

EFFECTO DEL COBRE SOBRE EL CONTENIDO SÉRICO DE ALBÚMINA Y DE LÍPIDOS Y SOBRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y TISULARES DE COBRE EN RATAS CON SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL.

J. Villarroel¹, D. Paredes¹, O. M. Alarcón-Corredor², A. Villarroel¹, R. Alfonzo¹, Y. Hidalgo¹, C. Paredes¹, Y. Paredes¹.

¹Laboratorio de Investigación Nutricional. Escuela de Nutrición. Facultad de Medicina. ²Laboratorio de Espectroscopía Molecular. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.

Resumen

Existen evidencias de un estrés oxidativo y de una defensa antioxidante disminuida durante el síndrome nefrótico agudo. El estrés oxidativo se ha implicado en la patogénesis de los trastornos cardiovasculares, incluyendo la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia y la aterosclerosis. El cobre (Cu) es esencial para mantener una defensa antioxidante óptima y su carencia disminuye la capacidad corporal para combatir el estrés oxidativo. En el presente trabajo se estudió el efecto de la ingesta de una dosis diaria de 2 mg de Cu, durante 30 días, sobre la concentración sérica de colesterol, triglicéridos y albúmina y sobre las concentraciones séricas y tisulares de Cu en ratas con síndrome nefrótico (Grupo B). El síndrome nefrótico se indujo en las ratas mediante la administración intravenosa de adriamicina (7.5 mg/kg de peso). Los resultados se compararon con los obtenidos en ratas con síndrome nefrótico no tratados con Cu (Grupo A) y de ratas normales (Grupo C). Los resultados en el Grupo A muestran que el colesterol y los triglicéridos séricos están incrementados ($p < 0.05$), mientras que la albúmina y las concentraciones séricas y tisulares de cobre están significativamente disminuidas ($p < 0.05$) al comparar con los otros grupos. La administración de Cu por vía oral en estas ratas disminuye los lípidos séricos e incrementa la albúmina y el contenido de este metal traza en suero y en tejidos. La administración oral de cobre a estas ratas tiene efectos benéficos sobre el perfil lipídico mejorando las defensas antioxidantes endógenas y disminuyendo el estrés oxidativo in vivo. En conclusión, nuestros resultados sugieren que en los animales con síndrome nefrótico existe una deficiencia marginal de cobre que debe ser documentada en futuras investigaciones y que la administración de Cu pudiera ser un tratamiento efectivo, económico e innovador para reducir la hiperlipidemia en humanos con síndrome nefrótico.

Palabras claves: adriamicina, síndrome nefrótico, cobre, deficiencia de cobre, estrés oxidativo, hiperlipidemia

Abstract

Effect of copper (Cu) on the serum content of albumin and lipids and serum and tissue concentrations of copper in rats with experimental nephrotic syndrome.

There is evidence of oxidative stress and impaired antioxidant defense during acute nephrotic syndrome. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of cardiovascular disorders, including hyperlipidemia, hypercholesterolemia and atherosclerosis. Copper (Cu) is essential for optimal antioxidant defense and Cu deficiency decreases the body's ability to deal with oxidative stress. In the present study the effect of ingestion of a daily dose of 2 mg of Cu, during 30 days, on the serum concentration of cholesterol, triglycerides and albumin and on serum and tissue concentrations of copper of rats with nephrotic syndrome (Group B) was studied. The nephrotic syndrome was induced in the rats by the intravenous administration of adriamycin (7.5 mg/kg of corporal weight). The results were compared with those obtained of rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome not-treated with oral copper (Group A) and of normal rats (Group C). The results in Group A show that serum cholesterol, triglycerides are significantly ($p < 0.05$) increased while albumin and serum and tissue Cu concentration are significantly decreased ($p < 0.05$) respect the other groups. The administration of oral copper in these rats decreases serum lipids and increases ($p < 0.05$) albumin and the content of this trace metal in serum and tissues. Dietary Cu supplementation had beneficial effects on lipid profile by improving endogenous antioxidant defenses and decreasing the oxidative stress in vivo. In conclusion, our results suggest that in the animals with nephrotic syndrome induced, there is a marginal deficiency of copper that must be documented in future research and that the oral administration of copper could be used as effective, economic and innovating treatment to reduce hyperlipidemia in human with nephrotic syndrome.

Key words: adriamycin, nephrotic syndrome, copper, copper deficiency, oxidative stress, hyperlipidemia

INTRODUCCIÓN

El clorhidrato de doxorubicina (Adriamicina®, Rubrex®), un antibiótico antraciclina aislado de *Streptomyces peuceitius*, muy similar a la

daunorrubicina, es uno de los agentes neoplásicos más efectivos en combinación con otras drogas. En los tejidos normales y cancerosos, las antraciclina reaccionan con la citocromo P₄₅₀ reductasa para

formar radicales semiquinona intermediarios que reaccionan con el O₂ para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxil (OH), los cuales, a su vez, atacan y oxidan las bases del ADN (Serrano et al. 1999). La adriamicina también induce alteraciones anatómicas y funcionales a nivel del capilar glomerular que se caracterizan por pérdida de las interdigitaciones de los pedicelos de los podocitos, con separación de la membrana basal y alteraciones de su composición bioquímica (entre ellos, formación de pseudocisteína, disminución de la carga aniónica, etc.), que alteran la barrera de filtración glomerular con presencia de proteínas en la orina: proteinuria y producción de un síndrome nefrótico (Morioka et al. 2001). El síndrome nefrótico es una condición clínica muy importante y dramática, en la cual los mecanismos subyacentes son mal entendidos y el tratamiento es inespecífico y a menudo no efectivo (Haraldsson et al. 2008) y se caracteriza, entre otras cosas, por una excreción anormal de proteínas por la orina (proteinuria), una concentración disminuida de albúmina plasmática (hipoalbuminemia), con una concentración sérica incrementada de colesterol (hipercolesterolemia) y de triglicéridos (hipertrigliceridemia) concomitantemente con alteraciones en el metabolismo del cobre (Cu) (Behrman y Vaughan 1999) y evidencias de estrés oxidativo y una disminución de las defensas antioxidantes durante el síndrome nefrótico agudo. El status antioxidante se recupera totalmente sólo durante la remisión del proceso a largo plazo (Mishra et al. 2011).

Es un hecho conocido que los pacientes con síndrome nefrótico tienen una excreción urinaria de cobre incrementada (Steck et al. 1990, Markovitz et al. 1955, Cartwright et al. 1954). Sin embargo, la disminución del cobre sérico (hipocupremia) ha sido demostrada en algunos, pero no en todos los estudios (Brown et al. 1984; Jensen, 1967; Markovitz et al. 1955). Se ha propuesto que la deficiencia de cobre puede estar comprometida en algunas complicaciones del síndrome nefrótico humano, como la hipercolesterolemia (Rondón et al. 2004, Cartwright et al. 1954) y el estrés oxidativo (Zhu y Lu 2009).

Los párrafos precedentes sugieren la interacción entre el síndrome nefrótico y una posible carencia de cobre y a partir de un modelo experimental se pretende evaluar el efecto de la suplementación con Cu sobre los cambios en los niveles séricos de albúmina, colesterol y triglicéridos y sobre las concentraciones séricas y tisulares de este elemento traza en ratas con síndrome nefrótico experimental inducido por adriamicina. Por esta razón, en el presente estudio se describe el efecto del cobre administrado por vía oral sobre el contenido sérico de albúmina, colesterol y triglicéridos y sobre el

contenido sérico y tisular de cobre en ratas con síndrome nefrótico inducido por adriamicina (Grupo B) y se compara con lo que sucede en animales con síndrome nefrótico sin suplementación con Cu (Grupo A) y en ratas sanas (Grupo C).

METODOLOGÍA

Animales y dieta.

Se utilizaron 45 ratas machos *Ratus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, de edad y peso uniforme (126-138 g) procedentes del Bioterio de la Universidad de Los Andes que se mantuvieron en jaulas individuales, en el ambiente del laboratorio durante una semana para las adaptaciones correspondientes, como etapa previa al inicio del experimento. Los animales se alimentaron con Ratarina Protinal® (preparado que contiene 26% de proteínas, 2% de lípidos, 6% de fibra y 40% de extracto de libre de nitrógeno; a base de los siguientes ingredientes: maíz, sorgo, harinas de ajonjolí, soya y pescado, leche descremada en polvo, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales “trazas” (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y cinc) y suplementos de las vitaminas A, B₁, B₂, B₁₂, D₃, E, ácido pantoténico, biotina, colina y niacina, “ad libitum” y se les permitió el libre acceso al agua de bebida.

Inducción del síndrome nefrótico.

Al inicio del experimento, luego del periodo de adaptación, 30 animales se dividieron en dos grupos (Grupos A y B), cada uno integrado por 15 ratas, que fueron sometidas a anestesia general, rápida y de corta duración con clorhidrato de ketamina (*Ketaset*® 100 mg/ml) a la dosis de 15 mg por 100 g peso corporal, mezclado con tiopental sódico (*Pentothal Sódico*® 30 mg/0.5 g, diluido en 30 ml de agua destilada) a la dosis de 0.20 mg por 100 g de peso corporal, por vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó el abordaje quirúrgico del cuello de la rata, se disecó la vena yugular externa (derecha o izquierda), se realizó la flebotomía y se les indujo el síndrome nefrótico con adriamicina a una dosis intravenosa única de 7.5 mg/kg de peso corporal (Rondón et al. 2004). Las 15 ratas restantes no fueron tratadas con adriamicina y constituyen el Grupo C (grupo sano no tratado).

A los 15 días de administrada la adriamicina por vía intravenosa, cuando está consolidado el síndrome nefrótico, en las ratas del Grupo B (síndrome nefrótico + Cu) se inició la administración oral de una dosis diaria de 2 mg de Cu (CuSO₄·7H₂O. Merk® reactivo p.a), disueltos en el agua de bebida, durante 30 días. El Grupo A (síndrome nefrótico - Cu) estuvo integrado por aquellas ratas con síndrome nefrótico no suplementadas con cobre oral.

Recolección y procesamiento de las muestras.

A los 30 días, todas las ratas, luego de un ayuno de 8 horas, se anestesiaron con éter dietílico y se les extrajo una muestra de sangre (3 ml) del seno retro-orbitario, mediante un tubo capilar de microhematocrito, que se recolectó en tubos de vidrio, sin anticoagulante. El suero se separó mediante centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente y se eliminó la capa superficial de fibrina. Posteriormente, los sueros se mantuvieron refrigerados a -15°C y se analizaron en un tiempo aproximado de 15 a 30 días.

Después de extraer la sangre, los animales se decapitaron con una guillotina Harvard y se desangraron durante 1-3 minutos. Se les practicó laparotomía + toracotomía, dejando al descubierto los diversos órganos que se disecaron y se colocaron en un plato de Petri sobre hielo. De cada uno de los órganos, se pesaron trozos entre 500 mg y 1 g, en balanza de precisión, que se prepararon y se sometieron a digestión ácida asistida por microondas, de acuerdo al método de Burguera et al. (1992). Sólo la porción muscular del diafragma se utilizó en este estudio. En relación con las fuentes óseas, las tibias o los fémures totales se utilizaron. Las muestras de pelo, aproximadamente 100 mg, se tomaron de la parte posterior de la cabeza con una tijera de acero inoxidable. Las muestras de uñas se tomaron con un corta-uñas de acero inoxidable, y se almacenaron en bolsitas plásticas previamente rotuladas hasta el momento del análisis. El proceso de limpieza y digestión ácida por vía húmeda de las muestras de pelos y uñas se realizó por la técnica descrita por Guerrero (2007). La instrumentación, los reactivos, las características analíticas del método y la técnica empleada para la determinación del cobre en el suero y en los digeridos ácidos de tejidos, pelos y uñas se publicaron previamente (Rondón et al. 2004; Burguera et al. 1986). La concentración de la albúmina sérica se determinó utilizando verde de bromocresol (Pesce y Kaplan 1987). El colesterol sérico total se determinó por el procedimiento enzimático descrito por Allain et al. (1974) y los triglicéridos por el método enzimático descrito por Bucolo y David (1973) utilizando los kits comerciales de los Laboratorios Qualitest® (Caracas, Venezuela).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones típicas. Se asignó un valor de $p < 0,05$ para el análisis de dos colas. El tamaño de la muestra utilizado en este estudio confiere un poder estadístico del 0.86 y un nivel de detección de diferencia del 20% con una desviación estándar de 10. Los datos se analizaron estadísticamente

mediante ANOVA de una vía y test de Tukey post-ANOVA. Para el análisis de datos se empleó el paquete estadístico MINITAB v14, SPSS 15.

RESULTADOS.

La tabla 1 muestra las concentraciones séricas de colesterol, triglicéridos y de albúmina en las ratas con síndrome nefrótico suplementadas o no con cobre por vía oral. Los resultados muestran en el grupo A (SN-Cu) un incremento significativo ($p < 0.05$) en las concentraciones de colesterol y de triglicéridos con marcada y significativa ($p < 0.05$) disminución en la albúmina, al comparar con las ratas con síndrome nefrótico tratadas con Cu (Grupo B) y con los controles sanos (Grupo C). Cuando las concentraciones séricas promedio de cada parámetro se comparan entre sí, se observa que todas las concentraciones son significativamente ($p < 0.05$) diferentes entre los grupos estudiados. Los resultados muestran que el síndrome nefrótico experimental (Grupo A) cursa con niveles incrementados de colesterol y de triglicéridos y con niveles muy bajos de albúmina. Cuando los animales se tratan con cobre (Grupo B) se observa un incremento ($p < 0.05$) en la albúmina y una disminución ($p < 0.05$) en el colesterol y en los triglicéridos séricos, respecto al Grupo A.

Tabla 1. Concentración sérica de colesterol, triglicéridos y albúmina en las ratas con síndrome nefrótico suplementadas o no con cobre oral

Parámetros	Grupos		
	A (SN-Cu)	B (SN+Cu)	C (Control)
Colesterol (mg/dl)	463±18 ^a	176±12 ^b	87±3
Triglicéridos (mg/dl)	502±14 ^a	138±15 ^b	89±10
Albúmina (g/dl)	2.7±0.98 ^a	3.6±0.3 ^b	4.2±0.8

Los resultados se expresan como promedios ± DE

SN = Síndrome nefrótico

^a $p < 0.05$ estadísticamente significativo al comparar con los grupos B y C

^b $P < 0.05$ estadísticamente significativo al comparar con el grupo C

La tabla 2 muestra la variación en la concentración de Cu en el suero y en los tejidos en los diferentes grupos de ratas. En los animales del grupo A (SN-Cu) los valores del metal traza disminuyen significativamente ($p < 0.05$) en la sangre y en los tejidos al comparar con los animales del grupo B (SN+Cu) y del grupo C. La administración de cobre por vía oral (grupo B) incrementó significativamente ($p < 0.05$) las concentraciones del metal en la sangre y

en los tejidos estudiados aunque sin alcanzar los valores del grupo control (grupo C). Las variaciones menores en la concentración del elemento se encontraron en pelo y uñas, como era de esperar por tratarse de tejidos de menor recambio metabólico.

Tabla 2. Concentración de Cu en suero y en tejidos en los diferentes grupos de ratas

Suero	Grupos		
	A (SN-Cu)	B (SN+Cu)	C (Control)
Cu (mg/l)	0.46±0.14 ^a	0.94±0.23 ^b	1.23±0.43
Órgano/tejido (µg/g tejido fresco)			
Corazón	1.70±0.85 ^a	4.60±1.30 ^b	6.05±1.40
Pulmón	2.89±0.95 ^a	5.40±1.60 ^b	3.46±1.44
Hueso	0.50±0.30 ^a	0.70±0.20 ^b	1.07±0.39
Bazo	2.6±0.89 ^a	4.9±1.20	5.43±1.20
Hígado	3.17±0.99 ^a	5.60±1.30 ^b	7.09±1.30
Riñón	3.71±1.20 ^a	4.71±2 ^b	8.06±1.30
Fáneras (µg/g tejido fresco)			
Pelo	13.60±2 ^a	15.80±1,30	16.33±2
Uñas	10.30±2 ^a	12.40±3	15±4

Los resultados se expresan como promedios ± DE

SN = Síndrome nefrótico

^a p<0.05 estadísticamente significativo al comparar con los grupos B y C

^b P<0.05 estadísticamente significativo al comparar con el grupo C

DISCUSIÓN.

Las alteraciones renales en la rata se observan luego de una inyección intravenosa única de adriamicina a la dosis de 7.5 mg/kg de peso corporal. La evolución de las lesiones se puede resumir de la siguiente manera: a las 3 horas, mediante microscopia de luz y técnicas de inmunofluorescencia se observan alteraciones mínimas con pérdida de aniones de la membrana basal del glomérulo. A las 28 horas, mediante estudio con microscopia electrónica, se observan solo algunas fusiones locales de los procesos (pedicelos) de los podocitos. En el día 13 se aprecia una pérdida total de la arquitectura normal de los podocitos, con aparición de un citoplasma aplastado de las células epiteliales. Entre los días 13 y 15 post-inyección se observa la expresión total del síndrome nefrótico (Bertani et al. 1982). Por esta razón a los 15 días de la inyección intravenosa de la adriamicina, cuando está consolidado el síndrome nefrótico se inició la administración oral de Cu en el grupo B.

Nuestros resultados muestran en el Grupo A (SN-Cu) no tratado con Cu, un incremento significativo

(p<0.05) en las concentraciones séricas de colesterol (hipercolesterolemia) y de triglicéridos (hipertrigliceridemia) con una marcada (p<0.05) disminución en la albúmina (hipoalbuminemia), hallazgos que se relacionan con el estrés oxidativo existente (Zhu y Lu 2009).

El síndrome nefrótico es una consecuencia de un desbalance entre la actividad oxidante y antioxidante tisular (estrés oxidativo) (Zhu y Lu 2009). En ratas con síndrome nefrótico inducido por una inyección intravenosa única de adriamicina (5 mg/kg) a los 7, 14, 21 y 28 días de la administración del antibiótico se encuentran niveles incrementados de los índices del estrés oxidativo de la corteza renal, tales como los niveles del MDA (malonil-dialdehído), disminución de la actividad de la superóxido dismutasa y de la capacidad antioxidante total (T-AOC) e incremento del radical anión superóxido. Entre las especies vasculares de oxígeno reactivo, el anión superóxido juega un papel crítico en la biología vascular porque es la fuente de muchas otras especies de oxígeno reactivo y desempeñar varias funciones en las células vasculares. Actualmente se cree que los incrementos en el estrés oxidativo, a saber la excesiva producción de anión superóxido, están implicados en la fisiopatología de la disfunción endotelial que acompaña a un número de factores de riesgo cardiovascular. Por otra parte, el estrés oxidativo vascular juega un papel fundamental en la evolución de las condiciones clínicas como la aterosclerosis, la diabetes y la insuficiencia cardiaca (Zalba et al. 2000). Este hallazgo es interesante, ya que Keane Jr. y Vita (1995), Parker et al. (1995), Schettler et al. (1999), Antoniades et al. (2003) y da Silva Pereira et al. (2013) han demostrado la relación entre el estrés oxidativo, la hipercolesterolemia y la aterosclerosis. La hipertrigliceridemia (Miri et al. 2012) y la proteinuria marcada también están asociadas con el estrés oxidativo (Serrano et al. 1999). En relación con este punto debemos señalar que en estudios previos realizados por Rondón et al. (2004) en ratas con síndrome nefrótico inducido por adriamicina se demostró una marcada y significativa hipercolesterolemia, que se ha convertido en un síntoma clásico de la carencia nutricional de cobre (Medeiros 1985).

La administración de cobre oral incrementó la concentración sérica de la albúmina a límites normales mientras que las concentraciones de colesterol y de triglicéridos aunque disminuyen significativamente (p<0.05) no alcanzan los valores del Grupo C, lo cual pudiera ser debido a la administración de una dosis insuficiente de Cu. Por lo tanto, deben realizarse estudios adicionales con cantidades mayores de cobre y periodos más prolongados de administración del metal.

En el Grupo A también se observó una marcada y significativa hipocupremia que concuerda con las investigaciones previas de Cartwright et al. (1948, 1954) y Markowitz et al. (1955). Los valores de la cupremia en nuestros animales sugieren la existencia de una carencia marginal del elemento, secundaria a la exagerada pérdida del cobre por la orina (hipercupruria) que se correlaciona con la cantidad de proteína presente en la orina (Markowitz et al. 1955; Cartwright et al. 1954) y con la pérdida urinaria de la ceruloplasmina, una cuproenzima (Ulinski et al. 2009). Sin embargo, en otros estudios no se ha demostrado esta disminución tan marcada de la cupremia (Stec et al. 1990; Brown et al. 1984; Jensen, 1967). Inclusive, Mishra et al. (2011) han encontrado que el nivel plasmático de cobre es significativamente mayor en los casos activos del síndrome nefrótico al comparar con los grupos en remisión y en los grupos de remisión a largo plazo.

Por esta razón consideramos documentar en investigaciones futuras la existencia de una carencia marginal de cobre, de acuerdo con las indicaciones de Milne (1998, 1994) que incluya determinaciones de diversas cuproenzimas (entre ellas, ceruloplasmina, superóxido dismutasa y otras) en diferentes tejidos de ratas con síndrome nefrótico inducido por adriamicina.

En las ratas con síndrome nefrótico inducido también se encontró una disminución significativa en los niveles tisulares del cobre, que está relacionada con el recambio metabólico de cada uno de estos tejidos, por esta razón la menor disminución, aunque significativa, se detectó en pelo y uñas (Mertz 1975). Este resultado concuerda con los resultados de Pedraza-Chaverrí et al. (1984) quienes en ratas con síndrome nefrótico inducido con puromicina aminonucleósido (PAN) demostraron una clara y marcada disminución del cobre en hígado y riñón mientras que Adelstein y Vallee (1961) han señalado que el Cu eritrocitario está disminuido en el 60% de los pacientes con el síndrome.

En relación con este punto debemos tener presente que la carencia de cobre induce una dramática disminución de la actividad de la superóxido dismutasa y de la ceruloplasmina, dos enzimas antioxidantes, que determinan una marcada alteración de los mecanismos de defensa antioxidantes (Bureau et al. 2003). La suplementación con cobre, en ratas, reduce los triglicéridos y el colesterol total séricos con correlación positiva entre los niveles de ceruloplasmina y la administración del metal traza y los marcadores de estrés oxidativo, el hidropéroxido lipídico y el lipopéroxido también disminuyen con la administración de Cu (Galhardi et al. 2005). De acuerdo con estos autores la suplementación

dietética con Cu tiene efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico, mejora las defensas antioxidantes endógenas, disminuye el estrés oxidativo in vivo e incrementa significativamente los valores séricos y tisulares del elemento traza en las ratas con síndrome nefrótico. En estudios previos se ha demostrado que el cobre administrado por vía oral disminuye significativamente el colesterol y los triglicéridos en ratas sanas (Alarcón-Corredor et al. 2000) y en pacientes con hiperlipidemia (Alarcón-Corredor et al. 2006).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que en los animales con síndrome nefrótico inducido existe una deficiencia marginal de cobre que deberá ser documentada en investigaciones futuras y que la administración oral de cobre puede ser utilizada como un tratamiento efectivo, económico e innovador para reducir la hiperlipidemia y el estrés oxidativo en humanos con síndrome nefrótico.

Agradecimiento.

Al CDCHT (Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico), por el financiamiento de este proyecto con el número M -849-05-03-B.

REFERENCIAS.

- Adelstein SJ, Vallee BL. 1961. Copper metabolism in man. *New Engl. J. Med.* 265: 941-946.
- Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Ramírez de Fernández M et al. 2004. Efecto de la suplementación oral con cobre en el perfil lipídico de pacientes venezolanos hiperlipémicos. *Arch. Latinoam. Nutr.* 54: 413-418.
- Alarcón-Corredor OM, Carnevalí de Tata E, Reinoso-Füller J et al. 2000. Modificaciones de los lípidos séricos de ratas tratadas con cobre por vía oral. *Arch. Latinam. Nutr.* 50: 249-256
- Allain CC, Poon LS, Chan CS et al. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470-475
- Antoniades C, Tousoulis D, Tentolouris C et al. 2003. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. *Herz.* 28: 628-638.
- Behrman RE, Vaughan VC. 1999. Tratado de Pediatría de Nelson, Tomo II. 14ª. Edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. Pp. 1222- 1225
- Bertani T, Poggi A, Pozzoni R et al. 1982. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: Sequence of pathologic events. *Lab. Invest.* 46: 16-23
- Brown EA, Sampson B, Muller BR et al. 1984. Urinary iron loss in the nephrotic syndrome--an unusual cause of iron deficiency with a note on urinary copper losses. *Postgrad. Med. J.* 60: 125-128
- Bucolo G, David H. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.* 19: 476-482

- Bureau I, Gueux E, Mazur A et al. 2003. Female rats are protected against oxidative stress during copper deficiency. *J. Am. Coll. Nutr.* 22: 239-246.
- Burguera JL, Burguera M, Alarcón OM. 1986. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, iron, copper and zinc in cerebrospinal fluid by flow injection atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectr. (JAAS)* 1: 79-83
- Burguera JL, Burguera M, Matousek de Abel LCA et al. 1992. Microwave-aided micro-dissolution of biological samples prior to flow injection-atomic absorption spectrometry analysis. *At. Spectr.* 13: 67-71
- Cartwright GE, Gubler CJ, Wintrobe MM. 1954. Studies on copper metabolism. XI. Copper and iron metabolism in the nephritic syndrome. *J. Clin. Invest.* 33: 685-698
- Cartwright GE, Huguley CM Jr., Ashenbrucker H et al. 1948. Studies on free erythrocyte protoporphyrin, plasma iron and plasma copper in normal and anemic subjects. *Blood* 3: 591-613
- da Silva Pereira R, Tatsch E, Bochi GV et al. 2013. Assessment of oxidative, inflammatory, and fibrinolytic biomarkers and DNA strand breakage in hypercholesterolemia. *Inflammation.* 2013 Feb 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23436135.
- Galhardi CM, Diniz YS, Rodrigues HG et al. 2005. Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 49: 283-288.
- Guerrero YL. 2007. Evaluación nutricional y estado corporal del cinc, cobre, hierro, calcio y magnesio en adolescentes de la ciudad de Mérida. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Postgrado de Química Analítica. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. 2008. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol. Rev.* 88: 451-487
- Jensen H. 1967. Plasma protein and lipid pattern in the nephrotic syndrome. *Acta Med. Scand.* 182: 465-473.
- Keaney JF Jr, Vita JA. 1995. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 38: 129-154.
- Markowitz H, Gubler CJ, Mahoney JP et al. 1955. Studies on copper metabolism. XIV. Copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 34: 1498-1508
- Medeiros DM. 1985. The copper:zinc hypothesis and cardiovascular disease. *Biochem. Arch.* 1: 67-73
- Mertz W. 1975. Trace-element nutrition in health and disease: contributions and problems of analysis. *Clin. Chem.* 21: 468-475
- Milne DB. 1998. Copper intake and assessment of copper status. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1041S-1045S
- Milne DB. 1994. Assessment of copper nutritional status. *Clin. Chem.* 40: 1479-1484
- Miri R, Saadati H, Ardi P, Firuzi O. 2012. Alterations in oxidative stress biomarkers associated with mild hyperlipidemia and smoking. *Food. Chem. Toxicol.* 50: 920-926.
- Mishra OP, Gupta AK, Prasad R et al. 2011. Antioxidant status of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 26: 251-256.
- Morioka Y, Kike H, Ikezumi Y et al. 2001. Podocyte injuries exacerbate mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Internat.* 60: 2192-2204
- Parker RA, Sabrah T, Cap M et al. 1995. Relation of vascular oxidative stress, alpha-tocopherol, and hypercholesterolemia to early atherosclerosis in hamsters. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 349-358.
- Pedraza-Chaverrí J, Torres-Rodríguez GA, Cruz C et al. 1994. Copper and zinc metabolism in aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Nephron.* 66: 87-92
- Pesce AJ, Kaplan LA. 1987. *Methods in Clinical Chemistry.* The C.V. Mosby Company. St. Louis, MO. USA.
- Rondón C, Paredes D, Alarcón O et al. 2004. Effect of copper on the lipid levels in serum of rats with induced nephrotic syndrome. *Metal Ions in Biol. Med.* 8: 373-377
- Schettler V, Methe H, Staschinsky D et al. 1999. Review: the oxidant/antioxidant balance during regular low density lipoprotein apheresis. *Ther. Apher.* 3: 219-226.
- Serrano J, Palmeira CM, Kuehl DW et al. 1999. Cardiospecific and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 201-205
- Stec J, Podracká L, Pavkovecková O et al. 1990. Zinc and copper metabolism in nephrotic syndrome. *Nephron.* 56: 186-187.
- Ulinski T, Aoun B, Toubiana J et al. 2009. Neutropenia in congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of urinary ceruloplasmin loss. *Blood.* 113: 4820-4821
- Zalba G, Beaumont J, San José G et al. 2000. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol. Biochem.* 56: 57-64.
- Zhu Y, Lu L. 2009. Relationship between glomerular nephrin expression and oxidative stress reaction in rats with adriamycin-induced nephrosis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 11: 56-60.

Recibido: 17 julio 2013 Aceptado: 30 oct 2013