

- 3) ERHARDOVA, B. y RYSAVY, B. (1953).—(Influencia del ambiente exterior en el estadio preinvasor del helminto pulmonar *Muellerius capillaris*) *Ceskoslovenka Biologie*, 1: 35-36. En checo.
- 4) FORRESTER, D. J. and CLYDE, M. S. (1963).—Effect of temperature and humidity on survival of first stage *Protostrongylus stilesi* larvae. *Exper. Parasitol.*, 13, 83-89.
- 5) HAMILTON, J. M. and McCAW, A. W. (1967).—An investigation into the longevity of first stage larvae of *Aelurostrongylus abstrusus*. *J. of Helminth.*, 41, 313-320.
- 6) MATEKIN, P. V., TURLIGINA, E. S. and SHALAEVA, N. M. (1954).—(Contribución a la biología de las larvas de los Protostrongílidos de cabras y ovejas y a la epizootiología de la protostrongilidosis en Asia Central). *Zoolog. Zhurnal*, 33, 373-394. En ruso.
- 7) MOREV, YU. B. (1966).—(Resistencia al calor de las larvas de Protostrongílidos). *Mater Nauch. Konf. Vses. Obshch. Gelm. (1966) Part I*, 163-168. En ruso.
- 8) — (1967).—(Resistencia de las larvas de nematodos de la familia Protostrongylidae Leiper, 1926 a las bajas temperaturas). *Zoolog. Zhurnal*, 46: 435-436. En ruso.
- 9) — (1968).—(Efecto de la temperatura ambiente y la humedad en la viabilidad de ciertas larvas de Protostrongílidos). *Mater. Konf. posvya. panyati. N. V. Bodamina, Tashkent*: 229-230. En ruso.
- 10) NICKEL, S. (1960).—Das Verhalten der freilebenden Erstlarve des kleinen Lungenwurmes *Muellerius capillaris* in Freiland und Labor. *Angew. Parasit.* Jena, 1, 88-92.
- 11) PAVLOV, P. (1937).—Recherches expérimentales sur le cycle évolutif de *Synthetocaulus capillaris*. *Ann. Parasit. Hum. et Comp.*, 15, 500-503.
- 12) REGUERA FEO, A.; CORDERO DEL CAMPILLO, M. and ROJO VÁZQUEZ, F. A. (1981).—Survival of L-I of *Muellerius capillaris* (Nematoda, Protostrongylidae) under controlled conditions of humidity and temperature. *II Conferencia Mediterránea de Parasitología, Granada*, 29 sept. a 2 oct., 1981: 56.
- 13) ROSE, J. H. (1957).—Observations on the bionomics of the free-living first stage larvae of the sheep lungworm *Muellerius capillaris*. *J. Helminth.*, 31, 17-28.
- 14) TRUSHIN, I. N. (1974).—(Viabilidad de las larvas de primer estadio de *Muellerius*, al cabo de soportar el invierno en el medio externo). *Byull. Vsesoy. Inst. Gelm. im K.I. Skryabina*, 14, 56-60. En ruso.

HIDROXIPROLINURIA EN RATAS (RELACION ENTRE RAZA, EDAD, SEXO Y GESTACION)

por: P. García Partida
I. Díez Prieto
C. C. Pérez García
J. Palmeiro

INTRODUCCION

La hidroxiprolina está actualmente considerada como un índice concreto del metabolismo del colágeno óseo^{7, 15, 23}, siendo posible valorar éste a través de los niveles en la orina de este aminoácido^{3, 9, 10, 14, 19}.

Podemos correlacionar las modificaciones de hidroxiprolina urinaria con ciertos procesos metabólicos^{2, 4, 6, 8, 13, 17, 18, 20}, algunos reproducidos experimentalmente, pero para poder establecer un verdadero estudio comparativo es necesario conocer las variaciones que presenta la hidroxiprolinuria en los animales que utilizamos, ya que como comprobara García Partida no sólo la edad interviene en su mayor o menor excreción (para Prockop de 1/3 a 1/2 de la hidroxiprolina excretada por animales jóvenes se produce por la degradación del colágeno «soluble» recientemente sintetizado y el resto se origina de asociaciones metabólicamente del colágeno insoluble de varios tejidos) sino que las diferentes estirpes dentro de una misma especie así como el sexo, son parámetros que hacen variar el nivel de hidroxiprolina excretada a través de la orina. Por todo ello, nosotros pretendemos establecer en el presente trabajo las cifras basales de hidroxiprolinuria a lo largo de su período de crecimiento^{5, 9, 12} comparando dos de las estirpes más comunes, la Wistar y la Sprague-Dawley, así como las variaciones entre sexos, aunque estas variaciones no siempre son homologables a las de otras especies, incluyendo al hombre^{1, 8, 16, 22}.

MATERIAL Y METODOS

Hemos utilizado 120 ratas, 60 Wistar y 60 Sprague-Dawley nacidas y criadas en nuestras instalaciones, alimentadas con una dieta de una casa comercial (Altromin) y controlada periódicamente su composición por nosotros mismos, y agua *ad libitum*. Fueron mantenidas en jaulas de macrolon con cama mineral absorbente, la

temperatura y humedad relativa fueron constantes y se mantuvieron con luz artificial.

Las ratas se destetan a los veintiún días de nacer, sexándolas y separando los machos de las hembras en jaulas diferentes, 20 hembras de cada estirpe fueron apareadas y tras ser cubiertas se recoge su orina a los diez y quince días de gestación.

Valoramos independientemente la hidroxiprolinuria de veinticuatro horas en cada animal, al destete (veintiún días de edad), treinta, cuarenta y cinco, sesenta, setenta y cinco y noventa días, para lo cual utilizamos jaulas metabólicas, separando las excretas líquidas de las sólidas, sin que cambien las condiciones ambientales.

La diuresis de veinticuatro horas es recogida en tubos estériles en los que se congela la orina a -20°C hasta el momento en que tras medir el volumen urinario se realiza la determinación de hidroxiprolinuria.

La hidroxiprolinuria la valoramos siguiendo la metodología del test hipronosticón de los laboratorios Organon de Holanda. Este test se basa en el siguiente principio:

La hidroxiprolina, que se presenta en la orina en una forma unida a péptidos, se fija en una resina intercambiadora de cationes fuertemente ácida. Lavando la resina cargada con agua destilada, se eliminan distintos componentes que perturban la determinación. A continuación, se hidrolizan los péptidos en la resina, elevando la temperatura durante unas dieciséis horas a aproximadamente 100°C . Después de la elución de la hidroxiprolina liberada de la resina, se oxida el aminoácido hasta obtener un derivado pirrólico, que se colorea con el reactivo de Ehrlich y se determina cuantitativamente por fotocolorimetría.

Para realizar los cálculos utilizamos las fórmulas:

$$C_1 = \frac{2 \times E_{u1} \times 50}{E_{s1} - E_{u1}} \quad C_2 = \frac{2 \times E_{u2} \times 50}{E_{s2} - E_{u2}}$$

Siendo E_{u1} y E_{u2} = las extinciones de la muestra problema, y E_{s1} y E_{s2} las extinciones de los patrones de una muestra problema.

Los resultados vienen dados en mg. de hidroxiprolina por litro. Para obtener el valor de cada muestra se realiza la media entre los valores obtenidos en C_1 y C_2 .

Para calcular la hidroxiprolinuria diaria de cada animal, transformamos el valor obtenido a mg./ml. y a continuación multiplicamos por la cantidad de ml. de orina recogidos en veinticuatro horas de cada rata.

Los resultados obtenidos son sometidos a un estudio estadístico, calculando la «t de Student» para comparaciones entre medias.

RESULTADOS Y DISCUSION

La cifra media de hidroxiprolina urinaria al destete es casi idéntica para los animales de una misma estirpe, si bien se observa una estimable diferencia entre las ratas de diferentes razas; el peso y volumen de estos animales es muy similar a los

veintiún días de edad, por lo que su estructura ósea no presenta variaciones significativas que originen diferencias intersexos.

Hemos comparado dos tipos de ratas en las que su crecimiento es muy dispar, ya que los machos Wistar alcanzan un peso muy superior a los machos Sprague-Dawley, esta diferencia se manifiesta preferentemente en los días posteriores al destete y consecuentemente observamos cómo los machos de la primera excretaron cantidades de hidroxiprolina en orina muy superiores a los de la segunda.

Por el contrario, el comportamiento de las hembras es inverso al de los machos, si bien es cierto que el crecimiento de las hembras Wistar en estos días no es tan marcado como en los machos.

Los valores más elevados de hidroxiprolina de las hembras y machos en crecimiento se establecen entre los cuarenta y cinco y sesenta días, disminuyendo en los treinta días siguiente, confirmamos de esta forma el que los valores más elevados de hidroxiprolina urinaria se presentan en animales jóvenes, disminuyendo paulatinamente con la edad^{10, 16, 17, 21}, ya que la solubilidad del colágeno es superior en los animales jóvenes, y este tipo de colágeno va a estar muy aumentado en las épocas de crecimiento más rápidas^{7, 10, 19}.

Las hembras gestantes eliminaron una mayor cantidad de hidroxiprolina en la orina que las no gestantes, siendo muy superior la cifra en la Wistar que en la Sprague-Dawley; Klein observó hechos similares en la especie humana, si bien tras el parto estos valores disminuyen rápidamente, el mayor volumen del colágeno fetal sería el responsable de la elevación de esta cifra.

Una vez alcanzado el incremento máximo en su crecimiento, estadísticamente no observamos diferencias significativas entre machos y hembras de estas dos estirpes, por el contrario sí hay una marcada diferencia entre machos y hembras de una misma raza.

Hidroxiprolinuria en la rata Wistar

mg/24 horas

Días	20 hembras			20 machos		
	Media	Error	Desviación	Media	Error	Desviación
21	0,111	0,009	0,034	0,116	0,018	0,057
30	0,309	0,038	0,116	0,454	0,038	0,086
45	0,420	0,023	0,074	0,542	0,044	0,127
60	0,381	0,043	0,132	0,489	0,056	0,161
75	0,245	0,032	0,104	0,346	0,027	0,077
90	0,220	0,024	0,077	0,379	0,041	0,116

«t» de Student = 4,442***

- * 0,05 > P > 0,01
- ** 0,01 > P > 0,01
- *** 0,001 > P

Hidroxirolinuria en la rata Sprague-Dawley				mg/24 horas		
20 hembras				20 machos		
Días	Media	Error	Desviación	Media	Error	Desviación
21	0,121	0,011	0,033	0,128	0,008	0,034
30	0,366	0,021	0,067	0,374	0,041	0,116
45	0,464	0,053	0,163	0,478	0,056	0,171
60	0,472	0,031	0,095	0,482	0,053	0,152
75	0,294	0,025	0,080	0,392	0,032	0,099
90	0,191	0,013	0,030	0,387	0,043	0,132

«t» de Student = 2.264**

Hidroxirolinuria en la rata gestante				mg/24 horas		
20 Rata Wistar				20 Rata Sprague-Dawley		
Días	Media	Error	Desviación	Media	Error	Desviación
10	0,288	0,040	0,107	0,309	0,039	0,104
15	0,389	0,051	0,135	0,312	0,035	0,112

«t» de Student = 2.837**

RESUMEN

Se valora la hidroxirolinuria en ratas en crecimiento machos y hembras gestantes de las estirpes Wistar y Sprague-Dawley. Los valores máximos en ratas en crecimiento se observan a los cuarenta y cinco sesenta días tanto en hembras como en machos. Dentro de una misma estirpe la hidroxirolinuria urinaria es netamente superior en los machos. Las hembras gestantes incrementan notablemente su hidroxirolinuria.

HYDROXYPROLINURIA IN RATS (THE RELATIONSHIP BETWEEN STRAIN, AGE, SEX AND GESTATION)

SUMMARY

The hydroxyprolinuria is assessed in male and female growing rats, and in pregnant females of the Wistar and Sprague-Dawley strains. The maximum values in growing rats are observed between 45 and 60 days both in male and female. In the same strain of rats the urinary hydroxyprolinuria is far superior in the males. The pregnant females greatly increase in hydroxyprolinuria.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDERSON, J.; BANNISTER, D. W.; TOMLINSON, R. W. S. (1965).—Total urinary hydroxyproline excretion in normal human subjects. *Clin. Sci.*, **29**, 583-587.

- 2) Díez Prieto, I. (1981).—*Hidroxirolinuria en gallinas*. Tesis doct. Vet. León.
- 3) EISINGER, J. B. (1967).—*L'hydroxyprolinurie*. Th. Doct. Méd. Marseille, núm. 166.
- 4) GARCÍA PARTIDA, P.; Díez Prieto, I.; Prieto Montaña, F.; Gutiérrez Panizo, C. (1982).—Relation of vitamin D/ hidroxirolinuria in fowl. Ed. Walter de Gruyter. Berlín.
- 5) GARCÍA PARTIDA, P.; Rico Lenza, H.; del Río Vázquez, A.; Espinos Pérez, D. (1978).—Hydroxyprolinurie de la souris. *L'animal de laboratoire au service de l'homme*. Collection Fondation Merieux Lyon. France, pp. 127-130.
- 6) GOIDANICH, I. F.; Lenzi, L.; Silva, E. (1965).—Urinary hydroxyproline excretion in normal subjects and in patients affected with primary diseases of bone. *Clin. Chim. Acta*, **2**, 35-38.
- 7) GROSS, J. (1958).—Studies on the formation of collagen. II. The influence of growth rate on neutral salt extract of guinea pig dermis. *J. Exp. Med.*, **107**, 265.
- 8) JONSSON, G.; Pehrson, B.; Lundstrom, K.; Edqvist, L. E. and Blum, J. W. (1980).—Studies on the effect of the amount of calcium in the parturition diet on blood levels of calcium, magnesium, inorganic phosphorus, parathyroid hormone and hydroxyproline in milk fever prone cows. *Zbl. Vet. Med. A*, **27**, 173-185.
- 9) KIVIRIKKO, K. I.; Koivusalo, M.; Laitinen, O. and Liesma, M. (1963).—Effects of thyrosine on the hydroxyproline in rat urine and skin. *Acta Physiol. Scand.*, **57**, 462-467.
- 10) KIVIRIKKO, K. I.; Laitinen, O. (1965).—Clinical significance of urinary hydroxyproline determinations in children. *Ann. Paediat. Fenn. II.*, 148.
- 11) Klein, L.; Yen, S. S. C. (1970).—Urinary peptide hydroxyproline before and during postpartum involution on human uterus. *Metabolism*, **19**, 19.
- 12) Kowalewski, K.; Yong, S. (1967).—Bone and urinary hydroxyproline in normal and hypothyroid rat with a long bone fracture. *Acta endocr. (Kbh.)*, **56**, 547.
- 13) Laitinen, O.; Nikkila, E. A.; Kivirikko, K. I. (1966).—Hydroxyproline in the serum and urine. Normal values and clinical significance. *Acta Med. Scand.*, **179** (3), 275-284.
- 14) Neuman, R. E.; Logan, M. A. (1950).—The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.*, **184**, 299-306.
- 15) Prockop, D. J.; Kivirikko, K. I. (1967).—Relationship of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism. *Ann. Intr. Med.*, **66**, 1243-1266.
- 16) Prockop, D. J.; Sjoerma, A. (1961).—Significance of urinary hydroxyproline in man. *J. Clin. Invest.* (40), 483.
- 17) Rico Lenza, H.; del Río Vázquez, A.; Lozano Tonkin, C.; Espinos Pérez, D. (1977).—Correlación entre excreción urinaria de hidroxirolina y masa ósea, controles normales. *Med. Clin.*, **69** (10), 540-543.
- 18) Rico Lenza, H.; Lozano Tonkin, C.; del Río Vázquez, A.; Espinos Pérez, D. (1977).—Estudio de la eliminación urinaria de hidroxirolina en personas normales. *Biometrika II* (1), 17-20.
- 19) Smiley, J. D.; Ziff, M. (1964).—Urinary hydroxyproline excretion and growth. *Physiol. Rev.*, **44**, 30.
- 20) Smith, R.; Dick, M. (1968).—Total urinary hydroxyproline excretion after administration of vitamin D to healthy volunteers and a patient with osteomalacia. *The Lancet*, 279-281.
- 21) Turek, J.; Goverde, B. C. (1972).—Significado del ensayo de hidroxirolina en la orina. *Organon Teknika*. Barcelona.
- 22) Vanniménus, D. P. P. (1976).—Contribution à l'étude du dosage de l'hydroxyproline urinaire chez le chien sain et dans quelques cas pathologiques. *Th. Doct. Vét. Alfort*, núm. 96.
- 23) Weiss, P. H.; Klein, L. R. (1962).—The quantitative relationship of urinary peptide hydroxyproline excretion to collagen degradation. *J. Clin. Invest.*, **48**, 1-10.