picogramo (s)
pmol	Picomol
PTH	Hormona paratiroidea
PTH-MM	Hormona paratiroidea molécula media
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Síndrome nefrótico
Tc	Cuentas totales
U	Unidades
UV	Luz ultravioleta
Vit D	Vitamina D

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

1. SINDROME NEFROTICO

El síndrome nefrótico (SN) es un padecimiento que se caracteriza por proteinuria, hipoproteïnemia, albuminuria, disminución de la presión coloidosmótica, ascitis, edema, lipiduria, retención de sodio, hipercolesterolemia e hiperlipoproteinemia. La prevalencia de sus causas esta relacionado con la edad, en los niños generalmente es desconocida (idiopática) y en los adultos puede ser secundario a una glomerulonefritis o a una intoxicación (1-4).

Todas las alteraciones metabólicas del SN surgen como resultado de un solo defecto que es el incremento en la permeabilidad glomerular de proteínas plasmáticas (Fig. 1).

El mecanismo de hipoalbuminemia en el SN se ha estudiado extensamente. Puede ser consecuencia de una reducción en la síntesis de albúmina, de un incremento en el catabolismo y/o cambios en la distribución de albúmina. En el SN, algunos o todos estos factores pueden estar presentes. Claramente, la pérdida de la albúmina en la orina es importante.

Los efectos de la hipoalbuminemia son muchos. Varias complicaciones del SN, incluyendo algunas de las más serias, son debidas al efecto de la concentración de albúmina en suero (1,2), entre ellas destacan:

a) **Hiperlipidemia:** La hipoalbuminemia juega un papel en la patogénesis de la hiperlipidemia del SN, al disminuir la presión oncótica creando un estímulo para aumentar la

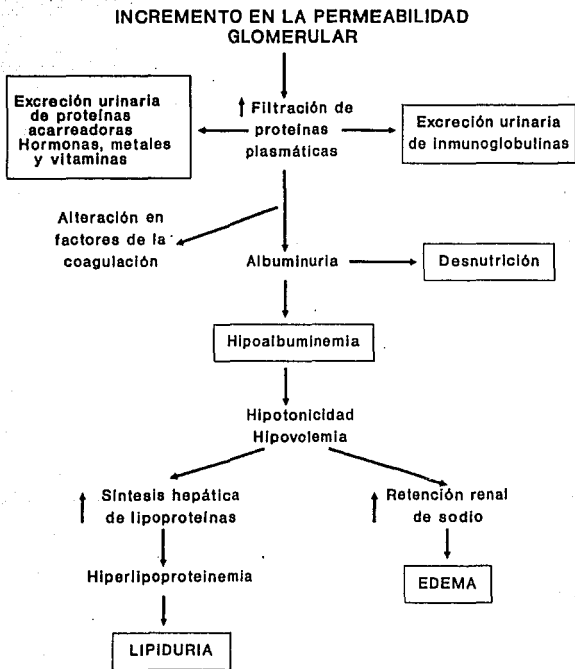


Fig. 1 Fisiopatología del síndrome nefrótico.
(Kidney Int 1988;33:1184-1202)

producción hepática de lipoproteínas. Este aumento, junto con una disminución en el catabolismo de las lipoproteínas, produce hiperlipoproteinemia.

b) **Edema:** En el SN, se produce una reducción de la presión oncótica favoreciendo el paso de fluidos del compartimiento vascular al intersticial, produciendo edema y ascitis.

El aumento en la filtración de las proteínas y su pérdida por la orina, trae como consecuencia:

a) **Alteración en el estado inmune:** Los pacientes con SN presentan niveles bajos de inmunoglobulinas séricas e IgG. Tres mecanismos parecen estar involucrados, pérdida por orina, un incremento en el catabolismo y una reducción en su síntesis. El factor B, o proactivador de C3, un componente de la vía del complemento, se encuentra reducido, probablemente a causa de la pérdida por orina.

Al alterarse la inmunidad humoral, se modifica la inmunidad celular debido a la interacción de ambos procesos lo cual lleva a un aumento en la susceptibilidad a infecciones por organismos oportunistas (p.e. neumococos) que en un tiempo fueron causa principal de muerte en SN.

b) **Alteración del metabolismo de calcio y hueso:** Debido a la pérdida por orina de metabolitos de la vitamina D, se reduce la absorción intestinal de calcio, lo cual provoca un aumento de PTH en sangre. Esta anomalía tiene un impacto negativo sobre el esqueleto.

c) **Alteración en la coagulación:** Cambios profundos ocurren en SN en las proteínas concernientes con la

iniciación de la coagulación y fibrinólisis. Estos defectos surgen a causa de alteraciones generales en síntesis, cambio y pérdida en la orina que afecta muchas proteínas.

d) Deficiencia de elementos traza: Niveles bajos de metales como cobre, hierro y zinc se presentan en SN, debido en gran parte a la pérdida por orina de sus proteínas acarreadoras (ceruloplasmina, transferrina y albúmina).

Los modelos experimentales usados para estudiar el SN son los producidos por la inyección de:

- a) Suero antirriñón
- b) Aminonucleósido de puromicina (ANP)
- c) Adriamicina
- d) Daunomicina

El modelo más comúnmente usado es el de ratas inducido por la inyección de ANP. En este modelo experimental se ha descrito ampliamente muchas alteraciones bioquímicas y morfológicas, incluyendo microscopía electrónica. Las lesiones renales son muy similares a las descritas en humanos.

Se han descrito dos variantes de la nefrosis inducida por ANP: el modelo agudo y el modelo crónico (5).

El modelo agudo se induce por múltiples inyecciones subcutáneas o por una inyección intravenosa de 50 a 150 mg/Kg de peso corporal total, y da como resultado una proteinuria masiva y SN al término de 7 a 14 días. Después de 3 semanas la proteinuria disminuye y desaparece a las 5

6 6 semanas, por lo que es un modelo reversible. El modelo crónico es inducido por inyecciones repetidas de dosis bajas (5 mg/100 g de peso corporal) y se encuentra asociado a proteinuria crónica y daño irreversible.

El ANP, cuyo nombre genérico es el 6-dimetilaminopurina, 3-amino-d-ribosa, es un potente fármaco nefrotóxico. Es producido por la hidrólisis del residuo p-metoxitirosil que se encuentra unido al grupo amino del residuo aminorribosa del antibiótico puromicina y está relacionado estructuralmente a la adenosina (Fig. 2). Cuando se acetila el grupo amino del residuo aminorribosa pierde su nefrotoxicidad y se excreta sin cambio en la orina. No se metaboliza in vivo ni in vitro. Aparentemente es el grupo amino (NH_2) libre del nucleósido, el que le confiere la potencia como agente nefrotóxico (6).

Hasta ahora, el mecanismo por el cual el ANP produce daño renal se desconoce, pero hay evidencia que el metabolismo del ANP es indispensable para producir el daño renal. Existen varias hipótesis para explicar el mecanismo de acción del ANP para producir proteinuria como la presencia de radicales libres, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido e hidroxilo, producidos durante el metabolismo del ANP.

El ANP produce una reducción en la densidad de carga de las células epiteliales debido a que se pierden sialoproteínas y heparán sulfato proteoglicanos que, como se sabe, participan de manera importante en la función de la filtración de proteínas plasmáticas aniónicas (7).

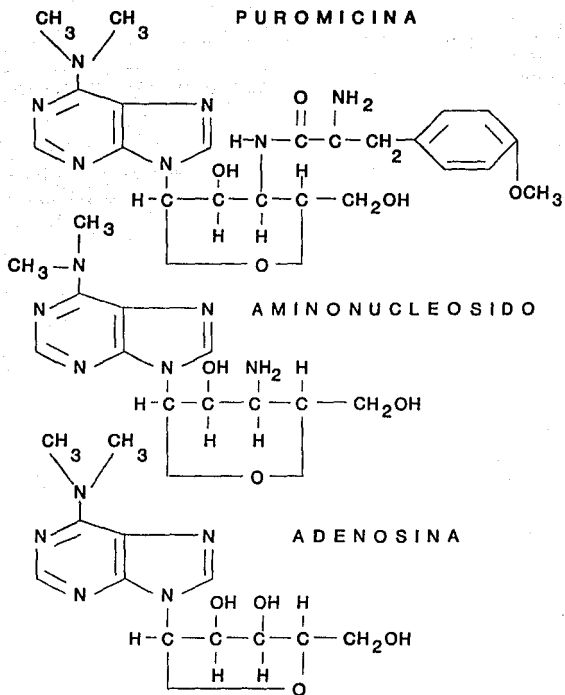


Fig. 2 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA PUROMICINA, EL AMINONUCLEOSIDO DE PUROMICINA Y LA ADENOSINA.

2. SISTEMA DE LA VITAMINA D

La vitamina D es adquirida en el organismo por la dieta en forma de 7-dihidrocolesterol que es transformado en pre-vitamina D (pre-vitD) por efecto de la luz ultravioleta (290-315 nm) en la piel, y posteriormente se lleva a cabo un proceso de isomerización convirtiéndose en vitamina D (vit D) (Fig. 3). En el hombre, este proceso ocurre durante los dos días posteriores al proceso de isomerización una vez que se adapta completamente a la temperatura del cuerpo (8). La vit D así formada, es transportada a la circulación a través de la proteína acopladora de vit D (DBP) en las siguientes 3 ó 4 horas, hasta llegar al hígado (9). Cada molécula de DBP tiene un sitio de unión específica para vit D y sus metabolitos (10). Sin embargo, la DBP no parece ser la responsable de transportarla a los órganos blancos, en donde puede ser metabolizados o pueden ejercer su acción biológica (11).

En el hígado es hidroxilada en el carbón 25 para producir 25-hidroxivitamina D (25-OHD). Se cree que esta hidroxilación ocurre tanto en la mitocondria como en la fracción microsomal, y requiere de NADPH, iones magnesio y oxígeno molecular para llevarse a cabo.

La vida media de 25-OHD en la circulación es de 2 a 3 semanas, con una actividad dos o tres veces más potente que su precursor, la vit D. Sin embargo, es inerte biológicamente y por ello necesita ser hidroxilada nuevamente en el riñón.

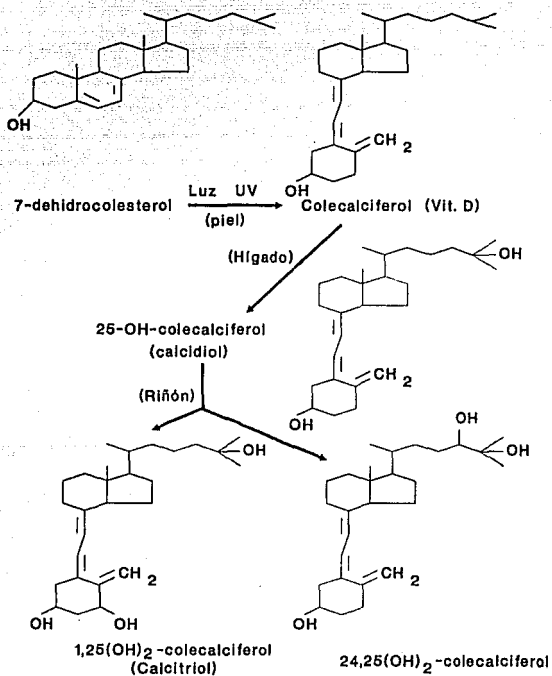


Fig. 3 Conversión de 7-dehidrocolesterol en vitamina D activada mediante la luz ultravioleta (UV) y por el hígado y el riñón.

En el hombre como en los animales, el sitio principal (si no el único) del metabolismo de 25-OHD a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, es el riñón. La enzima responsable de esta última hidroxilación es la 1 alfa-25-hidroxilasa, que es una citocromo oxidasa P-450 mitocondrial que requiere NADPH y oxígeno molecular para ser activada (12).

La 1 alfa-25-hidroxilasa se localiza en el túbulo contorneado y en la parte recta del túbulo proximal. La enzima localizada en el túbulo contorneado es exclusivamente estimulada por la hormona paratiroidea (PTH), mientras que la presente en la parte recta responde solamente a calcitonina (CT).

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es aproximadamente 10 veces más potente que la vit D en favorecer el transporte intestinal de calcio y su movilización del hueso. En la actualidad se considera que $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es la responsable de la acción biológica de vit D. La vida media de este metabolito en la circulación es de aproximadamente 6 horas.

2a.MECANISMO DE ACCION DE LA VITAMINA D: Efecto biológico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en intestino y hueso. La vitamina D es una de las hormonas que se encargan de regular la homeostasis de calcio, así como de mantener el recambio esquelético e indirectamente favorecer la mineralización del osteoide. Aunque $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no parece tener una acción directa sobre la calcificación ósea, favorece la movilización de calcio del hueso, aumentando el número de osteoclastos y por consiguiente la actividad osteoclastica (13,14). La

deficiencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aumenta el tejido osteoide (matriz ósea no mineralizada), defecto conocido como raquitismo en los niños y osteomalacia en el adulto. Es evidente que hay receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ presentes en los osteoblastos, pero no así en los osteoclastos, lo que permite pensar que las células blanco para el metabolismo activo de la vit D son los osteoblastos.

Por otro lado, los osteoclastos son células multinucleadas con actividad ósea resorptiva, que se forman a partir de la diferenciación y fusión de los osteoclastos progenitores mononucleares derivados a su vez de las células hematopoyéticas. Cuando se administra $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a animales deficientes de vit D la resorción ósea osteoclastica aumenta, de igual manera el número de osteoclastos. Dos mecanismos diferentes inducen la resorción osteoclastica: la activación de los osteoclastos depositados y la formación de nuevos osteoclastos. Este proceso involucra liberación de enzimas lisosomales, cambio en el tamaño y el área del núcleo y en la membrana limitrofe; hay inhibición de la colágena ósea y el efecto es paralelo a la resorción a nivel del periostio (15).

A nivel intestinal, el papel principal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es favorecer la absorción de calcio en el intestino delgado, particularmente en el duodeno, suprimir la secreción de PTH posiblemente directa o indirectamente vía el aumento de la concentración de calcio en la circulación. De esa manera provee de suficiente calcio a la matriz ósea de nueva forma.

A nivel celular, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tiene acción directa sobre las concentraciones de calcio, facilitando el transporte y la absorción de éste en la membrana basolateral renal.

Muchas otras proteínas parecen estar reguladas por la presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en las células óseas. Tal es el caso de la osteocalcina, proteína producida por los osteoblastos y que tiene un papel importante en el proceso de mineralización (16). Esta proteína contiene tres residuos de aminoácidos del ácido carboxiglutámico y representa el 3 % del total de la proteína ósea. Por otro lado, la disminución de uno o más de los metabolitos de la vit D origina un defecto en la absorción intestinal de calcio y por lo tanto un aumento en la producción de PTH, cuyo resultado es favorecer la desmineralización ósea para compensar la pérdida de este ión (17).

2b. REGULACION Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D: efecto de la hormona paratiroidea (PTH). La PTH, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y la calcitonina se conocen como las hormonas reguladoras del metabolismo del calcio y fósforo. Sin embargo, la PTH está considerada como la más importante de las tres.

La PTH es una hormona polipeptídica de 84 aminoácidos, secretada por las glándulas paratiroides y que al entrar en la circulación se rompe en dos o más fragmentos, de los cuales, el amino terminal (NH_2) correspondiente al fragmento 1-34 es el único con actividad biológica. En el riñón, una de las principales funciones de PTH es aumentar la absorción de calcio y favorecer la excreción de fosfato

(18). Por otro lado estimula a la adenilato ciclasa, enzima localizada en el túbulo proximal, cuyo producto final es el adenosín-monofosfato cíclico (AMPC), segundo mensajero de acción de esta hormona. A su vez, la PTH responde ante cualquier disminución de calcio en la circulación, estimulando a la 1-alfa-25-hidroxilasa renal aumentando la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para favorecer la absorción de calcio en el intestino (Fig. 4).

Así mismo, un regulador importante de la 1-alfa-25-hidroxilasa es el propio metabolito activo. En general, cuando una enzima se suprime, la 24R-25-hidroxilasa renal se estimula. De hecho, la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en sangre estimula a la 24R-25-hidroxilasa, aumentando la producción de $24,25(\text{OH})_2\text{D}$. Sin embargo, los mecanismos moleculares del estímulo y la regulación de estas hidroxilasas no están muy claras.

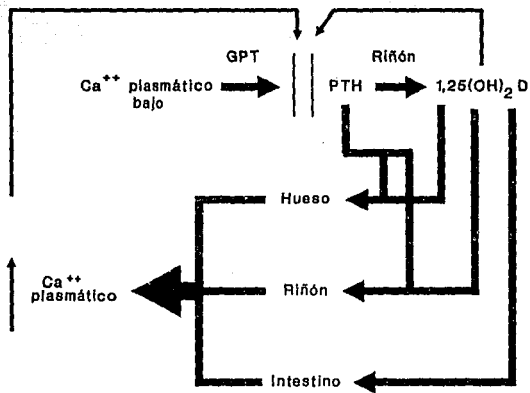


Fig. 4 Representación del sistema endócrino de la vitamina D y su interacción con la hormona paratiroidea en la regulación de la concentración de calcio plasmático. GPT= glándulas paratiroides. (Kidney Int 1990;38:2-8)

3. MARCADORES BIOQUIMICOS DEL METABOLISMO OSEO

Tanto el crecimiento, el remodelamiento y la reparación se requieren para el desarrollo y mantenimiento del sistema esquelético. El crecimiento involucra un incremento en la masa, y el remodelamiento describe alteración en la forma.

Los osteoblastos son las células responsables de la formación de hueso nuevo, y osteoclastos, las células responsables de la resorción. Los osteocitos se derivan de los osteoblastos, pero su función no se ha establecido aún, probablemente involucra la homeostasis del calcio y destrucción de células óseas comparada a la osteoclastosis. El término remodelamiento o renovación se refiere al proceso secuencial de resorción y formación que mantiene la homeostasa mineral. En hombres normales este ciclo de remodelamiento tarda aproximadamente 3 meses. Los osteoclastos y osteoblastos, que son responsables del remodelamiento, parecen estar anatómicamente acoplados en equilibrio (19).

El hueso es un tejido complejo y está constantemente en proceso de remodelamiento, lo cual involucra a muchas sustancias así como a diferentes factores. En teoría, la determinación de la concentración en sangre de estas sustancias o marcadores bioquímicos permiten tener una mejor idea del metabolismo óseo.

Actualmente se cuenta con una serie de marcadores de la actividad ósea metabólica divididos en dos grupos principales: aquellos que permiten detectar la actividad

TABLA 1. MARCADORES BIOQUIMICOS DEL REMODELAMIENTO OSEO

FORMACION	RESORCION
SUERO O PLASMA	PLASMA
Fosfatasa alcalina total y ósea	Fosfatasa ácida tartrato-resistente
Osteocalcina o proteína GLA	Ac. gamma-carboxiglutámico libre
Péptidos de procolágena I	
	ORINA
	Hidroxiprolina total
	Glucósidos de Hidroxilisina
	Enlaces de piridinolina

osteoblástica (formación) y los que detectan la actividad osteoclástica (resorción) (Tabla 1). Debe tenerse en cuenta también, que en las enfermedades donde ambos procesos se llevan a cabo, existe un balance que refleja el metabolismo óseo. A su vez, estos marcadores se ven influenciados por otros factores, tales como el remodelamiento esquelético y la depuración metabólica, los cuales deben compararse con mediciones directas de la formación y la resorción ósea como por ejemplo, la histomorfometría, el contenido mineral y la densidad ósea para tener validéz clínica.

La fosfatasa alcalina, la excreción urinaria de hidroxiprolina y la osteocalcina (proteína GLA) son los 3 marcadores del metabolismo óseo más comúnmente usados, cuya determinación permite estimar la escala de mineralización y resorción ósea.

Debido a que el hueso es rico en fosfatasa alcalina (FA) la cual se encuentra en los osteoblastos, su determinación

se ha utilizado como marcador de la formación osteoblástica, aún a pesar de considerarse el menos sensible y específico de los marcadores bioquímicos. En varios estudios se ha demostrado un aumento de la actividad de FA con la edad en mujeres postmenopáusicas, en pacientes con osteoporosis, en la enfermedad de Paget y post tratamiento con calcitonina o difosfatos y en el caso de recaídas (20).

Un aumento significativo en los niveles de FA se presenta en los pacientes con osteodistrofia renal, hiperparatiroidismo primario y secundario, hipertiroidismo, metástasis ósea, osteomalacia y durante el restablecimiento de fracturas óseas. A pesar de ello y debido a que en algunos casos el aumento es ligero, el apoyo que puede dar a la interpretación clínica es poco.

La hidroxiprolina (OHPr) total es un buen indicador de la resorción ósea. Los niveles de OHPr en la orina representan cerca del 90 % de la OHPr liberada a partir de la degradación de la colágena de varios tejidos. Principalmente durante el remodelamiento esquelético es excretada a la circulación en su forma libre, filtrada y resorbida casi totalmente por el riñón. Cerca del 10 % de la OHPr es liberada en forma de péptidos los cuales son ricos en OHPr filtrados y excretados en la orina finalmente. Parece ser que estos péptidos son derivados de la síntesis de la colágena de novo, por lo cual se les considera no filtrables, marcadores de osteoformación y no de resorción.

En la mayoría de los estudios se ha determinado la OHPr total, la cual refleja principalmente la resorción ósea. Los niveles de OHPr en la orina reflejan el remodelamiento del esqueleto pero también de las proteínas, siendo las proteínas de tipo no colágeno las que constituyen del 5 al 10 % de esta fase orgánica. En plasma, la OHPr circula en varias formas: unida a proteínas, a péptidos y en forma libre; sin embargo, sus niveles son muy bajos y a su vez no resulta ser un índice lo suficientemente sensible del metabolismo óseo, quedando restringida su utilidad a la determinación de los niveles de OHPr excretada en la orina (20).

Teóricamente la determinación de osteocalcina es un arma útil para evaluar la mineralización ósea y parece no tener las limitaciones que presenta la determinación de FA (21) o la determinación en orina de OHPr, parámetros usados comúnmente como índices del recambio esquelético. En el caso de FA sérica es una mezcla de las isoenzimas provenientes de hueso, hígado, gastrointestinal o de pulmón. Más aún, los diferentes factores que afectan la degradación de FA no están totalmente claros. En el caso de OHPr, la deteminación colorimétrica no es suficientemente sensible para utilizarla como marcador de la resorción ósea. Refleja la ingesta en la dieta de gelatina y al mismo tiempo el recambio de la colágena y no de la matriz ósea. Una porción de la OHPr presente en la orina se deriva de los péptidos relacionados con la síntesis de la colágena

ósea y mucha de la OHPr que contiene péptidos se libera durante la degradación de la colágena, y son metabolizados, por ello no aparecen en la orina.

La osteocalcina (OC) o proteína GLA es un polipéptido de cadena sencilla con un peso molecular de 58 Kdaltones en donde los aminoácidos contienen tres residuos de la vitamina K (el ácido alfa gammacarboxiglutámico) en las posiciones 17, 21 y 24. Estos residuos impiden que la proteína se una al calcio que es el principal constituyente de la fase mineral del hueso. La OC resulta ser la proteína más abundantes de tipo no colágena que se sintetiza en los osteoblastos resultando ser un marcador específico del remodelamiento y formación ósea.

Los niveles de OC se encuentran elevados en una variedad de enfermedades metabólicas. En la rata, los niveles de OC se depuran principalmente por filtración renal y se ha visto que su aumento en la circulación es hasta 8 veces más, después de 4 horas post nefrectomía (22). Sin embargo, esto no significa que en pacientes con función renal baja, el aumento de OC pudiera reflejar un aumento de la masa ósea o una disminución de la depuración renal, o ambos. La OC correlaciona muy bien con el crecimiento longitudinal del hueso en el metacarpio y a nivel de la metáfisis, posiblemente porque refleja la actividad osteoblástica, proceso que ocurre durante la osificación endocondrial.

4. DENSITOMETRIA ÓSEA (BMD) Y CONTENIDO MINERAL ÓSEO (BMC):

El análisis mineral óseo juega un importante papel en la detección y manejo de pacientes con enfermedades del metabolismo óseo. La medición precisa, que puede detectar cambios graduales de densidad ósea en un tiempo corto, son requeridos para determinar el tratamiento eficaz y apropiado para el paciente (23).

La masa ósea puede medirse de manera exacta, precisa y sin riesgo mediante varios métodos (Tabla 2) (24,25).

Todos estos métodos calculan la masa ósea con base en la absorción por fotones del tejido, utilizando radionúclidos o un tubo de rayos X.

Los métodos de energía de doble fotón se desarrollaron hace pocos años y se han empleado en la medición de sitios axiales como la espina dorsal y la cadera, donde hay una gran cantidad y variedad de tejidos óseos. Hasta hace poco, los radionúclidos fueron la fuente de fotones empleadas en estos métodos, sin embargo, la utilización de los tubos de rayos X los han sustituido debido al aumento en la precisión y a la disminución del tiempo de conteo. La cuantificación de la masa ósea se expresa en función del contenido mineral (gramos) o en unidades de masa corregidas por el área cuantificada (gramos/cm²).

La densitometría ósea resulta ser un arma útil para detectar e identificar aquellos pacientes que cursan con disminución de la masa ósea. En el hiperparatiroidismo

TABLA 2. TECNICAS PARA MEDIR LA DENSIDAD DE LA MASA OSEA

TECNICA	Coeficiente de Variación (%)	
	PRECISION	EXACTITUD
Densitometría de un sólo fotón	2 - 3	5
Densitometría de doble fotón	2 - 4	4 - 10
Densitometría de doble fotón- Rayos X	1 - 2	3 - 5
Tomografía computarizada	2 - 5	5 - 20

secundario a enfermedad renal o a mala absorción intestinal, resulta ser de gran utilidad la cuantificación de la masa ósea (26).

ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

Se ha demostrado que los pacientes con SN presentan hipocalcemia, hipocalciuria, disminución de la absorción intestinal de calcio, aumento de PTH, osteomalacia y/o hiperparatiroidismo (17,27). A pesar de que al principio la hipocalcemia se atribuía a la hipoalbuminemia, al estudiar los niveles de calcio ionizado (27,28) se observó que estaban disminuídos. De manera similar se encontró que los metabolitos de la vitamina D en sangre estaban también bajos (17,27,28,29). Al encontrarse en orina niveles detectables de los metabolitos de la vitamina D, se pensó que la disminución en sangre se debía a su excreción en orina al ser acarreados por la proteína transportadora de vitamina D (29). Posteriormente se encontró que el metabolito biológicamente activo de vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ también estaba disminuído (30), aunque no en todos los casos (31).

Estos hallazgos han atraído la atención de los investigadores en relación al metabolismo de calcio y la vitamina D en el SN y su impacto sobre el esqueleto (31,32); sin embargo la información que se tiene es aún controvertida.

Aunque la mayoría de los estudios muestran que los niveles de 25-OHD están disminuídos, no es así con respecto a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Algunos investigadores lo atribuyen a que los métodos para medir $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ detectan tanto la fracción libre como la unida y es por ello que resulta

difícil llegar a una conclusión más concreta, sobre todo si son los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ libre los que tienen importancia fisiológica (33). Una situación similar se presenta al relacionar los niveles de PTH y calcio ionizado en estos pacientes (34).

Por consiguiente, el estudio del sistema de la vitamina D y del metabolismo mineral, así como el impacto que estas alteraciones tienen en el esqueleto, resultan ser de gran importancia para conocer mejor la fisiopatología del SN.

En ratas con SN inducido con suero nefrotóxico hay disminución de los metabolitos de la vitamina D y aumento en la excreción urinaria de la DBP (35). Sin embargo, se desconoce cuáles son las alteraciones del sistema de la vitamina D y del metabolismo mineral en el SN inducido con ANP y, las consecuencias que esto pueda tener en el esqueleto.

HIPOTESIS

III. HIPOTESIS

En el síndrome nefrótico inducido con aminonucleosido de puromicina se encuentran alterados los niveles de los marcadores bioquímicos óseos, la densidad ósea y el contenido mineral; estabilizándose a sus niveles normales al final del estudio.

OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

1.- Evaluar los niveles de los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo y su impacto en el esqueleto en ratas con síndrome nefrótico inducido con aminonucleosido de puromicina, midiendo:

- Concentración sérica de 25-OHD, $1,25(OH)_2D$, calcio ionizado, PTH, osteocalcina, fosfatasa alcalina y proteínas.
- Concentración urinaria de hidroxiprolina , proteínas y AMPc.
- Contenido mineral y densidad ósea total de los fémur.

2.- Evaluar si el daño óseo presente es reversible.

**M A T E R I A L E S Y
M E T O D O S**

V. MATERIALES Y METODOS

1.- REACTIVOS

- 1a,25-dihidroxi[26,27metil-³H]colecalciferol y 25-hidroxi-26(27)metil-³H]colecalciferol [Amersham, Co. U.K.].
- Estándar de hidroxil-L-prolina, Aminonucleósido de puromicina y 3',5'-AMP cíclico [Sigma Chemical].
- Kit de PTH [INCSTAR U.S.].
- Kit de fosfatasa alcalina [Boehringer].
- Reactivos para RIA de osteocalcina en rata [Biomedical Technologies Inc.].
- Estándar de 25-OHD [Upjohn de México S.A. de C.V.].
- Estándar de 1,25(OH)₂D [Hoffman-La Roche].
- Receptor de pollo [Yamasa Shoyu Co. Choshi Japan].
- [¹²⁵I-Met]AMPc [INNSZ depto. Nefrología, México D.F.].
- El p-dimetilbenzaldehído, el tolueno, la cloramina-T, el nitrógeno gaseoso, el carbón activado, el dextrán y el líquido de centelleo se compraron en casas comerciales y fueron de alta pureza.

2.-EQUIPO DE LABORATORIO

- Baño de agua y aceite
- Espectrofotómetro ZEISS PMQ II
- Pipetas automáticas "Gilson" de 200 y 1000 microlitros con puntas desechables
- Electrodo para calcio ionizado de Radiometer Lab.
- Centrífuga refrigerada Damon IEC División PR 6000
- Equipo de extracción con vacío

- Contador beta (Packard Instruments)
- Contador automático gamma MAC II Micromedics Instruments.
- Densitómetro Hologic QDR-1000 & 1000/W
- Jaulas metabólicas para ratas

3.- DISEÑO EXPERIMENTAL: En este trabajo se usaron 80 ratas macho Wistar de 120 a 150 g de peso, 40 controles y 40 nefróticas. El SN se indujo con una inyección subcutánea única de ANP (15 mg/100 g de peso) (3). El ANP se preparó al 2 % en solución salina al 0.9 %. A las ratas control se les inyectó el mismo volumen de solución salina.

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas y se sacrificaron por decapitación, recolectando la sangre y la orina de 24 horas. Los días de sacrificio fueron 2, 6, 12 y 26 posteriores a la inyección de ANP. La muestra de orina se centrifugó a temperatura ambiente y se decantó en un tubo cónico graduado en mL. Una vez medido el volumen, una alícuota de orina se separó y se congeló a -20°C. Los fémures se disecaron y se colocaron en frasquitos con formol y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su medición.

Se determinó la concentración en suero de proteínas totales y fosfatasa alcalina por colorimetría; calcio ionizado por electrodo de ión selectivo; OC y PTH por radioinmunoanálisis; 25-OHD y 1,25(OH)₂D por acoplamiento a la proteína acarreadora y al receptor, respectivamente. En orina, se determinó por colorimetría, proteínas totales e hidroxiprolina y AMPc por radioinmunoanálisis.

En hueso se determinó por densitometría de doble foto el contenido mineral total (BMC-T) y la densidad de la masa ósea total (MBD-T) mediante un densitómetro Hologic QDR-1000.

4.- DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES: Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry (36), en el cual las proteínas y los péptidos, al contrario de otros compuestos nitrogenados como la urea, la creatinina, el ácido úrico, etc., forman en solución alcalina un complejo de color violeta con los iones cobre. La reacción requiere de dos enlaces peptídicos para llevarse a cabo. Se prepararon las siguientes soluciones:

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

Solución B. Sulfato de cobre al 0.5 %.

Solución C. 50 ml de solución A más 1 ml de solución B (se prepara al momento de usarse).

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

Solución E. Albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 mg/ mL. Se prepara una curva patrón con esta solución de 5 a 50 µg.

La solución de albúmina o la muestra se colocan en un volumen final de 0.2 mL, a todos los tubos se les agrega 1 mL de solución C, se agitan y se dejan reposar 10 minutos, después se les agrega 0.1 mL de solución D mientras se están agitando vigorosamente, después de 30 minutos se lee la densidad óptica a 660 nm.

Antes de cuantificar las proteínas urinarias, estas recibieron el siguiente tratamiento: se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético (ATA) al 10 %, mezclando 0.1 mL de orina y 1.9 mL de ATA, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos, se decantó y se volvió a repetir esta misma operación 2 ó 3 veces, hasta que el sobrenadante quede transparente, finalmente se decantó y el precipitado se resuspendió en 2 ml de NaOH 0.1 M.

A los sueros se les hizo una dilución 1:400, de esta dilución se tomaron 0.2 mL para cuantificar proteínas. Los resultados de proteínas en orina se expresan en mg/24 h y en suero se expresan en mg/dL.

5.- DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA(OHPr) (37): La OHPr, aminoácido que se libera al degradarse la colágena ósea, se determina en orina, previa hidrólisis de la muestra. El complejo formado es oxidado a pirrol por acción de la cloramina T y posteriormente se une al p-dimetilaminobenzaldehído. La interferencia por cromóforos se elimina mediante una reacción ácido-base. La OHPr se extrae con tolueno y ácido clorhídrico.

Se preparan los siguientes reactivos:

a.- Reactivo de Ehrlich's: p-dimetilaminobenzaldehído 12.5 g disuelto en 13.5 mL de HCl concentrado y 80 mL de 2-propanol (esta solución se prepara el mismo día).

b.- Amortiguador de Acetato-citrato (pH 6.0): acetato de sodio; 3 H₂O (57 g), citrato trisódico; 2 H₂O (37.5 g) y ácido cítrico (5.5 g) se disuelve en agua a un volumen de 1

litro.

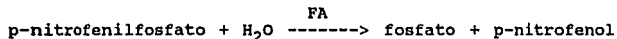
c.- Cloramina T: 0.7 g de cloramina T en 10 mL de agua, y se hace una dilución 1:5 en amortiguador acetato-citrato.

d.- Hidroxi-L-prolina: Los estándares se preparan en un rango de 6.25 - 100 mg/L con agua y se almacenan a -5°C.

Se pipetea 0.2 mL de orina con 1 mL de hidróxido de bario sobresaturado en tubos de 13 X 100 con tapa de rosca, se incuban en un baño de aceite a 105°C por 16 horas para realizar la hidrólisis.

La muestra hidrolizada se enfría a temperatura ambiente, se adiciona 0.5 mL de HCl 1 M, 1 mL de amortiguador de boratos (0.1 M, pH 9.1) y 0.25 mL de solución de cloramina T. La oxidación toma 25 minutos a temperatura ambiente, después se agregan 1 mL de reactivo de Ehrlich's. Se mezcla y se incuba a 60°C por 15 minutos, se enfría y se agrega 0.5 mL de NaOH 6 M y 3 mL de tolueno; se agitan y se colocan en un rotor mezclador por 10 minutos (20-30 rev/min), se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos. Se transfieren 2 mL de la fase orgánica en otro tubo de 13 X 100 que contiene 2 mL de HCl 0.003 M. Se mezcla por 1 segundo y se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos. La fase de tolueno se elimina y la fase acuosa se lee en un espectrofotómetro a 550 nm. La concentración de OHPr se obtiene de la curva estándar (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 mg/L) que se corre simultáneamente con las muestras. El resultado final se expresa en mg de OHPr/mg de creatinina excretada en la orina.

6.- DETERMINACION DE FOSFATASA ALCALINA(FA)(38): Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. Para determinar la FA se utiliza como sustrato el p-nitrofenilfosfato. La variación observada en el valor de extinción por unidad de tiempo es proporcional a la velocidad de transformación del sustrato y, por lo tanto a la actividad enzimática.



Reactivos:

Frasco 1: Amortiguador dietanolamina 1 M y MgCl_2 0.5 mM, pH 9.8.

Frasco 2: p-nitrofenilfosfato 10 mM.

Se disuelve una tableta del frasco 2 con 3 mL del frasco 1. Se lleva la solución a temperatura de medición antes del uso. Se agregan 0.05 mL de muestra, se mezcla y se vierte inmediatamente en la celda de 1 cm. Se toma la lectura inicial a 405 nm y se dispara simultáneamente el cronómetro. Se repiten las lecturas exactamente 1, 2 y 3 minutos después. Se determina el cambio de extinción promedio por minuto (E_{405}/min) y se usa para el cálculo.

Cálculo: Los valores para la actividad de la fosfatasa alcalina en el suero se toman de la tabla o se calculan como sigue $E_{405} \text{ nm}/\text{min} \times 3300 = \text{U/L}$.

7.- DETERMINACION DE HORMONA PARATIROIDEA (PTH)(39): Se determina por radioinmunoanálisis (RIA) PTH-MM (molécula media) de INCSTAR, es un procedimiento de desequilibrio que utiliza un anticuerpo de pollo contra PTH-MM y una hPTH[Tyr

43j44-68 marcado con ^{125}I que entra en competencia con la PTH-MM del suero. Las separaciones de fases se efectua en 15 minutos agregando en una sola etapa un complejo precipitante de segundo anticuerpo, un portador y polietilenglicol.

- Se reconstituyen los reactivos liofilizados con agua desionizada y se agitan suavemente.

- Se marcan tubos de 12 X 75 según se indica en el protocolo de la Tabla 3. Los reactivos se van agregando según el protocolo (todos los volúmenes están expresados en microlitros) y con los tiempos respectivos.

- Los tubos se cuentan en un contador de radiaciones gamma y las concentraciones de las muestras problema se calculan de la siguiente manera: sacando la media de todas las cuentas por minuto (cpm) para cada patrón, control, NSB y muestras problemas se usa la siguiente fórmula para sacar la relación B/Bo (%):

$$B/Bo (\%) = \frac{\text{cpm del estándar o muestra} - \text{cpm del NSB}}{\text{cpm del patrón 0} - \text{cpm del NSB}} \times 100$$

- Se representa gráficamente el porcentaje B/Bo de los estándares de PTH-MM de rata (eje vertical) contra la concentración (eje horizontal) en papel graficador de tres ciclos semilogarítmico o papel log-logit.

- Se dibuja la línea que mejor se ajusta a los puntos.

- Se interpolan los niveles de PTH-MM de las muestras problemas, estas se expresan en picogramos/mL.

TABLA 3
DETERMINACION DE PTH

	Cuentas totales	Unión inespecifica	Estándares de PTH en pmol/L								Muestras problemas		
			0	A	B	C	D	E	F	1	2	3	
Número de tubo	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22	23-24	
Estándar 0		100	100										
Estándar				100	100	100	100	100	100				
Muestra										100	100	100	
Anticuerpo			← 200µL →										
			Vortex. Incubar 15 minutos de 20-25°C.										
¹²⁵ I PTH-MM			← 200µL →										
			Vortex. Incubar 2 horas de 20-25°C.										
Agente precipitante			← 500µL →										
			Vortex. Incubar 15 minutos de 20-25°C										
			Centrifugar a 2500 rpm/20 minutos y decantar el sobrenadante										
			Contar los tubos por 60 segundos										

NOTA: Todos los volúmenes están expresados en microlitros.

**NO
EXISTE
PAGINA**

agitación.

Día 2.- Adicionar 100 μ L de [125 I] Osteocalcina de rata a cada tubo incluyendo a los CT. Agitar cada tubo e incubar toda la noche a 4°C.

Día 3.- Adicionar 1 mL del segundo anticuerpo a cada tubo excepto a los CT agitar e incubar 2 horas a 4°C en agitación. Centrifugar a 2500 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se desecha y se cuenta el precipitado en un contador gamma por 2 minutos.

Los cálculos son igual al de la PTH, solo que los resultados se expresan en ng/mL.

9.- DETERMINACION DE 1,25(OH) $_2$ D (41): En este método se usa un receptor citosólico aislado del duodeno del pollo y específico para 1,25(OH) $_2$ D; involucra una extracción previa y purificación subsecuente del suero. La cuantificación se realiza usando un ensayo de desequilibrio competitivo. La separación de la hormona libre y unida se lleva a cabo con carbón-dextrán.

A 1 mL de suero se le agrega 50 μ L de 1,25(OH) $_2$ D tritiada (\approx 2,000 desintegraciones por minuto {dpm}) y en un frasquito de centelleo se agregan los mismos 50 μ L del trazador con 5 mL de líquido de centelleo para el cálculo de recuperación. Se adiciona 1 mL de acetonitrilo a cada muestra, se agita y se centrifuga a 2500 rpm por 10 minutos. Las muestra se pasa a través de un cartucho de sílica SEP-PAK, lo filtrado se seca bajo atmósfera de nitrógeno. La separación final de este metabolito se

efectua por cromatografía líquida de alta resolución empleando como fase líquida una mezcla de Hexano-Isopropanol (90:10) y con un flujo de 1 mL/min.

El metabolito ya separado se lleva a sequedad en atmósfera de nitrógeno y se reconstituye en 200 μ L de etanol bidestilado, de donde se toman 50 μ L para determinar recuperación y otros 50 μ L para el ensayo.

El ensayo para determinar la 1,25(OH)₂D se realiza según el protocolo de la Tabla 4. Los reactivos que se preparan son los siguientes:

Amortiguador I: Fosfato de potasio 0.05 M conteniendo KCl 0.3 M, pH 7.4.

Amortiguador II: Fosfato de sodio 0.05 M, pH 7.5.

1 α ,25-dihidroxi[23,24(n)-³H] colecalciferol (5000 cpm).

Receptor: A un frasco que contiene 25 mg de proteínas, se le adicionan 50 mL de amortiguador I.

Carbón-Dextrán: 1 g de carbón activado y 0.1 g de Dextran T-150, se les adicionan 190 mL de amortiguador II. Se sonica por 10 minutos y se afora a 200 mL; se almacena en refrigeración.

Los estándares empleados son: 4, 8, 16, 32, 64 y 128 pg de 1,25(OH)₂D/50 μ L de etanol.

Se transfiere 1 mL del sobrenadante a un frasco de centelleo, se le adiciona 5 mL de líquido de centelleo y se cuenta en un contador de radiaciones beta por un minuto.

Cálculos: se leen los frascos para recuperación y se les resta a todos lo del blanco y se saca el % de recuperación con respecto a lo que marque las cuentas

TABLA 4
DETERMINACION DE 1,25(OH)2D

Número de tubo	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	
Adicionar	cuentas totales		Unión inespecifica	0	Estándares en pg/mL							Muestras		
					I	II	III	IV	V	VI	VII	1	2	3
[³ H]1,25(OH) ₂ D	50µL →													
Etanol 99.5%	50µL →													
Estándar o muestra				50µL →										
Receptor	1 mL			1 mL →										
Amortiguador I			1 mL											
Agitar, incubar a 25°C por 1 hora en agitación														
Carbón-Dextran			250µL →											
Amortiguador II	250µL													
Agitar e incubar por 30 minutos en hielo														
Centrifugar a 2500 rpm/10 minutos a 4°C														
Determinar la radiactividad de 1 mL del sobrenadante														

totales.

Los frascos del ensayo se leen y se les saca el valor medio a todos los tubos y se sustituye en la siguiente fórmula:

$$B/T(\%) = \frac{\text{radiactivo unido (tubo 5 en adelante) - blanco}}{\text{cuentas totales (tubo 1-2) - blanco}} \times 100$$

Se representa gráficamente el B/T(%) de los estándares de 1,25(OH)₂D (eje vertical) y la concentración (eje horizontal) en papel semilogarítmico o papel log-logit. Se dibuja la línea que mejor se ajuste a los puntos y se interpolan los niveles de las muestras en la gráfica. La concentración obtenida se corrige con el % de recuperación y se expresa en pg/mL.

10.- DETERMINACION DE 25-OHD: Se basa en un ensayo de equilibrio competitivo sobre una proteína acarreadora de suero humano específica para 25-OHD y una separación de las fases con carbón-dextrán.

A 0.25 mL de suero se le agregan 2000 cpm [³H]25-OHD en 50 µL de etanol, 2.75 mL de solución salina 0.9% (dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente) y 3 mL de acetonitrilo grado HPLC. Agitar por 30 segundos y centrifugar a 2500 rpm/15 minutos a 4°C.

Se aplica el sobrenadante al cartucho de sílica C18 (previamente activado), se lava el tubo con 1 mL de solución salina y se eluye con: 3 mL de metanol:agua (65:35) que se desechan y 3 mL de acetonitrilo grado HPLC que se colectan en un tubo de 13 X 100 mm, el cual se lleva

TABLA 5
DETERMINACION DE 25-OHD

Número de tubo	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22...		
Adicionar	Cuentas totales	Blanco	0	Estándares en ng/mL						Muestras			
				0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00	12.00	1	2	3
Etanol 99.8%	50µL →												
Estándar o muestra				50µL →									
³ H]25-OHD	50µL →												
Proteína acarreadora				1 mL →									
	Incubar 60 minutos a 4°C en la oscuridad												
Carbón-Dextran				0.250 mL →									
	Vortex. Incubar 15 minutos a 4°C en la oscuridad												
	Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm a 4°C												
	Tomar 1 mL del sobrenadante en un vial • 5 mL de líquido de centelleo												

a sequedad con nitrógeno a 25°C. Se resuspende en 500 µL de etanol bidestilado y se toman 250 µL para calcular el % de recuperación en un frasco de centelleo con 5 mL de líquido de centelleo; y 100 µL para cuantificar (50 µL por duplicado en tubos borosilicados).

Los tubos se marcan y los reactivos se agregan según se muestra en el protocolo de la Tabla 5.

11.- DETERMINACION DE CALCIO IONIZADO: Los electrodos para calcio estan basados en intercambiadores iónicos de tipo fosfato o transportadores neutros. Con este método se mide la fracción ionizada, no fijada, no complejada del calcio. Esta asociación es dependientes del pH y la temperatura.

El calcio ionizado se mide en suero mediante un electrodo de ion selectivo [Radiometer Lab., (Copenhague)]. La muestra se debe mantener en atmósfera de CO₂ para evitar cambios en el pH. El equipo se calibra contra un estándar de calcio ionizado comercial con una concentración de 5 mg/dL; la concentración inicial de la muestra es corregida por el pH. El resultado se expresa en mg/dL a pH 7.4.

12.- DETERMINACION DE AMPC URINARIO (42): Se basa en la competencia en equilibrio entre AMPC marcado y AMPC de la muestra con un anticuerpo de conejo específica para AMPC; y la separación de la fase unida y libre mediante IgG y sulfato de amonio.

Tubos de 12 X 75 mm se marcan y se agregan los reactivos según el protocolo de la Tabla 6. El amortiguador empleado es el de Acetato de sodio 0.1 M a pH 6.2 y el sulfato de

TABLA 6
DETERMINACION DE AMPc URINARIO

	Cuentas totales	Unión Inespecífica	0	Estándares en nmol/mL								Muestras		
				0.15	0.31	0.62	1.25	2.5	5.00	10.0	10.0	1	2	3
Número de tubo	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22..			
Amortiguador		300µL	200µL	—————→							150µL	—————→		
Estándar o muestra			200µL —————→							50µL	—————→			
Anticuerpo			100µL —————→											
¹²⁵ I-AMPc	200µL —————→													
Vortex. Incubar a 4°C por 22 horas en agitación														
IgG		100µL —————→												
Sulfato de amonio		2.5 mL —————→												
Vortex. Centrifugar a 2500 rpm/20 minutos a 4°C														
Decantar el sobrenadante y contar el precipitado por 60 segundos														

amonio se prepara al 60 % de una solución sobresaturada.

El precipitado que queda en los tubos se cuentan en un contador gamma por 1 minuto y los cálculos se realizan igual que en la PTH.

13.- DETERMINACION DE LA DENSITOMETRIA OSEA (43): Se basa en la medición de la absorción relativa de dos diferentes energías, emitiendo rayos-X que pasan a través de la superficie corporal a estudiar. Los rayos-X son producidos por tubos de baja corriente, con cambios acelerados de voltage sincronizadamente con la mayor frecuencia.

Se empleó un densitómetro Hologic QDR-1000 y un colimador de alta resolución de 0.9 cm de diámetro integrado a un programa que calcula el contenido mineral total (g) y la densidad de la masa ósea (g/cm^2) (Fig. 5). Los fémures se disecaron y se colocaron en cajas Petri y se cubrieron con agua destilada para su medición a una línea de espacio de 0.0254 cm y una resolución de 0.0127 cm.

14.- ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados están expresados como el promedio desviación estándar del número de sujetos.

Los datos se analizaron por la prueba de Bartlett. Cuando las variancias fueron homegéneas, los datos de ambos grupos de ratas se analizaron por la prueba de t de Student no pareada; por el contrario si las variancias no fueron homogéneas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

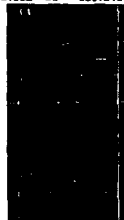
CHILDRENS' HOSPITAL C.R.C.

k = 1.379 AB = 190.8(1.006H)



Dec 9 10:07 1991 (125 x 142)
Hologic QDR-1000/W (S/N 076)
Ultra High V4.26

k = 1.382 AB = 189.2(1.006H)



Dec 9 11:26 1991 (125 x 141)
Hologic QDR-1000/W (S/N 076)
Ultra High V4.26

Z12899101 Mon Dec 9 09:50 1991
Name: Rat Femur
Comment: control 1 day 12
I.D.: Sex:
S.S.#: - - Ethnic:
ZIPCode: Height: cm
Scan Code: Weight: kg
BirthDate: / / Age:
Physician: SIERRA

TOTAL BMD CV FOR L1 - L4 1.0x

C.F. 0.999 1.068 1.000

Region	Area (cm ²)	BMC (grams)	BMD (gms/cm ²)
L1	0.3836	0.8546	0.1797
L2	0.0280	0.1241	0.1498
L3	0.1010	0.0267	0.1470
TOTAL	1.1142	0.2054	0.1563

Z1289910A Mon Dec 9 11:19 1991
Name: Rat Femur
Comment: nephrotic syn 1 day 12
I.D.: Sex:
S.S.#: - - Ethnic:
ZIPCode: Height: cm
Scan Code: Weight: kg
BirthDate: / / Age:
Physician: SIERRA

TOTAL BMD CV FOR L1 - L4 1.0x

C.F. 0.999 1.068 1.000

Region	Area (cm ²)	BMC (grams)	BMD (gms/cm ²)
L1	0.2707	0.0474	0.1752
L2	0.5614	0.0085	0.1434
L3	0.1292	0.0170	0.1374
TOTAL	0.9613	0.1457	0.1515



Fig. 5 Densitometría ósea de doble fotón mediante energía de rayos X (Hologic QDR-1000/W).

Se aceptó que los valores son diferentes cuando $p < 0.05$ en la curva de dos colas.

15.-PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD

a) Interanálisis: se realizó la determinación de una misma mezcla de suero y orina de ratas normales en diferentes ensayos y se calculó el coeficiente de variación (CV).

b) Intraanálisis: Se realizó la determinación de una misma mezcla de suero y orina de ratas normales 10 veces dentro de un mismo ensayo y se calculo el coeficiente de variación.

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

PROTEINAS: En las figuras 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de proteínas en orina y en suero respectivamente. Se presentó proteinuria e hipoproteinemia en los días 6 y 12, regresando a sus niveles normales con respecto a los controles el día 26.

CALCIO IONIZADO: La figura 8 muestra una hipocalcemia significativa ($p < 0.005$) en el día 12 (4.45 ± 0.29 vs 5.06 ± 0.08 mg/dL del control).

PTH: En la figura 9 se muestra una elevación estadísticamente significativo de la PTH los días 6 ($p < 0.001$) y 12 ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.

Para el día 6 se observó 164 ± 21.36 vs 106.83 ± 10.5 pg/mL del control y para el día 12 de 148.14 ± 34.0 vs 107.33 ± 15.78 pg/mL del control. Regresando a sus niveles normales con respecto a los controles el día 26.

PROTEINAS URINARIAS

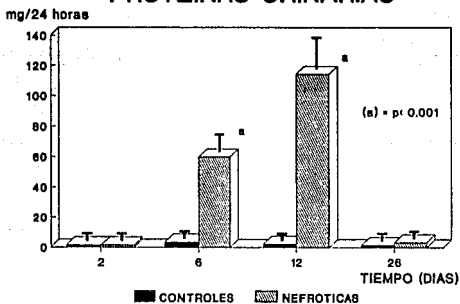


Fig. 6. Excreción urinaria de proteínas totales en ratas control y con SN durante los días 2, 6, 12 y 28 del estudio.

PROTEINAS SERICAS

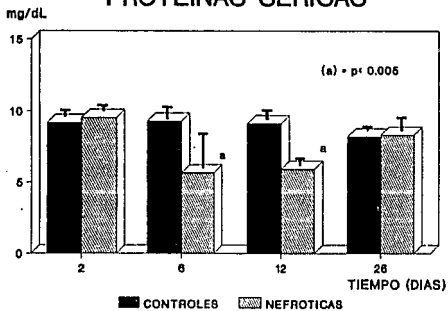


Fig. 7. Niveles séricos de proteínas en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

CALCIO IONIZADO

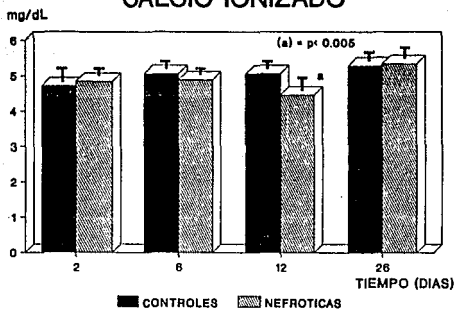


Fig. 8. Niveles de calcio ionizado en suero de ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

PTH

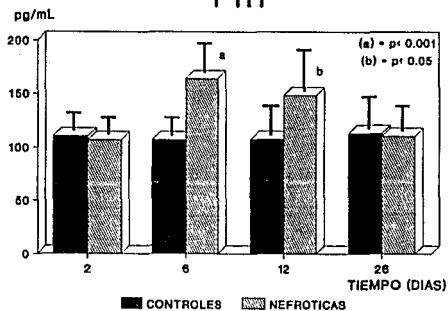


Fig. 9. Niveles séricos de hormona paratiroidea en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

AMP CICLICO URINARIO: En la figura 10 se observa que el AMPc urinario disminuye significativamente ($p < 0.0001$) el día 6 (7.28 ± 1.85 vs 39.65 ± 7.95 nmol/ mg de Cr del control), posteriormente aumenta gradualmente hasta llegar a valores del control en el día 26.

METABOLITOS DE LA VITAMINA D: En las figuras 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos al determinar los metabolitos activos de la vitamina D (25-OHD y $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ respectivamente)

Desde el día 6 estos metabolitos fueron indetectables, posteriormente en los días 12 y 26 aumento progresivamente pero con valores significativamente bajos con respecto a los controles; sin llegar a normalizarse en el día 26.

HIDROXIPROLINA: En la figura 13 los niveles urinarios de hidroxiprolina aumentan desde el día 6, pero en el día 12 se obtuvo un pico máximo (122.6 ± 74.5 vs 6.96 ± 3.28 mg/g de Cr del control) para posteriormente disminuir en el día 26 (25.8 ± 3.18 vs 3.1 ± 2.2 mg/ g de Cr del control) sin llegar a valores similares al grupo control.

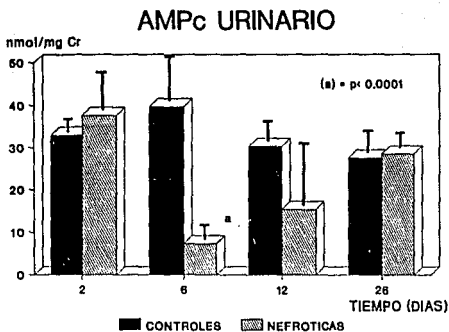


Fig. 10. Niveles de AMP cíclico urinario en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

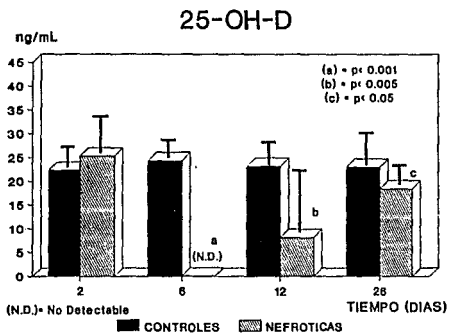


Fig. 11. Niveles séricos de 25-hidroxivitamina D en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

1,25-(OH)₂-D

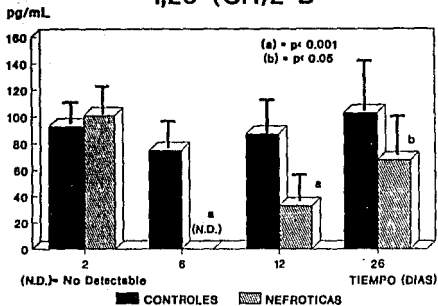


Fig. 12. Niveles de 1,25-dihidroxitamina D en el suero de ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

HIDROXIPROLINA

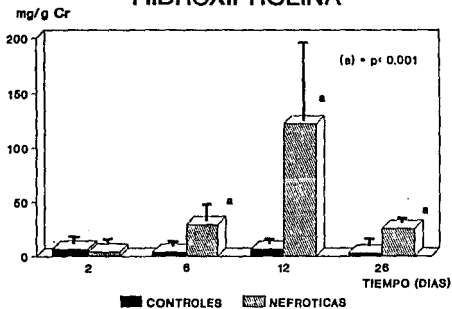


Fig. 13. Excreción urinaria de hidroxiprolina en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

POSFATASA ALCALINA: En la figura 14 se muestran niveles bajos de fosfatasa alcalina a lo largo de todo el estudio, mostrandose valores bajos estadísticamente significativos ($p < 0.001$) con respecto a los controles.

OSTEOCALCINA: En la figura 15 se muestra una gran elevación en el día 6 (14.6 ± 1.74 vs 4.88 ± 0.47 ng/ mL del control) normalizandose a valores del grupo control en el día 12, pero en el día 26 se observó una disminución de 3.71 ± 0.47 vs 4.43 ± 0.49 ng/mL del control.

DENSITOMETRIA OSEA: En las figuras 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos del contenido mineral óseo y de la densidad mineral ósea respectivamente.

El contenido mineral óseo se mantuvo disminuído a todo lo largo del estudio con una significancia estadística de $p < 0.001$ con respecto al control. La densidad mineral ósea se observó con valores significativamente bajos en el día 2 y 26 con una $p < 0.001$ y en el día 6 con una $p < 0.05$; pero en el día 12 no se encontró cambio alguno con respecto al control.

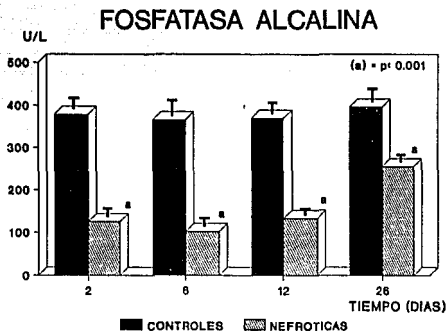


Fig. 14. Niveles séricos de fosfatasa alcalina en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

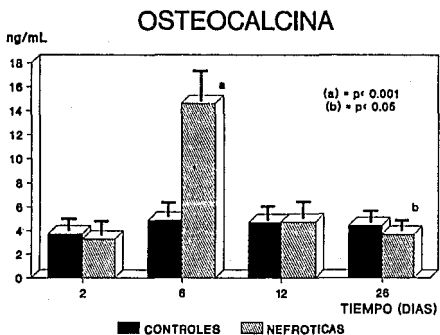


Fig. 15. Niveles séricos de osteocalcina en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

BMC-T CONTENIDO MINERAL OSEO TOTAL

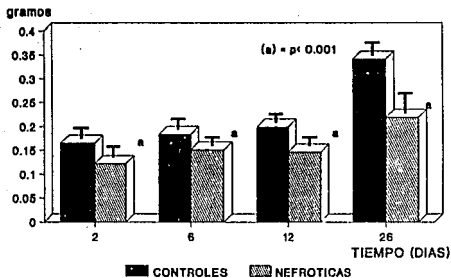


Fig. 16. Niveles del contenido mineral óseo en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

BMD-T DENSIDAD MINERAL OSEA TOTAL

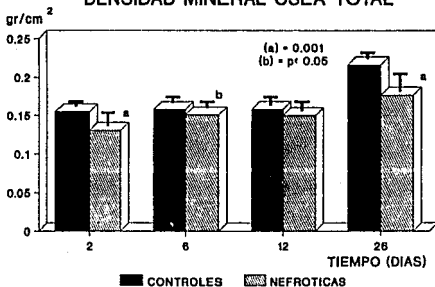


Fig. 17. Niveles de la densidad mineral ósea en ratas control y con SN los días 2, 6, 12 y 26 del estudio.

DISCUSSION

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

En el SN se ha propuesto que la pérdida por orina de proteínas, en este caso de la proteína transportadora de vitamina D, da como resultado una disminución en la circulación de los metabolitos de la vitamina D. Se ha postulado que esta disminución se acompaña de una baja absorción intestinal de calcio y por consiguiente una disminución de los niveles de calcio ionizado en suero, lo que estimula la secreción de PTH al torrente circulante y la reabsorción de calcio por el riñón, lo que disminuye se excreción por la orina.

En algunos casos, estos cambios afectan la estructura del hueso, específicamente aumentando la actividad osteoclástica y favoreciendo la desmineralización ósea. A su vez, la normalización de la proteinuria y de la concentración en suero de los metabolitos de la vitamina D favorecen el restablecimiento de las alteraciones del metabolismo mineral que se presentan en el SN.

El hecho de que algunos autores reporten cambios en el calcio, PTH y en los metabolitos de la vitamina D, y que otros reporten cambios opuestos, nos lleva a pensar en la posibilidad de que esto se deba a otros factores, como la edad, la duración de la enfermedad, el grado de disfunción renal, la proteinuria y la disminución en suero de albúmina. Se ha propuesto también que en padecimientos de larga duración hay una disminución más acentuada de los niveles de albúmina y 25-OHD y esto, sea la causa de los

cambios observados en la homeostasis de calcio, vitamina D y a nivel óseo. En nuestro modelo experimental de SN inducido con ANP se presentó el cuadro clínico de las alteraciones metabólicas de este padecimiento, caracterizado por edema, aumento de volumen urinario (no mostrado en gráficas) y franca proteinuria (Fig. 6).

La proteinuria presenta su máxima excreción el día 12, a pesar de que el aumento se viene dando desde el día 6, al mismo tiempo que las proteínas en la sangre disminuyen (Fig. 7). Una vez que la fase aguda se presenta, el fenómeno es reversible y para el día 26, la concentración de proteínas en la orina y en el suero regresan a sus valores normales.

En la circulación, la homeostasis mineral se mantiene a través de la relación Ca/P (1:1), y son las hormonas reguladoras del metabolismo de estos minerales, quienes mantienen este equilibrio. La pérdida de calcio (total y ionizado [Fig. 8]) estimula a PTH desencadenando un aumento de los niveles circulantes de esta hormona en la sangre durante los días 6 y 12 (Fig. 9), efecto que favorece la desmineralización del esqueleto y restablece de esa manera los niveles de calcio a la normalidad.

El segundo mensajero de la acción de PTH es el AMP cíclico nefrogénico. En nuestro modelo experimental los niveles de AMPc en la orina disminuyen el día 6 (Fig. 10), lo que sugiere que en este modelo la respuesta del complejo hormona receptor (PTH-Adenilatociclasa) a nivel de la membrana basal está alterado.

Los metabolitos de la vitamina D, 25-OHD y $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se encuentran disminuidos significativamente a lo largo del padecimiento. Los niveles de 25-OHD disminuyen a valores indetectables el día 6, detectables pero significativamente diferentes con respecto al grupo control los días 12 y 26 del síndrome (Fig. 11). Este metabolito es el precursor de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y al mismo tiempo, resulta ser el que tiene mayor afinidad por la proteína acopladora de vitamina D (DBP), la cual al ser excretada por orina favorece la excreción urinaria de 25-OHD. En consecuencia, los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ son indetectables en el día 6, así como significativamente diferentes los días 12 y 26 (Fig. 12).

Los resultados muestran que la máxima excreción de OHP_r, aminoácido que se libera al degradarse la colágena ósea, tuvo lugar el día 12 (Fig. 13) y, regresa a los valores basales el día 26, de manera semejante a la proteinuria.

La fosfatasa alcalina, uno de los marcadores bioquímicos de la actividad osteoblástica, se encuentra disminuida desde el día 2 y se mantiene igual durante el resto del padecimiento (Fig. 14). Aunado a lo anterior, los niveles de osteocalcina en sangre no se modifican a excepción del día 6, cuando aumenta significativamente con respecto al grupo control (Fig. 15), lo cual puede deberse a la disminución de la depuración de esta proteína por el riñón.

Hasta ahora, no se había estudiado en este modelo experimental el contenido mineral del hueso. Por ello, los fémures de las ratas control y con SN se disecaron y se les

midió el contenido mineral óseo total (BMC-T) y la densidad de la masa ósea total (BMD-T). El BMC-T se encontró francamente disminuido a lo largo de los 26 días del síndrome (Fig. 16) mientras que la BMD-T, solo mostró diferencia significativa los días 2, 6 y 26 (Fig. 17). Resulta interesante comentar el que no se encontró diferencia entre ambos grupos el día 12 en lo que respecta a BMD-T, lo que puede sugerir que el aumento de osteocalcina en sangre el día 6 pudiese compensar la desmineralización ósea que tiene lugar el día 12 del síndrome. De ser así, este efecto representaría entonces un aumento de la actividad osteoblástica y no una disminución de la depuración renal de esta proteína.

Resulta interesante postular que en el SN son varios los mecanismos que se encuentran alterados en el sistema de la vitamina D y del metabolismo mineral. Por otro lado, el aumento de la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular a las proteínas, minerales, hormonas, vitaminas, lípidos y proteínas transportadoras de hormonas, por citar algunos, es más complejo de lo que parece y requiere de estudios más profundos para poder evaluarlos.

Aunado a ello, los hallazgos encontrados en nuestro modelo experimental de SN en ratas inducido con ANP, nos permitió valorar el grado de desmineralización del osteoide a través de los estudios de densitometria. Por otra parte, la determinación en sangre y orina de los marcadores bioquímicos del remodelamiento esquelético (formación y resorción) sirvieron de apoyo a la

investigación clínica en la identificación temprana de las alteraciones óseas que se presentan en este síndrome en el humano.

CONCLUSIONS

VIII. CONCLUSIONES

1.- El desequilibrio homeostático y hormonal que se presenta en el SN inducido con ANP desencadenó un deterioro irreversible de la masa ósea y tiene un efecto sobre la estructura del esqueleto, considerado como la única vía de obtención de estos minerales.

2.- Los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo, específicamente la concentración en sangre de osteocalcina, indicador de la actividad osteoblástica, determinados por primera vez en este modelo experimental, permitió valorar la actividad ósea metabólica y su efecto sobre el esqueleto.

3.- Gracias a la utilización de la densitometría ósea de doble fotón (DEXA) se pudo estimar el grado de deterioro esquelético.

REFERENCIAS

IX. REFERENCIAS

- 1.- Bernard DB. Extrarenal complication of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988;33:1184-1202.
- 2.- Glasscock RJ, Adler SG, Ward HJ, Cohen AH. The nephrotic syndrome. En: *The Kidney*, editado por Brenner BM y Rector FC., W.B. Saunders Company, 4ª ed., 1991:1212-1252.
- 3.- Pedraza-Chaverrí J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodio retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:29-38.
- 4.- Pedraza-Chaverrí J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. In vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev Invest Clin* 1990;42:120-126.
- 5.-Hoedemaeker Ph J. Experimental glomerulonephritis. En: *Nephrology*, editado por Davison AM, Cambridge University Press, 1988:424-426.

- 6.- Nagasawa HT, Alexander CS, Swingle KF. Metabolic basis for the lack of nephrotoxicity of acetylated puromycin aminonucleoside in rats. *Tox Appl Pharmacol* 1970;16:1-9.
- 7.- Ghiggeri GM, Cercignani G, Gineuri F, Bertelli R, Zetta L, Grego F, Candiano G. Puromycin aminonucleoside metabolism by glomeruli and glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1991;40:35-42.
- 8.- Holleck MF, MacLaughlin JA, Clark MB. Photosynthesis of previtamin D in human skin and physiological consequences. *Science* 1980;210:203-205.
- 9.- Ponchon G, De Luca HF. The role of liver in the metabolism of vitamin D. *J Clin Invest* 1969;48:1273-1279.
- 10.- Napoli JL, Horst RL. Vitamin D, basic and clinical aspects. The Hague Nijhoff ed. 1984:91-123.
- 11.- Calston K, Williams NJ, Cleeve HJW. Studies on vitamin D binding in nephrotic syndrome. *Clin Chem* 1985;31:718-721.
- 12.- Chazarian JG, Schaes HK, De Luca HF. Mechanism of 25-hydroxycalciferol 1 hydroxylation. *Biochem J* 1973;12:2555-2558.

13.- Reynolds JJ, Habick MF, De Luca HF. The role of vitamin D metabolites in bone resorption. *Cal Tiss Res* 1973;12:295-301.

14.- Haltrap ME, Cox KA, Clark MB. 1,25-dihydroxyvitamin D stimulates osteoblastin rat bones in absence of parathyroid hormone. *Endocrinology* 1981;108:2293-2301.

15.- Stern PH. Vitamin D and bone. *Kidney Int* 1990;38:S17-S21.

16.- Zerveck JE, Sakhie K, Pack CYC. Short term 1,25-dihydroxyvitamin D administration raises serum osteocalcin in patients with postmenopausal osteoporosis. *Clin Endocrinol Metab* 1985;60:615-617.

17.- Goldstein DA, Haldiman B, Sherman D, Norman AW, Massry SG. Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:116-121.

18.- De Luca HF. The metabolism, physiology and function of vitamin D. Kumar ED.: Vitamin D, basic and clinical aspects. The Hague, Nijhoff, 1984:1-8.

19.- Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 1969;3:211.

- 20.- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assesment of metabolic bone disease. *Endocr Metab Clin North Am* 1990;19(1):1-19.
- 21.- Charles P, Poser JW, Mosekilde L, Jensen FT. Estimulation of bone turnover evaluation by ⁴⁷Ca-kinetics. *J Clin Invest* 1985;76:2254-2258.
- 22.- Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, Riggs BL. Effect of renal function on plasma levels of bone GLA-protein. *J Clin Endocr Metab* 1983;57:1028-1030.
- 23.- Sartoris DJ, Resnick D. Dual-energy radiographic absorptiometry for bone densitometry: current status and perspective. *Am J Roentgenol* 1989;152(2):241-246.
- 24.- Genant HK, Block JE, Steiger P, Glueer CC, Ettinger B, Harris ST. Appropriate use of bone densitometry. *Radiology* 1989;170:817-822.
- 25.- Genan HK, Faulkaer KG, Claus-Christian G. Measurement of bone mineral density: current status. *Am J Med* 1991;91(Suppl 5B):49S-53S.
- 26.- Wilson ChR, Fogelamn I. Densitometry and bone mineral measurement. *Current Opinion in Rheumatology* 1990;2:369-378.

27.- Malluche HH, Goldstein DA, Massry SG. Blood levels of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. J Clin Invest 1979;63:494-500.

28.- Goldstein DA, Oda Y, Kurokawa K, Massry SG. Blood levels of 25-hydroxyvitamin D in nephrotic syndrome. Studies in 26 patients. Ann Intern Med 1977;87:664-667.

29.- Barragry JM, France MW, Carte ND, Auton JA, Beer M, Boucher BJ, Cohen RD. Vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. Lancet 1977;2:229-232.

30.- Lambeert PW, DeOreo PB, Fu IY, Kaetzel DM, Von AK, Hollis BW, Ross BA. Urinary and plasma vitamin D metabolism in the nephrotic syndrome. Metab Bone Dis Res 1982;4:7-15.

31.- Freundlinch M, Bourgoignie JT, Zilleruelo G, Abitol C, Canterbury JM, Strauss J. Calcium and vitamin D metabolism in children with nephrotic syndrome. J Pediatr 1986;108:383-387.

32.- Korkor A, Schwartz J, Bergfeld M, Teitelbaum S, Avioli LV, Klarhr S, Slatopolsky E. Absence of metabolic bone disease in adult patients with nephrotic syndrome and normal renal function. J Clin Endocrin Metab 1983;56:498-500.

33.- Auwerx J, De Keyeser L, Bouillon R, De Moor P. Decrease free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with nephrotic syndrome. Nephron 1986;42:231-235.

34.- Alon U, Chan JC. Calcium and vitamin D metabolism in nephrotic syndrome. Int J Pediatr Nephrol 1983;4:115-118.

35.- Chan YL, Mason RS, Parmentier M, Saudie E, Lissner D, Posen S. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. Kidney Int 1983;24:336-341.

36.- Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:267-275.

37.- Podenphan J, Larse NE, Christiansen C. An easy and reliable method for determination of urinary hydroxyproline. Clin Chem Acta. 1984;124:45-48.

38.- Haussamen TA, Rick W, Gro W, Helgen R. Nephrotic Syndrome and vitamin D. Clin Chem Acta. 1967;15:421-423.

39.- Mellette LE, Tuma SN, Kirland JL. Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone using an homologous antiserum with a carboxy-terminal fragment of bovine parathyroid hormone as radioligand. J Clin Endocrinol Metab 1982;54:1017-1021.

40.- Goundberg CM, Wilson PS, Gallop PM, Parfitt AM. Determination of osteocalcin in human serum: Results with two kits compared with those by a well characterized assay. Clin Chem 1985;31:1720-1723.

41.- Seino Y, Sierra RI, Sonn YM, Jafari A, Birge S, Avioli LV. The duodenal 1-alpha-25-dihydroxyvitamin D receptor in rats with experimental induced diabetes. Endocrinology 1983;113:1721-1725.

42.- DeAlba G. Tesis de Licenciatura: Determinación de AMPc por radioinmunoanálisis. Universidad Motolinía, Inc. a la U.N.A.M. 1984.

43.- Ammann P, Rizzole R, Slosman D, Bonjour JP. Sequential and precise in vivo measurement of bone mineral density in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. J Bone Mineral Res 1992;7(3):311-316.