

Dej
10/11



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD SERICA DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I (EC 3.4.15.1)
EN VARIAS ESPECIES DE MAMIFEROS Y EN RATAS BAJO
DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS**

T E S I S
Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
p r e s e n t a

MARIA ELENA IBARRA RUBIO

México, D. F.

1986



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.

I N D I C E

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO	i
I. INTRODUCCION	1
1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA	1
2. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I	9
2.1 Estructura	11
2.2 Localización y distribución	16
2.3 Sustratos y formas de medir la actividad de la ECA	20
2.4 Inhibidores	23
2.5 Modelos de estudio <u>in vitro</u>	27
2.6 ECA y enfermedad	28
II. OBJETIVOS	36
III. MATERIALES Y METODOS	37
1. MATERIALES	37
1.1 Reactivos	37
1.2 Equipo	37
1.3 Soluciones	38
1.4 Preparación del material	38
1.5 Animales de experimentación	38
1.5.1 Ratas	38
1.5.2 Conejos	40
1.5.3 Borregos	40
1.5.4 Ratones	40
1.5.5 Cobayos	40

	PAGINA
1.5.6 Perros	41
1.5.7 Caballos	41
1.5.8 Hamsteres	41
1.5.9 Hombres	41
2. METODOS	42
2.1 Sodio	42
2.2 Creatinina	42
2.3 Proteínas totales	42
2.4 Actividad plasmática de renina (APR) y concentración plas- mática de renina (CPR).	43
2.5 Aldosterona	43
2.6 Tensión arterial	46
2.7 Actividad sérica de la ECA	46
2.7.1 Fundamento	46
2.7.2 Recuperación de AH	51
2.7.3 Preparación de soluciones	51
2.7.4 Cálculo de la actividad de la ECA	51
2.7.5 Pruebas de reproducibilidad	52
2.7.6 Cálculo del gasto de sustrato	52
2.7.7 Curvas de linealidad	52
2.7.8 Determinación de la actividad de la ECA de las diferentes especies y modelos de ratas	52
2.7.9 Curvas de saturación	52
2.7.10 Curvas de inhibición	53
2.8 Pruebas estadísticas	53

	PAGINA
IV. RESULTADOS	54
1. VALIDACION DEL METODO PARA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA	54
1.1 Recuperación de AH	54
1.2 Pruebas de reproducibilidad	54
1.3 Curvas de linealidad y gasto de sustrato	54
2. CURVAS DE SATURACION	54
3. CURVAS DE INHIBICION	74
4. ACTIVIDAD DE ECA EN LAS DISTINTAS ESPECIES ESTUDIADAS . .	74
5. CARACTERIZACION DE LOS DIFERENTES MODELOS FISIOLÓGICOS Y PATOLOGICOS DE RATAS	78
5.1 Sodio	78
5.2 Creatinina	78
5.3 Renina	78
5.4 Tensión arterial	81
5.5 Síndrome nefrótico	81
6. ACTIVIDAD DE ECA EN LOS DIFERENTES MODELOS FISIOLÓGICOS Y PATOLOGICOS DE RATAS	83
V. DISCUSION	85
VI. CONCLUSIONES	94
VII. REFERENCIAS	95

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

A I	Angiotensina I
A II	Angiotensina II
A III	Angiotensina III
Abz	2-amino-benzoil
HHL	Hipurato de histidil leucina
HGG	Hipurato de glicil glicina
HA	Acido hipúrico
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
APR	Actividad plasmática de renina
CPR	Concentración plasmática de renina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
Km	Constante de Michaelis-Menten
I ₅₀	Concentración del inhibidor que produce el 50% de inhibición
Ki	Constante de inhibición
Ile ⁵ A I	Angiotensina I con una iso-leucina en posición 5
Val ⁵ A I	Angiotensina I con una valina en posición 5
des-Asp ¹ A I	Angiotensina I sin el Aspártico amino terminal.
BPF _{9a} y BPF _{5a}	Factores potenciadores de la bradisinina

Vmax	Velocidad máxima
ASB	Albumina sérica bovina
PM	Peso molecular
pI	Punto isoeléctrico
DSS	Dodecil sulfato de sodio
MK	De la compañía Merck
SQ	De la compañía Squibb
b	Ordenada al origen
n	Número de determinaciones
%B/Bo	Fracción porcentual unida de radiactividad al anticuerpo con respecto al máximo
cpm	Cuentas por minuto
DP	Desviación patrón
EP	Error patrón
D.O.	Densidad óptica
EC	Enzyme Comission
Fig.	Figura
^{125}I	Isótopo 125 del Yodo
i.e.	Esto es
et al.	Y colaboradores
Nba	Nitrobenzilamina
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Z	Benziloxycarbonil

aa	Aminoácido(s)
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspático
Cis	Cistefna
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Glutámico
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Fen	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tre	Treonina
Tir	Tirosina
Trp	Triptofano
Val	Valina
N	Grupo de ratas normales
↓Na	Grupo de ratas con dieta baja en sodio
Na 1%	Grupo de ratas con NaCl al 1% en el agua de beber
Na 2%	Grupo de ratas con NaCl al 2% en el agua de beber

HIP REN	Grupo de ratas hipertensas renovasculares
NEF	Grupo de ratas con síndrome nefrótico experimental
DESH	Grupo de ratas deshidratadas, sin agua de beber en dos días
BIN	Grupo de ratas binefrectomizadas
URE	Grupo de ratas urémicas por ligación ureteral
AN	Grupo de ratas anestesiadas con éter
IPT	Grupo de ratas inyectadas con isoproterenol
CLO	Grupo de ratas inyectadas con clonidina
PRO	Grupo de ratas inyectadas con propranolol
C terminal	Carboxilo terminal
N terminal	Amino terminal
d	Daltones
BOC	Butiloxicarbonilo

I I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) es un sistema hormonal que juega un papel central en el balance de líquidos y electrolitos y de la presión arterial. Participa de manera importante en algunos tipos de hipertensión lo cual, desde el punto de vista clínico, ha estimulado el interés por conocer la estructura, localización, regulación de síntesis y secreción, así como el mecanismo de acción de cada uno de sus componentes (Fig. 1)

Su estudio se inició desde el descubrimiento de la renina en 1898 por Tigersted y Bergman (1), quienes demostraron que cuando se administraban extractos de riñón de conejo intravenosamente a conejos, se producían elevaciones repentinas y prolongadas de la presión sanguínea. Debido a que en el tejido renal había una gran cantidad de renina, se pensó que esta era el agente causal de la hipertensión. Sin embargo no fue hasta después del trabajo de Goldblatt en 1934, que se dieron cuenta de la importancia real del sistema. Goldblatt descubrió que al colocar una pinza de plata de calibre controlado en ambas arterias renales (dos pinzas-dos riñones) o bien solo en una arteria (una pinza-dos riñones) se producía una reducción moderada del flujo sanguíneo y se desarrollaba una forma de hipertensión arterial persistente que se parecía a la forma humana de la enfermedad. Posteriormente Goldblatt demostró que en la hipertensión experimental producida de esta manera no participaba el sistema nervioso, ya que no se podía evitar por la simpatectomía completa, destrucción de la médula espinal o con el trasplante del riñón isquémico denerado. Por último, Goldblatt et al. demostraron que la hipertensión desaparecía si se ligaban las venas renales y muriendo el animal poco después por uremia aguda. Todo esto sugería que este tipo de hipertensión era causado por un agente humoral que obviamente era liberado por el riñón isquémico. Estos trabajos clásicos condujeron a la búsqueda inmediata de este agente humoral responsable de la elevación de la presión, redescubriéndose así a la renina descrita mucho tiempo antes (2).

En 1938 Friedman et al. encontraron que la renina no causaba vasoconstricción en la cola de perro aislada y perfundida. Dos años después, Page y Helmer, en los

ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-PHE-HIS-LEU-LEU-VAL-TIR-SER-R

SUSTRATO DE RENINA, una glucoproteína plasmática con un peso molecular de 58,000.



RENINA, una enzima producida por las células yuxtglomerulares del riñón y liberada a la circulación general por las venas renales.

ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-PHE-HIS-LEU + LEU-VAL-TIR-SER-R

ANGIOTENSINA I, un decapeptido que no tiene acción presora directa



ENZIMA CONVERTIDORA, contenida en los pulmones; actúa sobre el decapeptido en el plasma cuando pasa a través de la circulación pulmonar. También presente en plasma y otros tejidos. Requiere del ión cloruro para su activación.

ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-PHE + HIS-LEU

ANGIOTENSINA II, causa contracción del músculo liso arteriolar. Es la sustancia presora de acción directa más poderosa. Tiene otras acciones indirectas mediadas a través de la corteza adrenal.



ANGIOTENSINASA A, presente en plasma y tejidos

RECEPTORES ESPECIFICOS, localizados en el músculo liso vascular y corteza adrenal.

ASP + ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-PHE

ANGIOTENSINA III, causa liberación de aldosterona de la corteza adrenal

FIGURA 1. RELACIONES BIOQUIMICAS DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.

Estados Unidos y Braun-Menéndez y su grupo, en Argentina, demostraron que la renina era una enzima que actuaba sobre un sustrato en el plasma para producir un péptido estable al calor y dializable, que tenía propiedades vasoconstrictoras y un efecto presor corto pero potente. Este fue el primer paso en la elucidación del SRAA tal como lo conocemos hoy (Fig. 2).

Braun-Menéndez y su grupo nombraron a su péptido vasopresor hipertensina y al sustrato del cual se formaba hipertensinógeno, mientras que Page y Helmer usaron el término angiotonina para el péptido, y para el sustrato, sustrato de renina. Varios años después, cuando se supo que eran exactamente la misma sustancia, acordaron estos dos grupos en una reunión en 1961 en la Universidad de Michigan, llamarlo angiotensina (nombre híbrido de angiotonina e hipertensina) y al sustrato angiotensinógeno (1).

Por medio de dos experimentos se probó que la renina y la angiotensina eran verdaderos mediadores de la hipertensión en humanos y de la hipertensión experimental en animales (2) :

1. Se encontró que los niveles de angiotensina en sangre de los pacientes con hipertensión maligna estaban elevados 20 veces sobre el valor normal. Los niveles de angiotensina eran medidos en un extracto purificado a partir de la sangre de pacientes, por su actividad vasopresora en ratas.

2. La presión sanguínea en perros con hipertensión experimental pudo disminuirse a los valores normales por inmunización con extractos de riñón de cerdo, los cuales contenían renina.

En 1954 se obtuvo la primera preparación pura de angiotensina por Soffer *et al.* (2). Esto se consiguió por la incubación *in vitro* de renina cruda preparada a partir de riñón de cerdo, con sustrato de renina crudo obtenido de plasma de caballo. Pronto se obtuvo su composición y secuencia de aminoácidos (aa). La secuencia de aa de angiotensina I (A I) de varias especies se muestra en la Fig. 3 (3). Nótese que los aa que cambian en las diferentes especies son el 1,5 y 9. El procedimiento para la preparación de angiotensinógeno usado para la incubación con renina cruda con el objeto de preparar angiotensina *in vitro*, involucraba la precipitación con sulfato de amonio, seguido por diálisis contra agua destilada; pero en una ocasión, por razones desconocidas, se dializó contra cloruro de sodio 0.15 M en lugar de agua des-

BIOQUIMICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

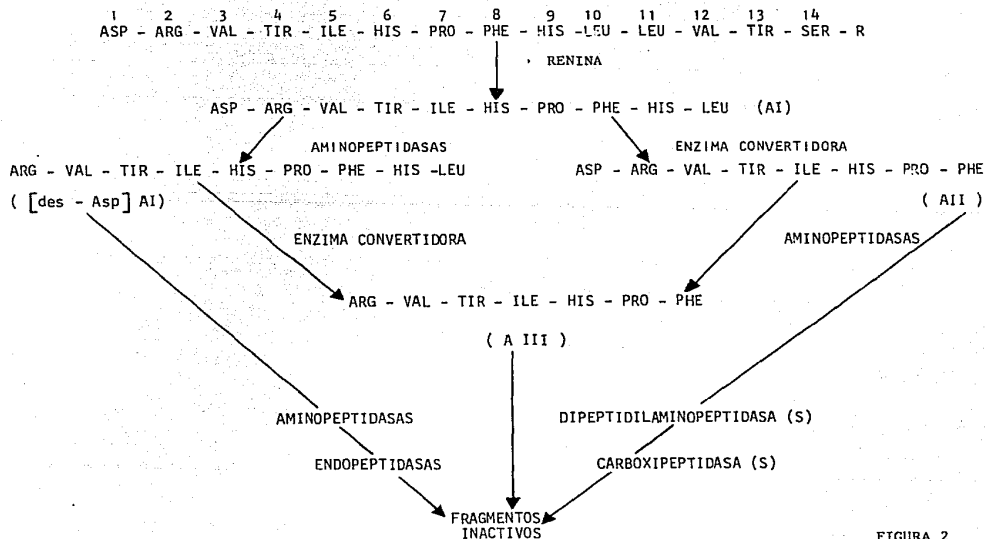


FIGURA 2

ESTRUCTURA DE ANGIOTENSINA I EN ESPECIES DE VERTEBRADOS REPRESENTATIVAS

PEZ TELEOSTEO A GLOMERULAR (PEZ GANSO)	<u>ASN</u> -ARG-VAL-TIR- <u>VAL</u> -HIS-PRO-PHE- <u>HIS</u> -LEU
PEZ TELEOSTEO GLOMERULAR (SALMON)	<u>ASN</u> -ARG-VAL-TIR- <u>VAL</u> -HIS-PRO-PHE- <u>ASN</u> -LEU
ANFIBIOS (RANA TORO)	<u>ASP</u> -ARG-VAL-TIR- <u>VAL</u> -HIS-PRO-PHE- <u>ASN</u> -LEU
REPTIL (SERPIENTE)	<u>ASX</u> -ARG-VAL-TIR- <u>VAL</u> -HIS-PRO-PHE- <u>TIR</u> -LEU
PAJARO (POLLO)	<u>ASP</u> -ARG-VAL-TIR- <u>VAL</u> -HIS-PRO-PHE- <u>SER</u> -LEU
MAMIFERO (BOVINO)	<u>ASP</u> -ARG-VAL-TIR- <u>VAL</u> -HIS-PRO-PHE- <u>HIS</u> -LEU
MAMIFERO (CABALLO, CERDO, RATA, PERRO, HUMANO, CONEJO, CABALLO)	<u>ASP</u> -ARG-VAL-TIR- <u>ILE</u> -HIS-PRO-PHE- <u>HIS</u> -LEU

FIGURA 3

tilada. Sorprendentemente el producto de la incubación, aunque presentaba la misma actividad vasopresora en ratas, tenía propiedades químicas muy diferentes. El péptido recién descubierto podía formarse a partir de la AI por la incubación con sustrato de renina crudo de caballo en presencia de cloruro de sodio. De esta forma casual se descubrió, que una enzima, con actividad dependiente de cloro, que se nombró enzima convertidora de angiotensina I (ECA), estaba presente en el plasma y convertía el producto inicial de la reacción, AI, en angiotensina II (AII) (2).

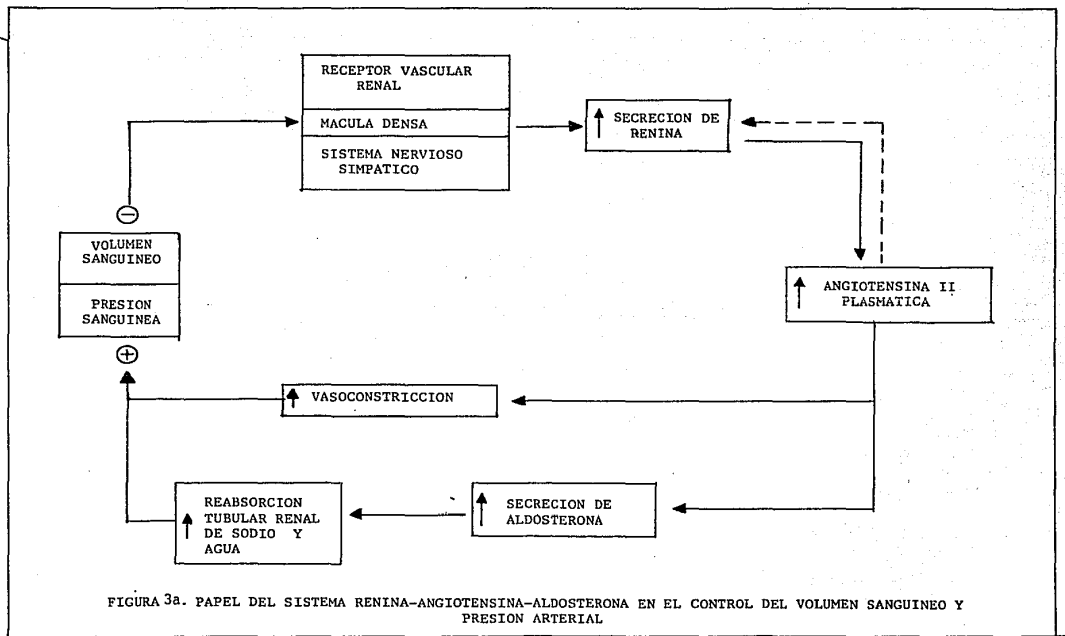
En resumen, el funcionamiento del SRAA es el siguiente (Fig. 1,2 y 3a)

1. El hígado produce el sustrato de renina llamado angiotensinógeno y lo libera al plasma. Este es una glucoproteína con un peso molecular (PM) de alrededor de 58,000 daltones (d) pero el PM sin los residuos de carbohidratos y calculado a partir de su secuencia de aa es de 49,548 d. (4).

2. La renina actúa hidrolíticamente sobre el angiotensinógeno para liberar, a partir de su extremo amino, la AI. La renina es una enzima producida principalmente por las células yuxtglomerulares del riñón y se libera a la circulación general por las venas renales. El decapeptido AI no tiene actividad vasopresora directa.

3. La ECA, que se encuentra principalmente en el pulmón, hidroliza a su sustrato AI en el plasma, liberando los dos aa de su extremo carboxilo. Como resultado de la actividad de la ECA se forma el octapeptido AII. Las acciones fisiológicas de AII son: a) Su potente efecto vasopresor, es la sustancia vasopresora más potente que se conoce (50 veces mayor al de la norepinefrina), durante mucho tiempo se pensó que esta era su única función. b) estimula la secreción de aldosterona; esta hormona esteroide promueve la reabsorción tubular de sodio y agua por lo que presenta efectos importante en el balance de estos; como consecuencia aumenta el volumen sanguíneo. Estas dos acciones fisiológicas de la AII son las principales reguladoras de la presión sanguínea (Fig. 3a). c) Aumenta la secreción de catecolaminas de las glándulas suprarrenales y facilita la transmisión adrenérgica. d) Actúa directamente en el cerebro para incrementar la presión sanguínea mediante el sistema nervioso simpático y parasimpático, para producir sed y estimular la secreción de vasopresina y ACTH. e) Inhibe la secreción de renina y estimula la secreción de angiotensinógeno.

La AII tiene una vida media muy corta (aproximadamente 30 segundos) y su producción continua depende de la presencia de sustrato de renina. Sin embargo, la concentración de angiotensinógeno en sangre, generalmente es constante para cada es-



pecie (Tabla I) (5), y de hecho es la cantidad de renina circulante la limitante principal en la producción de AII *in vivo*. A pesar de que la renina tiene una vida media mucho más larga en circulación (de 4 a 15 minutos), se requiere de un estímulo constante para la secreción de esta enzima.

TABLA I. CONCENTRACION DE ANGIOTENSINOGENO EN DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS

ESPECIE	ANGIOTENSINOGENO (μM)
Hombre	0.8 - 1.0
Borrego	0.4
Rata	0.3 - 0.5
Conejo	0.5 - 0.7

La AIII es producida por acción de la angiotensinasa A sobre la AII (Fig. 2). Esta enzima hidroliza el extremo amino (Asp) de la AII para formar el heptapéptido correspondiente, el cual también estimula la secreción de aldosterona, pero tiene un efecto presor menor. Como angiotensinasas se conocen colectivamente a un grupo de enzimas hidrolíticas (aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas) que degradan a las angiotensinas a sus correspondientes aa.

La renina modifica importantemente la actividad del sistema. En la actualidad se han descrito al menos cinco mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina en el riñón: a) Un barorreceptor intrarrenal que responde a cambios en la presión sanguínea, b) la cantidad del ión sodio (o posiblemente cloruro) que pasa por el segmento de mácula densa del túbulo distal renal, c) el sistema nervioso simpático y las catecolaminas circulantes, d) otros factores hormonales (e.g. AII, prostaglandinas, esteroides) y e) otros electrólitos plasmáticos (calcio, potasio, etc.) (6).

En los últimos años se han producido avances notables en el conocimiento de la bioquímica y fisiología del SRAA. Entre estos avances están: la purificación de renina (7), angiotensinógeno (8) y ECA (9-12), la obtención de la secuencia de aa de renina (13-15), angiotensinógeno (4) y la secuencia parcial de aa de la ECA (16,17); el desarrollo de potentes inhibidores de la ECA que han tenido aplicación clínica (18-21), el desarrollo de antagonistas de AII (22), el estudio del mecanismo intra-

celular de la secreción de renina (26), además de que también se ha hecho un amplio estudio a nivel filogenético (3). Con todo esto se ha comprendido mucho más la fisiología del SRAA, pero es claro que es más complejo de lo que se creyó en un principio y se requiere de mucha más investigación al respecto.

2. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I

La ECA libera los aa C terminales de una enorme variedad de sustrato sintéticos así como de los sustratos fisiológicos AI y bradisinina (Fig. 3b). La enzima fue descubierta accidentalmente en plasma de caballo por Skeggs *et al.* en 1950 (2), como ya se describió anteriormente. Por otra parte Erdős *et al.* (27) encontraron que una enzima presente en la fracción microsomal del homogenizado de riñón de cerdo así como en una fracción de globulina del plasma humano inactivaba a la bradisinina al liberar al péptido Fen-Arg también del extremo carboxilo; inicialmente esta enzima fue llamada cininasa II. Entonces, por una parte el péptido presor más potente, AII, era producido por la remoción enzimática de un dipéptido de la AI por la acción de la ECA, y el agente hipotensivo bradisinina, era inactivado por la liberación de un dipéptido C terminal mediante la cininasa II. Posteriormente se demostró que en realidad se trababa de la misma enzima con ambas actividades. Esto se demostró, primero por cromatografía y después por un bioensayo con una enzima parcialmente purificada. Las pruebas adicionales de que la ECA y la cininasa II eran la misma proteína se obtuvieron cuando estas fueron totalmente purificadas y se dispuso de sustratos peptídicos sintéticos, inhibidores específicos y anticuerpos contra la enzima (27).

Su clasificación según la Enzyme Commission es E.C. 3.4.15.1, es decir, pertenece al grupo de las hidrolasas, ya que cataliza la ruptura hidrolítica de un enlace ("3"); es una péptido hidrolasa porque actúa sobre un enlace peptídico ("4"); libera un péptido de un polipéptido, por lo que se clasifica como una peptidil-dipéptido-hidrolasa ("15"), y por cortar el extremo C terminal de sus sustratos se considera una dipéptidil carboxipeptidasa; y su número progresivo es el "1" (28).

La ECA tanto de tejidos como de plasma presenta dependencia de iones cloruro. El requerimiento de cloro cambia con el sustrato usado, por ejemplo, la hidrólisis de la AI se lleva a cabo solo en presencia de cloro, pero este no es indispensable para la hidrólisis de la bradisinina. Algunos autores reportan concentraciones óptimas para la ECA de diferentes especies (29); por ejemplo 800 mM para perro, 600 mM para

mono y humano y de 300 mM en tejido de conejo (29). En 1972, Cushman y Cheung (29) reportaron una concentración óptima de cloro de 300 mM para tejido de conejo. La concentración óptima de cloro para la ECA de pulmón de rata según Hayakari es de 600 mM (30). Estos estudios fueron hechos usando como sustrato sintético el hipurato de histidil-leucina (HHL) (29,30).

El pH óptimo para liberar ácido hipúrico (AH) a partir de HHL es de aproximadamente 8 para homogenados de tejidos arteriales de perro, mono, humano y conejo, según Miyasaki *et al.* (29), lo cual concuerda con el 8.3 obtenido para pulmón de conejo por Cushman y Cheung (31), el 8.0 para células endoteliales de aorta y pulmón de perro reportados por Oddi y Junod (29), el 8.3 para suero de humano reportado por Hurst y Lovell-Smith (32) y 8.3 para pulmón de rata reportado por Hyakari *et al.* (30).

La ECA es una metaloenzima que contiene Zn^{2+} , aunque también el Co^{2+} estimula la actividad de la enzima usando como sustrato HHL. En un experimento en donde se quitó el Zn^{2+} (33) de la enzima se vió que sin éste, la actividad es totalmente nula; cuando se adiciona Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} la actividad se restablece un 40, 100 y 160% del nivel original respectivamente. Este experimento se realizó en una fracción cruda de la ECA de pulmón de conejo. Más aún, las enzimas nativas puras de conejo y perro ensayadas con HHL son estimuladas por Co^{2+} e inhibidas por Mn^{2+} y cada uno de estos efectos es reversible por la adición de Zn^{2+} a las mezclas de reacción, el cual, por sí mismo no altera la reacción. Sin embargo se han obtenido resultados diferentes utilizando otros sustratos para la enzima, por ejemplo, furanocrioinil-fenil-lisil-lisina, con el cual adicionando Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} , se va de un 100 a un 55 y hasta un 25% de actividad respectivamente. La sustitución de este átomo de Zn^{2+} por Co^{2+} introduce una prueba paramagnética en el sitio activo y debe, por lo tanto, proporcionar una nueva dimensión para examinar el mecanismo de catálisis (33).

2.1 ESTRUCTURA

La enzima purificada muestra una sola banda de proteína después de la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y con DSS al 0.1%, de donde se concluye que la enzima está constituida por una sola cadena polipeptídica. Se sabe que las actividades para la hidrólisis tanto de HHL como de AI y bradicinina residen en esta proteína, ya que se ha mostrado que son coeluidas de la banda del gel

en el cual están presentes (34). Los residuos de aa aromáticos representan el 11.9% del total de los residuos de aa que componen a la ECA; este es un valor 45% mayor que el promedio derivado de un gran número de proteínas secuenciadas. La fracción de residuos hidrofóbicos calculados según Heller es del 44%, mientras que la relación de residuos polares a residuos no polares es del 1.2%. Estos datos indican que la enzima unida a las membranas posee una hidrofobicidad alta (34). La enzima de humanos parece ser más hidrofóbica que la variedad animal (35). Los valores de pI reportados para la ECA pura de varias fuentes (33) son muy parecidos como se puede apreciar en la tabla II.

TABLA II. VALORES DE pI PARA LA ECA DE VARIAS FUENTES (33)

FUENTE	pI
PULMON DE CERDO	4.3
PULMON DE CONEJO	4.75
PULMON DE BOVINO	4.48 - 4.53
RIÑON DE CERDO	5.2
RIÑON DE BOVINO	4.45
PLASMA HUMANO	4.6

Los residuos de azúcares constituyen aproximadamente el 26% del peso total de la proteína. La composición de aa y azúcares de la ECA de pulmón de conejo se muestra en la tabla III (34).

Probablemente la ECA es una peptidasa transmembranal con un ancla peptídica hidrofóbica insertada dentro de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. La ECA extraída de la membrana renal con detergente tiene una movilidad relativa ligeramente mayor que la enzima purificada del riñón después de tratarla con tripsina. La ECA extraída de cultivos de células endoteliales humanas con detergentes también presenta una movilidad relativa ligeramente mayor que la enzima renal purificada. La diferencia entre la movilidad relativa de las formas solubilizadas con detergentes y con tripsina de la enzima purificada es de menos de 10,000 d., y es bastante probable que se deba a la remoción del péptido ancla por la tripsina (35). Debido a que gran parte de la enzima está unida a la membrana se usan detergentes y solventes orgánicos para extraerla

TABLA III COMPOSICION DE AA Y CARBOHIDRATOS DE LA ECA DE PULMON DE CONEJO.

AA O CARBOHIDRATO	μg POR mg DE PROTEINA	RESIDUOS POR MOL DE ENZIMA
LISINA	38.1	35
HISTIDINA	30.1	26
ARGININA	55.6	42
ACIDO ASPARTICO	83.7	86
TREONINA	33.1	38
SERINA	35.8	49
ACIDO GLUTAMICO	95.8	88
PROLINA	41.0	50
GLICINA	22.7	47
ALANINA	42.7	71
CISTEINA	11.7	13
VALINA	41.0	49
METIONINA	28.5	26
ISOLEUCINA	31.9	33
LEUCINA	80.5	84
TIROSINA	51.6	38
FENILALANINA	48.4	39
TRIPTOFANO	35.9	23
TOTAL	808	837
FUCOSA	4.8	4
MANOSA	58.4	43
GALACTOSA	78.3	57
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	91.0	53
ACIDO N-ACETIL-NEURAMINICO	46.6	19
TOTAL	279	176

de homogenados crudos, estos métodos de extracción así como el alto contenido de carbohidratos, pueden contribuir a las discrepancias tan grandes de PM reportadas, que van de 129,000 a 480,000 d (27).

La enzima presenta un espectro típico de una proteína en el rango UV, con una

absorción máxima a 280 nm y mínima a 250 nm. Una solución que contiene 1 mg de la enzima por ml tiene una D.O. de 0.78, 1.10 y 1.95 a 230, 260 y 280 nm respectivamente. Este último valor probablemente refleja el alto contenido de residuos de Trp en la proteína. Se deduce de la D.O. a 280 nm que el coeficiente de extinción molar de la enzima a esta longitud de onda es 2.3×10^5 . La enzima no absorbe en la región visible a una concentración de 1 mg/ml (34).

La especificidad de la ECA es conferida por los sitios de unión del sustrato. Algunos investigadores han indicado que la naturaleza de los aa a cada lado del grupo carbonilo escindido son particularmente importantes y determinan la fuerza de unión del péptido y el grado de especificidad del sustrato. Otros autores han propuesto que el sitio activo de la ECA es una extensa hendidura lineal que puede acomodar un polipéptido hasta con un máximo de 10 residuos de aa (36).

Los grupos funcionales catalíticamente esenciales en el sitio activo de la ECA incluyen los aa Arg, Tir, Lis y Glu y el complejo del ión Zn^{2+} (Fig. 4). Un pequeño péptido que contiene el residuo de Glu del sitio activo se ha aislado y su secuencia se muestra en la Fig. 5, la cual se compara con las secuencias de aa correspondientes de la carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B y termolisina (otras proteasas dependientes de Zn) en las cuales el papel catalítico del Glu está apoyado por información del análisis de rayos X. Hay una homología en las secuencias de aa con las proteasas de mamíferos que dependen de Zn en 5 de los primeros 8 residuos. Solo dos de los primeros 8 residuos son homólogos con la termolisina, una proteasa bacteriana dependiente de Zn. Cuando las secuencias se arreglan para un alineamiento máximo, es evidente que la ECA muestra solo una delación (Fen) en el lado amino del residuo Glu catalítico. La secuencia Glu-Leu es común en cada una de las proteasas dependientes de Zn, y en las secuencias de las proteasas de mamíferos uno o dos residuos de Phe preceden al Glu catalítico. Estos aa hidrofóbicos pueden contribuir al medio ambiente no polar de estas enzimas durante la catálisis (16).

Aún no hay información sobre qué residuos de aa funcionan como ligadores del ión Zn de la ECA o si éste está presente en un estado pentacoordinado como se ha demostrado recientemente para la carboxipeptidasa A (37). Así como en esta enzima, el ión de Zn de la ECA no juega ningún papel en la unión del sustrato, pero aparentemente está involucrado en la ruptura del enlace amida escindido por la polarización del grupo carbonilo y de la amida y así facilitando el ataque nucleofílico del carboxilato glu-

absorción máxima a 280 nm y mínima a 250 nm. Una solución que contiene 1 mg de la enzima por ml tiene una D.O. de 0.78, 1.10 y 1.95 a 230, 260 y 280 nm respectivamente. Este último valor probablemente refleja el alto contenido de residuos de Trp en la proteína. Se deduce de la D.O. a 280 nm que el coeficiente de extinción molar de la enzima a esta longitud de onda es 2.3×10^5 . La enzima no absorbe en la región visible a una concentración de 1 mg/ml (34).

La especificidad de la ECA es conferida por los sitios de unión del sustrato. Algunos investigadores han indicado que la naturaleza de los aa a cada lado del grupo carbonilo escindido son particularmente importantes y determinan la fuerza de unión del péptido y el grado de especificidad del sustrato. Otros autores han propuesto que el sitio activo de la ECA es una extensa hendidura lineal que puede acomodar un polipéptido hasta con un máximo de 10 residuos de aa (36).

Los grupos funcionales catalíticamente esenciales en el sitio activo de la ECA incluyen los aa Arg, Tir, Lis y Glu y el complejo del ión Zn^{2+} (Fig. 4). Un pequeño péptido que contiene el residuo de Glu del sitio activo se ha aislado y su secuencia se muestra en la Fig. 5, la cual se compara con las secuencias de aa correspondientes de la carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B y termolisina (otras proteasas dependientes de Zn) en las cuales el papel catalítico del Glu está apoyado por información del análisis de rayos X. Hay una homología en las secuencias de aa con las proteasas de mamíferos que dependen de Zn en 5 de los primeros 8 residuos. Solo dos de los primeros 8 residuos son homólogos con la termolisina, una proteasa bacteriana dependiente de Zn. Cuando las secuencias se arreglan para un alineamiento máximo, es evidente que la ECA muestra solo una deleción (Fen) en el lado amino del residuo Glu catalítico. La secuencia Glu-Leu es común en cada una de las proteasas dependientes de Zn, y en las secuencias de las proteasas de mamíferos uno o dos residuos de Phe preceden al Glu catalítico. Estos aa hidrofóbicos pueden contribuir al medio ambiente no polar de estas enzimas durante la catálisis (16).

Aún no hay información sobre qué residuos de aa funcionan como ligadores del ión Zn de la ECA o si éste está presente en un estado pentacoordinado como se ha demostrado recientemente para la carboxipeptidasa A (37). Así como en esta enzima, el ión de Zn de la ECA no juega ningún papel en la unión del sustrato, pero aparentemente está involucrado en la ruptura del enlace amida escindido por la polarización del grupo carbonilo y de la amida y así facilitando el ataque nucleofílico del carboxilato glu-

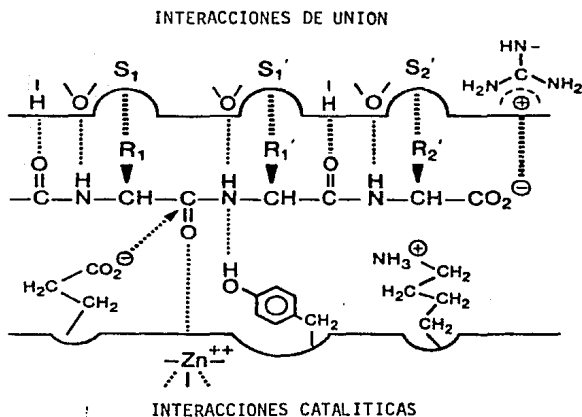


FIGURA 4 ESQUEMA HIPOTETICO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA ECA (37)

TERMOLISINA	ALA	HIS	GLU	LEU	THR	HIS	ALA	VAL	THR	ASP	TIR	THR	
CARBOXIPEPTIDASA A	PHE	THR	PHE	GLU	LEU	ARG	ASP	THR	GLI	ARG	THR	GLI	PHE
CARBOXIPEPTIDASA B		THR	PHE	GLU	LEU	ARG	ASP	LIS	GLI	ARG	THR	GLI	PHE
ECA	PHE	THR		GLU	LEU	ALA	ASP	SER	GLU	SER	VAL	VAL	LEU

FIGURA 5. SECUENCIAS DE AMINOACIDOS QUE CONTIENEN AL SITIO ACTIVO DE VARIAS PROTEASAS QUE DEPENDEN DE Zn^{2+} .

támico (Fig. 4). Los residuos de Arg y Lis presentes en el sitio activo de la ECA probablemente se requieren para la unión del sustrato. Lo más factible es que la Arg se requiera para la interacción iónica con el grupo C terminal del sustrato como se ha demostrado claramente para la carboxipeptidasa A en estudios cristalográficos. La Lis debe estar involucrada en el mecanismo de activación del ión Cl^- . El Cl^- y otros aniones monovalentes aumentan la actividad hasta un grado límite que varía de acuerdo a la estructura del sustrato y al pH (37).

2.2 LOCALIZACION Y DISTRIBUCION

En un principio se pensó que el sitio de conversión de AI en AII era el plasma y posteriormente el endotelio vascular del pulmón. Después se observó que otros tejidos también podían convertir AI. En experimentos en donde péptidos marcados se pasan a través de la circulación pulmonar en ratas o perros, alrededor de la mitad de una dosis dada es convertida en AII al pasar solo una vez por el pulmón. Ryan et al. estimaron que se producía de un 15 a un 20% de AII después de perfundir AI a través del pulmón de rata. En rata y cobayo las inyecciones de AI intravenosas e intrarteriales tienen efectos presores cercanamente equipotentes, lo cual indica la existencia de sitios de conversión de AI diferentes a los del lecho vascular pulmonar (27).

En contraste, la bradisinina que tiene una vida media más corta en sangre que la AI o AII es casi completamente inactivada en la circulación pulmonar. En el hombre, durante la cateterización cardíaca, se ha visto de un 20 a un 40% de conversión de AI en sujetos normales. Si las concentraciones de renina y AI en sangre venosa y arterial son similares, entonces los lechos vasculares extrapulmonares son de obvia importancia en la conversión del péptido en circulación. Dicha conversión periférica y una dosis dada de AI se ha observado tanto en niños como en adultos y en varias especies de animales de laboratorio. Debido a que algunos de estos lechos vasculares están en órganos blanco de la AII, el octapéptido generado en estas mismas áreas no regresa a la circulación, sino que es metabolizado ahí mismo. Esto se aplica tanto para las glándulas suprarrenales, como para el riñón. En contraste, el pulmón libera el producto de la conversión, AII, a la circulación arterial. La concentración de la enzima en el endotelio vascular puede variar, es bastante alto en la arteria pulmonar mientras que es muy pequeña en los glomérulos renales aislados (27).

En el pulmón, las células de la superficie del endotelio vascular son ricas en ECA y esta puede localizarse en las vesículas pinocíticas de las células endoteliales.

Más aún, las células endoteliales vasculares aisladas del conejo presentan alguna actividad enzimática (27).

Las células humanas endoteliales de la vena umbilical que crecen en cultivo de tejidos son una fuente adicional de la enzima. La ECA en la superficie de las células intactas puede convertir la AI o inactivar la bradicinina. El endotelio vascular en el pulmón no es la única fuente de ECA. Los nódulos linfáticos de los pulmones de pacientes que padecen sarcoidosis contienen más ECA que los nódulos linfáticos normales. Probablemente aquí las células epiteliales sintetizan la enzima y esto lleva a un nivel elevado en plasma (27).

La concentración de ECA en plasma varía de especie a especie, por ejemplo, el plasma de cobayo tiene el nivel más alto de ECA de los animales estudiados y el plasma de perro presenta sólo trazas de ésta. El origen de la enzima plasmática no está establecido definitivamente. Como ya se dijo, hay estudios recientes que muestran una actividad más alta que la normal en plasma de pacientes con sarcoidosis indicando que esta puede ser generada por el pulmón. Debido a que la linfa renal contiene gran cantidad de ECA, ésta también puede ser liberada por el riñón. La histamina, liberadores de histamina y el choque anafiláctico pueden liberar ECA del pulmón perfundido y libre de sangre, indicando que el daño al pulmón puede dar por resultado la pérdida de la actividad enzimática (38). Las técnicas de inmunofluorescencia han mostrado que la ECA se localiza en las membranas celulares del endotelio vascular hacia el lumen del vaso. Las células endoteliales vasculares en cultivo presentan altos niveles de ECA y liberan la enzima al medio de cultivo en grandes cantidades, apoyando esto la idea de que el endotelio vascular puede ser otra fuente de ECA plasmática (5).

La ECA se encuentra en los lechos vasculares de virtualmente todos los órganos. La conclusión de que los pulmones son el sitio más importante para la generación de AII circulante puede relacionarse con el contenido relativamente alto de ECA en el pulmón, lo cual probablemente refleja la magnitud de su lecho vascular y su localización estratégica ya que recibe toda la sangre venosa que sale del corazón, y, tal vez lo más importante, es el hecho de que la AII permanece como tal después del paso a través de la circulación pulmonar sin ninguna extracción, y esto puede deberse a que el lecho vascular pulmonar es deficiente en receptores de AII.

Las células renales de origen epitelial también presentan una alta concentración de ECA. Utilizando anticuerpos fluorescentes contra ECA, esta puede encontrarse a lo

largo de la nefrona, pero especialmente concentrada en las células de los túbulos proximales en el cerdo y en el conejo. Cuando se aisló el borde en cepillo de los túbulos proximales por centrifugación diferencial, se vió que la actividad específica relativa de ECA es 10 veces mayor que en el homogenado crudo de la corteza renal. La microfotografía electrónica de barrido de las fracciones aisladas muestra una enorme superficie del borde en cepillo en donde se localiza la enzima. La misma preparación también presenta una actividad muy alta de angiotensinasa (probablemente angiotensinasa A). Por lo tanto, la AI y la bradiginina que escapan a la degradación en la superficie endotelial de la arteria renal pueden ser filtradas por el glomérulo e hidrolizadas en el borde en cepillo de los túbulos proximales. La AII generada también es inactivada en la superficie de las mismas células, indicando que estos péptidos son degradados cuando entran a la nefrona (27). Ésto es, la presencia de una alta concentración de enzima en el borde en cepillo del epitelio del túbulo renal indica que la enzima en el riñón tiene funciones diferentes a la degradación del los péptidos circulantes. Ésta puede inactivar a la bradiginina y convertir a la AI después de que han sido filtradas al glomérulo (38).

Aunque la ECA en el pulmón y en el riñón de humano se origina de diferentes tipos de células (endoteliales y epiteliales respectivamente), las porciones proteínicas parecen ser similares o idénticas. Estudios de doble inmunodifusión muestran que ambas enzimas presentan reacción cruzada con anticuerpos desarrollados contra la enzima pulmonar o la renal. Sin embargo, se han encontrado diferencias en los residuos de carbohidratos (35).

Se ha utilizado el anticuerpo contra ECA humana para localizarla en los distintos tejidos incluyendo el sistema nervioso central y para desarrollar un procedimiento de RIA de la enzima (35). En el cerebro, así como en otros órganos, la ECA parece estar unida a las membranas plasmáticas. El plexo coroide es particularmente rico en ECA, donde está concentrada en la superficie de las células epiteliales cuboidales de cara al líquido cerebrospinal. El plexo coroide está en vecindad inmediata del cuerpo subfornical, en donde la AII ejerce su potente acción dipsogénica, por lo tanto, la presencia de la ECA en el plexo coroide puede ser más que una coincidencia. Con la ayuda de la inmunohistoquímica, la ECA también se ha encontrado en el cuerpo subfornical mismo. Se ha identificado la ECA en las dendritas de células en varias regiones del cerebro humano así como el globus pallidus y en la sustantia nigra. Otras estructuras, así como el sistema neurosecretorio magnocelular del hipotálamo, también son ricas en ECA (35).

Las porciones proteínicas de la ECA que se originan de células endoteliales, epiteliales o neuroepiteliales parecen ser inmunológicamente idénticas (36).

Se ha encontrado alta actividad de ECA en el líquido seminal humano, en las glándulas pituitarias y en la retina de perros y conejos (27). También se ha identificado y caracterizado parcialmente la ECA de piel de ratón y de humano (39).

En las dos especies de mamíferos en las que se ha estudiado hasta la fecha (e.g. rata y conejo), la ECA testicular presenta diferentes propiedades fisicoquímicas e inmunológicas, y una susceptibilidad a la regulación hormonal que la hacen una isoenzima única de la ECA distribuida ordinariamente por todo el cuerpo. La isoenzima testicular parece ser una versión de menor PM que la enzima pulmonar, con propiedades catalíticas similares aunque no idénticas.

Las secuencias de aa N y C terminales son diferentes en la isoenzima testicular y de pulmón, de donde se infiere que sus ARNm también son diferentes. La secuencia N terminal de ECA testicular de conejo es: (NH_2) -Arg-Arg-Val-Ser-Asn-Asn-Gln-Ser-Ser mientras que su secuencia C terminal es: (Fen, Ala)-Glu-Leu-Ser-(COOH), y la secuencia N terminal de la ECA pulmonar de la misma especie es: (NH_2) -Thr-Leu-Asp-Pro-Gli-Leu-Leu-Pro-Gli-Asp, y en el extremo carboxilo es: (Fen, Tir)-Ser-Leu-Ala-(COOH) (17). Más aún, los estudios inmunológicos de reacción cruzada y los experimentos de mapeo peptídico, sugieren que la ECA testicular tanto de rata como de conejo, tienen estructuras terciarias diferentes a sus contrapartes pulmonares (40). La isoenzima testicular está bajo control androgénico ya que se han hecho experimentos que sugieren que se requiere la pituitaria para el desarrollo y mantenimiento de la enzima por la estimulación de la esteroidogénesis en los testículos. También se ha comprobado que la ECA testicular se encuentra asociada a las células germinales (41). Aunque su función está por elucidarse, la isoenzima testicular proporciona un modelo excelente para el estudio de la regulación tejido-específica de las carboxipeptidasas (40). Lanzillo *et al.* encontraron que la ECA purificada de pulmón, riñón, testículos, plasma sanguíneo y líquido seminal presentan propiedades catalíticas y cinéticas similares en relación a su acción con sustratos, inhibidores e inmunoglobulina anti-ECA (42).

La actividad de dipeptidil-carboxipeptidasa está ampliamente distribuida en la naturaleza. Se ha detectado en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, aunque la proteína responsable de las cuatro primeras fuentes aún no se ha caracterizado. Su presen-

cia en el pez perro espinoso, un elasmobranquio que carece de células yuxtglomerales renales, se sugiere por el hecho de que SQ20 881 (teprótido, un inhibidor específico de la ECA) previene el efecto vasopresor de la AI, pero no el de la AII. Interesantemente, en este organismo la respuesta presora de ambas angiotensinas y de la norepinefrina se bloquea con la fentolamina, un antagonista de los receptores alfa adrenérgicos (33).

También se ha encontrado actividad de ECA en bacterias tales como E. coli (43), Bacillus subtilis (44) y Corynebacterium equi (45).

2.3 SUSTRATOS Y FORMAS DE MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ECA

La ECA hidroliza una variedad de péptidos incluyendo a la angiotensina I, a la bradiginina, a las encefalinas y muchos tripéptidos por el extremo C terminal. De los péptidos biológicamente activos, las que se hidrolizan más rápido in vitro son las encefalinas, pero debido a la alta Km, la constante de especificidad (Kcat/Km) es menos favorable que la de la bradiginina o AI. De los péptidos que se han probado, la bradiginina es la que presenta mayor afinidad por la ECA (35).

La síntesis de AI radiactiva y la separación cromatográfica y electroforética de los productos de la reacción enzimática, impulsaron a los investigadores a medir la actividad de la ECA a concentraciones bajas de sustrato para fines no biológicos. Los primeros sustratos peptídicos más cortos que la AI representan la secuencia C terminal protegida de la AI, así como el HHL. Estos péptidos se han utilizado en ensayos químicos de la enzima. Cuando se encontró que la ECA hidrolizaba uniones peptídicas de una gran variedad de aa, se sintetizaron otros sustratos peptídicos. Los más sencillos fueron tripéptidos de Gli protegidos así como HGG. Otros sustratos tiene grupos cromóforos, así como $p(\text{NO}_2)\text{Phe}(t\text{-BOC-}p(\text{NO}_2)\text{-Phe-Phe-Gli})$. La hidrólisis de esos sustratos se determina con técnicas espectrofotométricas UV o fluorométricas (27).

La Km de estos sustratos (HHL y HGG) varía cuando son hidrolizados por ECA de diferentes fuentes. La Km de los sustratos más cortos ópticamente activos, así como los derivados del hipurato, es de alrededor de 10^{-3}M . Los valores de Km para AI y bradiginina son mucho más bajos. La AI presenta una Km del orden de 10^{-5}M . La Km para la bradiginina es de 10^{-7}M en presencia de iones Cl y $4 \times 10^{-6}\text{M}$ en ausencia de estos iones (27).

Se han encontrado sustratos con importancia biológica potencial además de las ci-

ninas, AI o encefalinas. Por ejemplo, la encefalina Arg⁶-Phe⁷ que es un péptido opioide presente en el cerebro y en las glándulas suprarrenales la cual es convertida a encefalina por acción de la ECA gracias a la remoción del dipéptido C terminal. La neurotensina, un tridecapéptido, es más largo que los otros sustratos de ECA, sin embargo, este es hidrolizado in vitro liberándose el dipéptido C terminal Ile¹²-Leu¹³ (35).

Otro neuropéptido importante es la sustancia P que es un undecapéptido (Arg¹-Pro-Lis³-Pro-Gln⁵-Gln-Fen⁷-Fen-Gli⁹-Leu-Met¹¹-NH₂) que se ha identificado como un neurotransmisor y modulador potencial en los sistemas nervioso central y periférico, y que si se administra periféricamente actúa como un potente vasodilatador. Esta sustancia P parecía poco probable como sustrato para la ECA ya que presenta un extremo carboxilo bloqueado (Met¹¹-NH₂). Sin embargo, algunos estudios han proporcionado evidencias indirectas de que la ECA hidroliza la sustancia P. Por ejemplo, los inhibidores de la ECA protegen a la sustancia P contra la degradación en sangre y tejidos, y las células endoteliales humanas cultivadas inactivan esta sustancia. Además, la ECA se localiza en las dendritas palidonegras y coincide marcadamente bien con la distribución celular de la sustancia P (35). La ECA humana realmente hidroliza la sustancia P in vitro pero libera principalmente el tripéptido C terminal protegido (Gln⁹-Leu¹⁰-Met¹¹-NH₂) y solo una pequeña cantidad de dipéptido. La liberación del tripéptido protegido se ha observado empleando ECA de cerebro de rata o de pulmón de conejo. Como ya se ha mencionado el sitio activo de la ECA contiene una Arg cargada positivamente, la cual probablemente interacciona con el grupo C terminal de los sustratos. Para establecer si este residuo se requiere para la hidrólisis de la sustancia P, se puso a reaccionar la ECA con ciclohexadiona o butanodiona para bloquear los residuos de Arg. La hidrólisis de la bradisinina y sustancia P fue similarmente inhibida (80 a 93%) después del tratamiento de la ECA. Por lo tanto, se necesita un residuo de Arg, probablemente en el sitio activo para la hidrólisis tanto de sustratos con aa C terminales libres, como de sustratos con aa C terminales bloqueados. Esto, junto con el hecho de que la ECA libera principalmente un tripéptido de la sustancia P, indica que la Arg del sitio activo puede interactuar con el oxígeno del carboxilo de la Leu¹⁰ de la sustancia P debido a la falta de un COO⁻ terminal. De acuerdo con el modelo para el sitio activo de la ECA, esto debe permitirle al Zn⁴⁺ del sitio activo formar un complejo con el oxígeno del grupo carbonilo de la Fen⁸, permitiendo el ataque nucleofílico del agua en el enlace peptídico Fen⁸-Gli⁹, y dando por resultado la liberación del tripéptido C terminal Gln⁹-Leu¹⁰-Met¹¹-NH₂. La pequeña cantidad de dipéptido liberada puede ser resultado similarmente de la interacción de la Arg

del sitio activo con el oxígeno del grupo carbonilo de $\text{Met}^{11}\text{-NH}_2$ (35).

Es probable que las interacciones de un sustrato C terminal bloqueado sean mucho más débiles que el enlace iónico de un sustrato con un grupo carbonilo libre negativamente cargado. Por cierto, el ácido libre derivado de la sustancia P ($\text{Met}^{11}\text{-OH}$) es hidrolizado mucho más rápido por la ECA produciendo el dipéptido C terminal como producto. El ácido libre también tiene una afinidad mayor por la ECA que la sustancia P. Así es que, mientras que los sustratos con aa C terminales libres se hidrolizan con una eficiencia mayor, los péptidos con el extremo C terminal bloqueado pueden también ser hidrolizados por la ECA. Otros péptidos con aa C terminales protegidos puede ser hidrolizados también por la ECA, por lo tanto, algunas de las acciones de los inhibidores de ECA administrados in vivo pueden explicarse por la inhibición de la hidrólisis de péptidos además de la bradisinina y de la AI (35).

La tabla IV resume la información de la estructura de los sustratos. La estructura general es $R_1\text{-}R_2\text{-}R_3\text{-OH}$. La enzima hidroliza entre R_1 y R_2 ; R_1 puede ser un aa protegido por un péptido; R_3 debe ser un aa con un C terminal libre (que no es tan estricto como ya se vió con la sustancia P), pero no Glu; R_2 puede ser cualquier aa excepto Pro, ya que los péptidos que tienen una Pro en esta posición no son hidrolizados. Este hecho explica por qué la AII no es hidrolizada adicionalmente por la ECA (27).

TABLA IV. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS SUSTRATOS DE LA ECA

Sustratos representativos	Nombre del sustrato
$\text{-}R_1\text{-}R_2\text{-}R_3\text{-OH}$	
$\text{-}Pro^7\text{-}Fen^8\text{-}Arg^9$ *	bradisinina
$\text{-}Fen^8\text{-}His^9\text{-}Leu^{10}$ *	angiotensina I
$\text{-}Pro^{28}\text{-}Lis^{29}\text{-}Ala^{30}$ *	cadena beta de la insulina
$\text{-}Hip\text{-}Gli\text{-}Gli$ *	
$\text{-}Hip\text{-}His\text{-}Leu$ *	

* enlace hidrolizado por la ECA.

Los ensayos para medir la actividad de la ECA se basan en la medición de la cantidad de dipéptido liberado del sustrato, o bien, en la porción N terminal protegida de la molécula hidrolizada del sustrato.

El dipéptido puede medirse por un método de flujo continuo automatizado o en un analizador de aa, o bien en un fluorómetro (46) después de unir el residuo histidil a un compuesto fluorescente. El AH liberado de sustratos tales como HHL o HGG, se puede medir después de la extracción en la mezcla de incubación con un solvente orgánico o registrando directamente su liberación en el espectrofotómetro UV. Cuando se utilizan sustratos marcados radiactivamente, los sustratos no hidrolizados y los productos tienen que ser separados por cromatografía o por electroforesis (38).

Para mayor información sobre algunos métodos para medir la actividad de la ECA se pueden revisar las referencias 46-51.

2.4 INHIBIDORES

La ECA es inhibida in vitro por numerosos compuestos, entre ellos están los di péptidos liberados de la AI o de la bradiginina (His-Leu y Fen-Arg) y agentes quelantes tales como el EDTA, o-fenantrolina y 8-hidroxiquinoleína. Los sustratos competitivos de la ECA así como la bradiginina o el HHL bloquean la conversión de AI. Los derivados de AI que probablemente son resistentes a la conversión enzimática, como Ile⁸ o Fen⁴-Tir⁸-AI, inhiben a la ECA. También se ha observado que los compuestos sulfhidrilo potencian la actividad in vitro de la bradiginina en el ileon aislado de cobayo. Los compuestos como el mercaptoetanol o dimercaptopropanol también incrementan la acción hipotensiva de la bradiginina en varios animales experimentales. La potenciación de los efectos de la bradiginina pueden deberse, al menos en parte, a la inhibición de la ECA. Esto se puede lograr por la unión del cofactor metálico divalente de la enzima, pero también por la reducción de algunos puentes disulfuro sensibles en la protefina (27).

Los análogos estructurales de la AI modificados en algunas posiciones de la cadena polipeptídica inhiben la conversión de la AI. El tripéptido N terminal de la bradiginina, Arg-Pro-Pro, es un inhibidor in vitro. Entre otros péptidos que se encuentran en el cuerpo, la insulina, la cadena beta de la insulina y el glutatión también son inhibidores in vitro (38).

El veneno de algunas serpientes como Bothrops jararaca, especie sudamericana y Agkistrodon halys blomhoffi, especie asiática, también potencian la acción de la bradicinina in vitro posiblemente por la inhibición de la ECA. En realidad el primer agente que se reportó (por Ferreira et al, 1970) que tenía un factor potenciador de bradicinina fue el veneno de la B. jararaca y posteriormente se demostró que se formaba de nueve péptidos individuales, cada uno capaz de inhibir la actividad de cininasa y algunos de estos péptidos también con capacidad de inhibir el efecto presor de AI. Algunos de estos péptidos ya han sido sintetizados (52). El nonapéptido SQ 20 881 (BPF_{9a}, teprótido, o bien V-6-1) y el undecapéptido "potenciador C" efectivamente inhiben la hidrólisis de la AI o de la bradicinina in vitro e in vivo como inhibidores competitivos reversibles. El SQ 20 881 fue el primer inhibidor de la ECA probado clínicamente y ha sido el más ampliamente utilizado. Es un inhibidor específico tanto de ECA como de cininasa II y es efectivo en un rango de concentración μM . Aunque es una herramienta ampliamente utilizada en la investigación tiene un valor clínico limitado, ya que es activo solo cuando se suministra parenteralmente y tiene una vida media muy corta (5).

Los estudios de estructura-afinidad con análogos del SQ 20 881 y BPP_{5a} indican que estos péptidos del veneno compiten con los sustratos de la ECA con importancia biológica, así como la AI y la bradicinina por la interacción de su tripéptido C terminal con los sustitutos S_1 , S_1' y S_2' en el sitio activo de la enzima. (Fig. 6) (18).

Las propiedades de la ECA, en particular la dependencia de su actividad de un metal y un carácter de exopeptidasa, son similares a aquellas bien conocidas de las carboxipeptidasas A y B pancreáticas (52). Esta similitud ha llevado al desarrollo de un modelo de trabajo hipotético del sitio activo de la ECA basado en el conocido sitio activo de la carboxipeptidasa (exopeptidasa A) (Fig. 4), y el uso de este modelo ha sido la guía para el diseño de potentes inhibidores que dieron paso al descubrimiento de la droga antihipertensiva captopril (SQ 14 225). Este se desarrolló por la evolución de una serie de inhibidores análogos de dos productos dicarboxílicos diseñados para unirse al sitio activo de la ECA de manera similar a la unión del potente inhibidor competitivo ácido benzil succínico a la carboxipeptidasa A. Se propuso que los aa C terminales de tales análogos se unen iónicamente al sitio de reconocimiento positivamente cargado en la exopeptidasa y el segundo carboxilo interactúa fuertemente con el ión de Zn^{2+} catalíticamente funcional (18). Por lo tanto, los

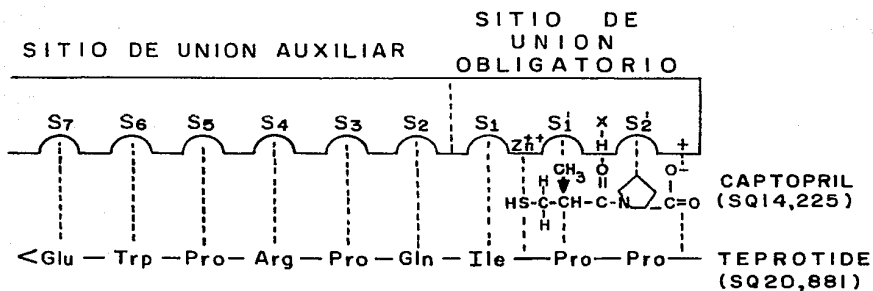


FIGURA 6. ESQUEMA HIPOTETICO DE UNION DEL CAPTOPRIL Y DEL TEPROTIDE AL SITIO ACTIVO DE LA ECA.

análogos que tienen un grupo sulfhidrilo, el cual actúa como un fuerte ligador de Zn^{2+} , en gran proximidad a un dipéptido C terminal el cual confiere la especificidad de unión, son los inhibidores más efectivos de la ECA. El captopril (SQ 14 225), es el más potente de estos análogos, inhibe la actividad de la ECA a concentraciones nanomolares y es altamente competitivo y reversible. Más aún, el captopril no pierde actividad cuando se suministra oralmente y por lo tanto ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de la hipertensión y en estados de exceso de AII así como en la falla cardíaca congestiva severa (5). Se han desarrollado nuevos agentes sin grupos sulfhidrilo y la eficacia de estos es similar a la del captopril y, al menos hasta ahora, están asociados con una reducción significativa en efectos secundarios (5).

Los inhibidores de la enzima se han empleado para establecer la identidad de la cininasa II con la ECA y para bloquear la conversión de AI o la inactivación de una cinina *in vitro*. Se le han administrado a hombres y animales experimentales para investigar la importancia de las funciones de la ECA y para bloquear específicamente el SRAA bajo una variedad de condiciones (5).

Ya que los inhibidores de la ECA también prolongan el efecto vasodepresor de la bradicinina, algunas veces es difícil establecer el grado de bloqueo de la ECA por el inhibidor a partir de estudios hemodinámicos (27).

Probablemente la aplicación más importante de los inhibidores de la ECA es el estudio de la hipertensión experimental y clínica (27).

El desarrollo de inhibidores específicos de la ECA ha jugado un papel crítico en el aumento de nuestro entendimiento sobre la importancia del SRAA en la regulación de la presión sanguínea. Los primeros estudios con péptidos en venenos de serpientes demostraron que la inhibición de la ECA podía proporcionar una vía para el manejo de la hipertensión. Este conocimiento abrió el camino para un nuevo acceso a la química médica: el diseño de inhibidores específicos de una enzima clave en un proceso patológico utilizando un modelo hipotético de su sitio activo. Estos estudios culminaron en la síntesis del captopril, el cual por sí mismo abrió un capítulo completamente nuevo en el tratamiento de las enfermedades humanas de hipertensión (52).

Poco después de que fueron disponibles los inhibidores peptídicos sintéticos

BPF_{5a} y BPF_{9a} se probó su capacidad para disminuir la presión sanguínea sistémica de las ratas si ésta estaba elevada por la renina. Los estudios en animales pronto fueron seguidos por investigaciones clínicas. Se empleó el SQ 20 881 clínicamente para estudiar el papel de la renina en el mantenimiento de la presión sanguínea, normal o elevada, y para determinar posibles aplicaciones terapéuticas del inhibidor (27).

El efecto del inhibidor en hombre o animales puede depender de la ingesta de sal. En ratas depletadas de sal, la infusión de SQ 20 881 da por resultado una disminución marcada de la presión arterial, mientras que produce un efecto despreciable en ratas con carga de sal. Es decir, el efecto de SQ 20 881 en la presión sanguínea es acrecentada por la depleción de sodio. En otros estudios, una dieta baja en sodio y la mercurhidrina diurética reducen la actividad de la ECA cuatro veces en el riñón de perro. En pacientes normotensos el SQ 20 881 no presenta efectos en la presión sanguínea. Cuando a personas, además de una dieta normal en sodio, se les mantiene boca arriba y se les levanta repentinamente, se produce una liberación de renina. Estos sujetos, sin embargo, pueden compensar la inhibición de la ECA sin cambios significativos en la presión sanguínea. En las personas depletadas de sodio, sujetas a los mismos cambios de posición, la administración del inhibidor de la ECA disminuye la presión sistólica y diastólica, y cuatro de cinco sujetos se desmayaron en los experimentos después de levantarse. Estos resultados se han tomado como una indicación de que la A II es esencial para mantener la presión sanguínea en personas depletadas de sodio y, obviamente, con un bajo volumen de plasma (38).

Tanto en animales de experimentación como en el hombre, la administración del inhibidor aumenta el nivel de renina en sangre, probablemente eliminando la retroalimentación negativa de la liberación de renina por la AII circulante (38).

2.5 MODELOS DE ESTUDIO IN VITRO

Uno de los modelos in vitro que se han utilizado para estudiar el metabolismo de la A I y la bradicinina por la ECA son las células endoteliales pulmonares. Estas células de las arterias y venas pulmonares cultivadas difieren con respecto a su actividad enzimática y estructura superficial como se ha visto con microscopía electrónica de barrido. Las células de arterias pulmonares de adultos presentan una actividad de ECA mayor que las células de venas pulmonares de adultos o arterias pulmonares fetales. Además, las células de arterias pulmonares de adultos presentan

más proyecciones superficiales prominentes que las células de venas o arterias pulmonares fetales. La actividad de la ECA disminuye con una breve exposición con trip-sina en células de arterias, pero no en células de venas. Probablemente las diferencias de actividad de ECA entre estas células están relacionadas con sus estructuras superficiales (53).

La ECA también se ha estudiado en cultivos de monocitos humanos. La ECA en estas células aumenta de niveles indetectables o mínimos in vivo hasta niveles tan altos como 300 veces después de 6 ó 7 días de cultivo. La inducción de la enzima es acrecentada por suero autólogo y exposición a dexametasona durante dos días. Una potente inhibición de la inducción de la enzima por actinomicina D y cicloheximida sugieren que están involucradas en la inducción de un nuevo ARNm y biosíntesis enzimática. Las enzimas de monocitos de pulmón son similares con respecto a la inhibición con EDTA, activación con cloruro de cobalto e inhibición con un anticuerpo anti enzima. Los linfocitos humanos presentan una cantidad de enzima mínima la cual no se induce después de cuatro días de cultivo (54).

El aumento de la actividad de ECA en monocitos durante el cultivo por linfocitos T autólogos parece deberse a la estimulación del grado de síntesis de ECA. La presencia de los linfocitos T durante el cultivo no altera el grado de degradación de la ECA observada en monocitos cultivados solos. La ECA inducida en monocitos por linfocitos T parece ser una ectoenzima (55).

Otro modelo para el estudio de la ECA in vitro es el cultivo de macrófagos alveolares de conejo. En estas células la dexametasona y la prednisona en rangos fisiológicos incrementan la ECA de 7 a 16 veces en comparación con un control de tres días con una estimulación máxima (esteroide 4 nM). Este aumento se inhibe con actinomicina D y cicloheximida, lo cual sugiere que hay una transcripción de novo y síntesis enzimática que son los responsables del aumento de la actividad enzimática, como se vio también en cultivos de monocitos humanos. Estos resultados son una evidencia para el mecanismo regulatorio de la ECA (56).

2.6 ECA Y ENFERMEDAD

Según Lieberman (56) la actividad de la ECA es mayor en hombres que en mujeres de edad comparable y es mayor en niños que en adultos. La ECA está significativamente reducida en pacientes con enfermedad crónica obstructiva, cáncer pulmonar, tuberculosis y fibrosis quística comparada con individuos normales y es aún

menor en pacientes con corticosteroides. Lo más notable, sin embargo, son los niveles de ECA en pacientes con sarcoidosis activa que no reciben esteroides y que están más de dos DP por encima de la media para los adultos controles, mientras que los pacientes con sarcoidosis que reciben esteroides tienen niveles normales. El estudio de sujetos con otras enfermedades granulomatosas no sirven para revelar cualquier otra condición que esté significativamente asociada con una elevación similar de los niveles de ECA séricos. La elevación de los niveles de ECA en sarcoidosis parecen estar asociados con el proceso activo de la enfermedad y parece no ser una anomalía enzimática heredada. Este autor ha sugerido la medición del nivel de ECA en suero para confirmar el diagnóstico de la sarcoidosis y como guía para superarla, siendo esta una aplicación clínica de la medición de la ECA. La asociación de niveles elevados de ECA en suero de pacientes con esta enfermedad ha sido frecuentemente apoyada por los datos de otros investigadores (Ashutosh, Silverstein y Fanburg). También se han observado niveles altos de ECA en pacientes con enfermedad de Gaucher y lepra. A pesar de la relación implícita entre la ECA y las células de Gaucher o epiteloides de granulomas, el nivel de ECA rara vez se encuentra elevado en varias enfermedades granulomatosas incluyendo histoplasmosis, coccidiomicosis y criptococosis, de aquí su potencialidad como prueba en el diagnóstico. Cuando la sarcoidosis activa se trata con dosis supresoras de corticosteroides, los niveles de ECA disminuyen a un rango normal. Ya que parece haber muchos estados en los que la ECA se encuentra elevada, la determinación de ésta, aunque es muy sensible en la sarcoidosis activa, no se puede utilizar como un criterio único en su diagnóstico, sino que sirve como un indicador extra para este fin y para el estudio de la evolución de la enfermedad y su terapia médica (58).

La sarcoidosis y la histoplasmosis son muy similares patológica y clínicamente, hay infiltración pulmonar, se presentan granulomas y adenopatía hilar. Por esta razón, se estudiaron los niveles de ECA en pacientes con histoplasmosis bien definida clínicamente y con evidencia serológica de la infección encontrándose que a las seis semanas después de la infección, la actividad de la ECA sérica se encuentra elevada en comparación con los controles, aunque esta elevación es mucho menos común y puede ocurrir solo brevemente siguiendo la histoplasmosis pulmonar aguda y regresando posteriormente a sus niveles normales, por lo que los niveles altos de ECA en suero no sirven para diferenciar realmente la histoplasmosis de la sarcoidosis (59).

Se han hecho estudios de los cambios en la actividad de la ECA en animales de experimentación expuestos a una variedad de condiciones que dañan al pulmón. Molteni

et al. (1974) reportaron que la ECA en suero y pulmón de ratón se encuentra incrementada por hipoxia alveolar crónica. El tratamiento de ratones con bleomicina puede causar un incremento pasajero en la actividad de la ECA sérica y esto sucede antes de que ocurra cualquier fibrosis pulmonar (Vast et al., 1977). Por otra parte, Newman et al. (1970) reportaron que el nivel de la enzima decae después del tratamiento con bleomicina, mientras que en el líquido de lavado alveolar de dichos pulmones se incrementa al menos treinta veces. En contraste, Hollinger et al. (1980), encontraron que una dosis de tiourea que causa edema pulmonar agudo en ratas, produce una elevación de actividad de ECA en pulmón, suero y en el líquido de perfusión pleural (60).

La actividad de la ECA se encuentra aumentada en el suero de pacientes con asbestosis y silicosis, sin embargo, en estudios realizados en ratas con silicosis experimental (inducida por exposición traqueal a sílice) se encontró un nivel de ECA aumentado en el suero, pero este aumento no correlaciona con el grado de daño al pulmón, por lo tanto, parece ser que los niveles séricos de ECA no son un parámetro útil para saber el grado de daño que tienen los pulmones (60).

Por otra parte, Forget et al. (61) realizaron un estudio midiendo la actividad sérica de ECA en pacientes con asbestosis y en personas que han estado mucho tiempo expuestas a polvos de asbesto; también midieron la actividad de la ECA en suero de cobayos y borregos expuestos a fibras de asbesto y con lesiones asbestóticas demostradas por métodos histopatológicos. En ninguno de los cuatro modelos estudiados encontraron alteración significativa de la actividad sérica de la ECA en respuesta a la asbestosis, por lo que ellos concluyen que la ECA no se puede usar como herramienta para el diagnóstico de esta enfermedad.

Estudios realizados por Siefkin et al. sobre la actividad sérica de la ECA en diversas enfermedades pulmonares (62) muestran que la actividad de la ECA en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonitis, cáncer pulmonar, neumonía aguda, falla renal y sepsis Gram negativa fue significativamente menor que la del grupo control. La baja actividad de la ECA encontrada en enfermedad pulmonar aguda y crónica puede deberse al daño y pérdida de las células endoteliales pulmonares; esta explicación puede ser apoyada por las observaciones de otros autores en diversos daños pulmonares. Estos autores también encontraron una asociación de niveles altos de ECA en pacientes con daño pulmonar y hepático. Se cree que el hígado puede jugar un papel en el metabolismo normal de la ECA sérica circulante y que el daño hepático permite la acumulación de la ECA interfiriendo con este metabolismo.

Estudiando los niveles de AI y de ECA en niños normales y con asma bronquial se encontró que los segundos tienen un valor menor de ECA que los primeros, aunque sus niveles de AI fueron iguales. Al poner a hacer ejercicio moderado a ambos grupos, se observó que los niveles séricos de AI en los dos grupos aumentó, siendo es te aumento más pronunciado en el grupo de niños asmáticos. Con respecto a la ECA se encontró que en los niños normales aumentó, mientras que en los niños asmáticos disminuyó (63).

En humanos a grandes altitudes se ha observado una alta actividad de renina plasmática y una baja concentración de aldosterona. Esto se puede explicar mediante la inhibición de la ECA debida a la hipoxia, lo cual se ha comprobado con los experimentos realizados por Milledge y Catley (64). A cuatro sujetos haciendo ejerci cio moderado durante dos horas, la primera respirando aire normal y la otra con una mezcla de oxígeno al 12% (equivalente a 4000 mts. de altitud), se les tomaron muestras de sangre a diferentes intervalos y se les determinó la concentración plasmática de aldosterona, la APR y la actividad plasmática de ECA, observando que la hipoxia dió por resultado una disminución del 30% en la ECA (el ejercicio respi rando aire normal no tuvo ningún efecto), por lo que a pesar del incremento de la APR y de la concentración de AI, la concentración de aldosterona disminuyó. Es to es una prueba para un posible papel regulatorio de la ECA dentro del SRAA.

Se ha medido la actividad sérica de la ECA en varias enfermedades del hígado. La actividad se encuentra aumentada en orden progresivo en pacientes con hepatitis crónica persistente, hepatitis crónica activa y cirrosis hepática. La actividad también está aumentada en la hepatitis aguda. Por otra parte, los pacientes con hígado graso presentan una actividad de ECA normal y los pacientes con ictericia obstr uctiva extrahepática muestran una actividad subnormal. Aunque los mecanismos de estos cambios enzimáticos en las enfermedades del hígado quedan por ser elucidados, la determinación de la ECA sérica puede ser útil en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas bajo ciertas condiciones. En enfermedades hepáticas con concentraci ones de bilirrubinas altas se ve una ten dencia al aumento en los niveles de la ECA excepto en la ictericia obstructiva (65).

Se han encontrado niveles altos de ECA sérica en el 24% de 265 pacientes con diabetes mellitus (66). Las elevaciones correlacionan con la presencia de retinopa tía diabética severa, lo cual es interesante, ya que se cree que las células en doteliales son el sitio principal de síntesis de ECA y el daño endotelial di fundi

do puede liberar la enzima a la sangre (66).

Según los estudios de Yotsumoto et al. (67), la actividad sérica de la ECA se encuentra significativamente elevada en 21 pacientes con hipertiroidismo comparada con los niveles de sujetos normales. Los niveles de esta enzima están aumentados reflejando los altos niveles séricos de hormona tiroidea en el hipertiroidismo, y el estado de hipertiroidismo, según estos autores se debe de considerar cuando los niveles de ECA séricos sean altos. Al igual que en el caso de pacientes diabéticos, se cree que la elevación de la actividad sérica de la ECA en el hipertiroidismo puede deberse a la liberación aumentada de la enzima a partir de las células endoteliales, solo que en este caso es debida a efectos directos o indirectos del exceso de hormona tiroidea (67).

También se ha encontrado que la ECA está disminuida durante el embarazo, aumentando en el último trimestre y regresando a los niveles normales a las seis semanas del postparto (68). La ECA está relacionada a las presiones sistólicas y media, inversamente al Na sérico y al K urinario, y directamente al K sérico. Dentro del SRAA la ECA solo correlaciona con los niveles de aldosterona. Junto con otros componentes del sistema, la actividad de la ECA parece estar alterada en la preñez y estar influenciada por mecanismos de control similares. Es posible que la ECA juegue un papel modulador en la secreción de aldosterona por medio de la (des-Asp)¹-AI. Al disminuir la actividad plasmática de la ECA inversamente al incremento en la actividad de otros componentes del SRAA en la preñez, se puede pensar que el exceso de conversión de AI a AII agota los almacenes de ECA y por lo tanto ésta es un factor limitante potencial del sistema (68).

Se ha observado una elevación significativa en los niveles de ECA sérica en pacientes con enfermedad de Addison no tratada con respecto a controles sanos (69), pero la enzima regresa a niveles normales con una terapia esteroidea. Estos datos sugieren que la insuficiencia suprarrenal primaria por sí misma está asociada con los niveles altos de ECA y que la enfermedad de Addison es ya otra condición bajo la cual la ECA sérica puede estar aumentada.

Debido a que la ECA se encuentra en el borde en cepillo de las células tubulares de riñón y a que tiene una masa molecular muy alta, la actividad de la enzima en orina debe derivarse probablemente solo de las células tubulares, sugiriendo la utilidad potencial de la determinación de la ECA como índice de daño tubular. Eva

luando la actividad urinaria en pacientes con infección en el tracto urinario superior e inferior, nefrolitiasis, glomerulonefritis crónica e hipertensión esencial, se encontró que la ECA está significativamente aumentada solo en pacientes con infección en el tracto urinario superior y con nefrolitiasis (70).

Overlak et al. (71) encontraron una ligera pero significativa elevación en la actividad sérica de ECA en pacientes jóvenes con hipertensión esencial no complicada, pero esta elevación no correlaciona con la concentración plasmática de AII o con la disminución de la presión sanguínea después del tratamiento con captopril, por lo que se piensa que no está involucrada en la patogénesis de la hipertensión esencial. Más aún, los niveles de AII y de bradicinina, los cuales deben ser influenciados por cambios en la actividad de la ECA, parecen no estar alterados en la hipertensión esencial. Por lo tanto se puede concluir que la elevación en la actividad de ECA observada por esos autores no tiene relevancia fisiológica ni clínica. Por otra parte, se ha visto que en pacientes con hipertensión arterial esencial el captopril subministrado aisladamente es efectivo para reducir las cifras tensionales, y al agregar hidroclorotiazida (un diurético) la presión arterial se normaliza. La APR aumenta, y disminuye la concentración de aldosterona urinaria y plasmática, indicando directamente la inhibición de la formación de AII. El captopril atenúa la hipokalemia y el aldosteronismo secundario producidos por la administración simultánea de hidroclorotiazida (72).

Con respecto a la insuficiencia renal crónica existen discrepancias en los resultados obtenidos por diferentes autores. En el caso de Le Treut et al. (73) encontraron una reducción significativa en la actividad sérica de ECA en pacientes con insuficiencia renal crónica con una estrecha correlación con la excreción de creatinina, sugiriendo que la disminución de la ECA sérica puede reflejar el grado de deterioro de la función renal. Por otra parte, Romer (1979) obtuvo resultados similares, sin embargo, Patel (1979) encontró valores aumentados de ECA sérica en falla renal crónica y Lieberman (1970) no encontró ninguna diferencia significativa en la ECA sérica de 14 pacientes con falla renal de origen diabético y sujetos normales. En estudios más recientes Silverstein et al. (74) y Rumpf et al. (75), encontraron niveles elevados de ECA sérica en pacientes con falla renal crónica y aún más elevada cuando ésta se complicó con enfermedades hepáticas como hepatitis B. Esta elevación de los niveles de ECA sérica no se afectaron con la hemodiálisis, a pesar de que los pacientes con este tratamiento en general presentan una disminución en la presión sanguínea. Por otra parte,

las observaciones de Nielsen et al. (76) indican que los niveles de ECA sérica en pacientes hemodializados se encuentran elevados un 14.3% y, según estos autores, ésto puede indicar un daño del endotelio vascular durante la hemodiálisis. Según las recientes observaciones de Romer y Schmitz (77) se encontraron niveles normales de ECA sérica en pacientes con diálisis crónica, en cambio, en pacientes con enfermedades renales no dializados, la ECA se encontró ligeramente baja y en pacientes con trasplante renal se encontró un nivel de ECA relativamente bajo. Las discrepancias entre los distintos autores con respecto a los niveles séricos de ECA en pacientes dializados pueden deberse por una parte, al tipo de enfermedad renal y, por otra parte, al tiempo que han estado sujetos los pacientes a la hemodiálisis y al tipo de hemodializadores utilizados.

Con respecto a la hipertensión renovascular los primeros estudios se llevaron a cabo con los péptidos del veneno de B. jararaca en animales con hipertensión inducida por la constricción de una arteria renal con o sin nefrectomía contralateral (modelo de un riñón-un clip y dos riñones-un clip). El péptido BPP_{5a} produjo una apreciable caída en la presión sanguínea cuando se suministró a ratas con dos riñones-un clip, pero no tuvo efecto en el modelo de un riñón-un clip. La presión sanguínea regresó al nivel anterior al suministro de la droga tan pronto como se interrumpió su infusión. Efectos similares se obtuvieron después de una corta infusión del nonapéptido SQ 20 881, pero el efecto hipotensivo se perdió entre dos y tres horas después. Ambos péptidos tuvieron la capacidad de disminuir la presión sanguínea en hipertensión inducida por el pedículo renal sin clip y agudamente colapsado (52).

En estudios en conejos con uno y dos riñones el decapeptido SQ 20 585 produjo similares resultados cualitativos, más aún, se mostró que el modelo de un riñón-un clip se vuelve refractario a los inhibidores de la ECA solo a las tres o cuatro semanas después de la nefrectomía contralateral (52).

El nonapéptido SQ 20 881 también puede disminuir la presión sanguínea en el modelo de perro con un riñón-un clip, pero solo durante los primeros días posteriores a la constricción de la arteria renal mientras los niveles plasmáticos de renina están elevados. Cuando se administró SQ 20 881 crónicamente a perros nefrectomizados unilateralmente, empezando un día antes desde la constricción de la arteria renal y continuando seis días después, la presión arterial no se incrementó mucho hasta después de que se discontinuó la infusión del inhibidor de la ECA. Los auto

res interpretaron estos resultados como debidos a una potenciación de la cininas por el SQ 20 881 más que por su acción inhibitoria en el SRAA (52).

El captopril produce una marcada disminución en la presión sanguínea cuando se administra aguda y subagudamente por vía oral a modelos de ratas con dos riñones-un clip de hipertensión benigna y a modelos de ratas con uno y dos riñones-un clip de hipertensión maligna. El modelo de un riñón de hipertensión benigna no presentó efecto agudamente, pero la presión sanguínea disminuyó progresivamente durante siete días de tratamiento; esta lenta y progresiva caída se acompañó por diuresis y natriuresis. La disminución rápida de la presión arterial observada en los otros modelos fué directamente proporcional a la actividad inicial del SRAA cuando se midió como la actividad plasmática de renina y concentración plasmática de aldosterona. Los pulsos cardíacos permanecieron aparentemente sin cambio. Watkins et al. y Freeman et al. no pudieron prevenir el aumento en la presión arterial posterior a la constricción de la arteria renal en perros o ratas nefrectomizadas unilateralmente por la administración continua de captopril iniciando un día antes de la constricción y continuando por seis a doce días después. Sin embargo, la protección contra la hipertensión se logró con captopril bajo las mismas condiciones en ratas con dos riñones-un clip. El captopril previno el desarrollo de la hipertensión cuando se administró oralmente cuatro semanas después de la cirugía a perros con dos riñones perinefríticos. La presión sanguínea gradualmente regresó a los niveles hipertensivos control cuando se suspendió el tratamiento con captopril después de 13 semanas (52).

El captopril mantuvo su acción antihipertensiva en ratas con dos riñones-un clip cuando se administró diariamente por seis o doce meses. Solo se desarrolló una ligera e incompleta tolerancia, sin embargo, en el mismo modelo se desarrolló una tolerancia completa a la hidralazina después de cuatro semanas. El efecto antihipertensivo del captopril fué potenciado por la administración simultánea de un diurético, mientras que la terapia solo con diurético no tuvo efecto. También se observó una reducción significativa en el peso relativo del corazón y un incremento dramático en la sobrevivencia en esos experimentos (52).

II OBJETIVOS

II

O B J E T I V O S

Los objetivos centrales del presente trabajo son:

- 1.- Estudiar la actividad sérica de ECA en diferentes modelos fisiológicos y patológicos de ratas en los cuales está alterada la actividad del SRAA con la finalidad de evaluar el posible papel regulatorio de la enzima dentro del sistema ya que existen discrepancias entre los diversos autores al respecto.
- 2.- Comparar la actividad sérica de ECA, su K_m y efectos inhibitorios del captopril sobre ésta en diferentes especies de mamíferos que se pueden utilizar como animales de experimentación así como en el hombre.

III MATERIAL Y METODOS

I I I

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

1. MATERIALES

1.1 REACTIVOS

Los siguientes reactivos fueron comprados de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.): reactivo de folín fenol y Ciocalteu, aminonucleósido de la puromicina, ASB, HHL, AH, clonidina, propranolol, isoproterenol y Sigmacote. El acetato de etilo, el alcohol etílico, el ácido clorhídrico, el fosfato dibásico de potasio, el fosfato diácido de potasio, el cloruro de sodio, el ácido nítrico, el EDTA Na₂, el hidróxido de sodio, el sulfato de cobre y el tartrato de sodio fueron comprados de J.T. Baker. El estuche para medir Al por RIA fue preparado en nuestro laboratorio (78). El captopril fue un regalo generoso de Squibb de México. El éter fue de Proquimed. El estuche para medir aldosterona se compró en Internacional CIS (Francia). El benzal concentrado para la esterilización del equipo de cirugía fue de Laboratorios Terrier S.A. de C.V. Los amortiguadores de referencia para el potenciómetro (pH 7.38 y 6.0) fueron de Sigma de México. El alimento de ratas con contenido bajo en sodio fue de Purina de México.

1.2 EQUIPO

A lo largo del presente trabajo se utilizó el siguientes equipo: espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II, centrifuga International modelo CS, potenciómetro Orion Research modelo 601, baño de incubación Precision, contador de centelleo sólido Gammacord II, congelador American (-20°C), centrifuga refrigerada Damon/IEC modelo PR 6000, Vortex de Scientific Products, decapitador de animales pequeños de Harvard Apparatus Co. (catálogo 55-0012), fisiógrafo MK-IV de Narco-Biosystems, micropipetas Oxford P 7000 (50, 100 y 200 μ l), repipeteadores de 10, 5 y 1 ml, micropipetas Gilson (Rainin Instruments Co.) P 5000 (5 ml), P 1000 (1 ml), P 200 (0.2 ml) y P 20 (0.02 ml), bolsas de diálisis Spectrapor (tamaño de poro de 6000 a 8000 d), baño de incubación a 120°C con aceite de Nujol de J.M. Orrtiz, papel filtro Whatman # 42, flamómetro IL 343, autoanalizador de creatinina Beckman (modelo 2), balanza analítica Mettler tipo H-15, congelador Revco (-80°C), agitador magnético Corning PC-353, balanza granataria Ohaus modelo 700 (capacidad 2610 g), jeringas desechables de 10 ml con agujas del número 21 y 18 y de 1 ml con agujas del número 25, celdillas de cuarzo 100 QS de 1 cm de paso de luz (558503)

y celdillas de vidrio 104 QS de 1 cm de paso de luz (558121) de Carl Zeiss. El material de cirugía fue el siguiente: tijeras rectas MX5-6 y MX5-12 y pinzas hemostáticas Laher MX12-116 fueron compradas de Hemost S.A. de C.V., hilo cadena de nylon, rasuradora eléctrica Oster modelo 22. Se usaron jaulas metabólicas metálicas de fabricación nacional, para recolectar la orina de las ratas. Las jaulas contienen una malla metálica que permite el paso de la orina y retiene las heces, y de un cono colector para que escurra la orina a un recipiente. El comedero y el bebedero están fuera del cuerpo de la jaula para que estos no contaminen la orina. La comida se colocó en polvo.

1.3 SOLUCIONES

En la preparación de las soluciones se usó siempre agua bidestilada y desionizada a la que nos referiremos a lo largo del trabajo simplemente como agua. Las soluciones que se usaron continuamente en el trabajo como amortiguadores, sustrato, etc. se dividieron en alícuotas y se congelaron a -80°C para su conservación.

1.4 PREPARACION DEL MATERIAL.

Los tubos usados para colectar la sangre de las diferentes especies y grupos de ratas se siliconizaron con Sigmacote a 1% en agua durante 15 min. El resto del material de vidriería se usó después de lavarlo, enjuagarlo exhaustivamente con agua y secarlo al calor. El material que se usó con radiactividad se lavó cuidadosamente hasta que se eliminó totalmente ésta.

1.5 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

1.5.1 RATAS: Rattus norvegicus; cepa Wistar, machos. Se criaron y mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de La Nutrición "Salvador Zubirán" hasta el final de los experimentos. En los diferentes grupos se usaron ratas de 100 a 300 g. Se trabajó con los siguientes grupos de ratas:

a) RATAS CONTROL (N). Fueron 20 ratas que no recibieron ningún tratamiento. Su sangre se obtuvo por decapitación y los valores encontrados sirvieron como referencia para los siguientes grupos estudiados. Estas ratas se alimentaron ad libitum y a un grupo de éstas se les mantuvo en jaulas metabólicas para recolectar diariamente su orina.

b) RATAS ANESTESIADAS (AN): Diez ratas se anestesiaron con éter durante 5 min; la sangre se tomó por punción cardíaca con jeringas desechables de 10 ml y aguja del número 21.

c) RATAS CON DIETA BAJA EN SODIO (\downarrow Na). Diez ratas se alimentaron con una dieta baja en sodio, la cual consistió de un alimento con un contenido de sodio de 0.036% (alimento normal 0.38% de sodio) y de agua destilada durante 15 días. Durante este tiempo las ratas estuvieron en jaulas metabólicas para la recolección diaria de su orina. Al final del período las ratas se sacrificaron por decapitación para obtener su sangre.

d) RATAS CON DIETA ALTA EN SODIO (Na 1%). Diez ratas se mantuvieron durante 15 días en jaulas metabólicas con alimento normal y una solución de cloruro de sodio al 1% para beber, su orina se recolectó diariamente. Al final del período las ratas se sacrificaron por decapitación para obtener su sangre.

e) RATAS DESHIDRATADAS (DESH). Diez ratas se mantuvieron durante 72 h sin acceso al agua de beber y con alimento normal. Al final del período se sacrificaron para obtener su sangre.

f) RATAS CON CLORURO DE SODIO AL 2% (Na 2%). Diez ratas se mantuvieron durante 5 días en jaulas metabólicas con alimento normal y una solución de cloruro de sodio al 2% para beber, su orina se recolectó diariamente. Al final del período las ratas se sacrificaron por decapitación para obtener su sangre. Este es un segundo modelo de deshidratación.

g) RATAS BINEFRECTOMIZADAS (BIN). Diez ratas se mantuvieron durante 24-36 h después de la remoción quirúrgica de ambos riñones. Estas ratas se mantuvieron con una dieta normal. Al final del período se obtuvo su sangre por punción cardíaca después de la anestesia con éter. Este es un modelo de uremia agudo.

h) RATAS UREMICAS (URE). Diez ratas se mantuvieron durante 24-36 h después de la ligación de ambos ureteros. Estas ratas se mantuvieron con una dieta normal. Al final del período las ratas se sacrificaron por decapitación para obtener su sangre. Este es otro modelo de uremia agudo.

i) RATAS HIPERTENSAS RENOVASCULARES (HIP REN). Nueve ratas se mantuvieron de 30 a 45 días después de colocar un clip de plata en la arteria renal izquierda. Al final

del período se midió la presión arterial media en la cola después de calentarla. Este es un modelo de hipertensión renovascular experimental dependiente de renina. La sangre se obtuvo por decapitación.

j) RATAS CON SINDROME NEFROTICO (NEF). Cuatro ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas con dieta normal durante 6 días después de la inyección del aminonucleósido de la puromicina (15 mg/100 g, subcutáneo); la orina se recolectó diariamente. Al final del período la sangre se obtuvo por decapitación.

k) RATAS TRATADAS CON AGENTES ADRENERGICOS (ISO, CLO, PRO). Se usaron los siguientes agentes adrenérgicos, que fueron inyectados subcutáneamente a grupos de 4, 5 y 5 ratas respectivamente: clonidina (CLO), agonista alfa-2 adrenérgico (15 µg/100 g), isoproterenol (ISO), agonista beta adrenérgico (15 µg/100 g) y propranolol (PRO), antagonista beta adrenérgico (100 µg/100 g). Las ratas se sacrificaron por decapitación 30 min después de la inyección para obtener su sangre.

1.5.2 CONEJOS: Oryctolagus cuniculus; raza Nueva Zelanda. Se tomó la sangre a diez conejos machos despiertos a partir de la arteria auricular con jeringas desechables de 10 ml y agujas del número 20.

1.5.3 BORREGOS: Ovis aries; raza Suffolk y Tabasco. Se muestrearon diez ejemplares despiertos, machos y hembras, adultos, de la vena yugular usando jeringas desechables de 10 ml con agujas del número 18.

1.5.4 RATONES: Mus musculus; cepa Calb/c. Se usaron diez ratones macho adultos de 40 g. Se les anestesió con éter y se tomó la muestra de sangre por punción cardíaca con jeringas desechables de 1 ml y agujas del número 25. Estas diez muestras se usaron para las determinaciones individuales, posteriormente se sangraron más animales para hacer una mezcla que sirviera para las curvas de inhibición con captopril y curvas de saturación con sustrato. Esto se hizo debido al pequeño volumen de sangre que se pudo obtener de estos animales.

1.5.5 COBAYOS: Cavia porcellus; cepa Hartley. Se usaron diez machos y hembras jóvenes con un peso aproximado de 350 g. Los animales se anestesiaron con éter y la sangre se obtuvo por punción cardíaca con agujas de 10 ml y agujas del número 21.

1.5.6 PERROS: Canis familiaris; raza mestizo. Se tomó la muestra de sangre de la vena safena a 10 animales adultos despiertos, machos y hembras, con jeringas de 10 ml y agujas del número 21.

1.5.7 CABALLOS: Equus caballus; diferentes razas. Se usaron caballos y yeguas adultos y despiertos. Se les tomó la muestra con jeringas de 10 ml y agujas del número 18 a partir de la vena yugular.

1.5.8 HAMSTERES: Mesocricetus auratus; cepa CHCM. Se sangraron 10 machos adultos por punción cardíaca, previa anestesia con éter. Se usaron jeringas de 10 ml y agujas del número 21.

1.5.9 HOMBRES: Homo sapiens. Se tomaron muestras de sangre a partir de la vena cubital a 10 voluntarios sanos, hombres y mujeres, de 20 a 30 años de edad con jeringas desechables de 10 ml y agujas del número 21.

Para separar el suero de todas las muestras de sangre se aplicó el siguiente procedimiento; La sangre se recolectó en tubos de centrifuga perfectamente silicizados para evitar la hemólisis y lograr una buena retracción del coágulo. Una vez obtenida la sangre se esperó aproximadamente 90 min a que el coágulo se retrajera. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm (radio = a 20 cm), se sacó el coágulo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El suero se separó en alícuotas de 300 μ l en tubos eppendorff que se congelaron a -20°C . Algunas determinaciones se hicieron sin previa congelación.

En los casos en donde se determinó la actividad de renina, la sangre se depositó en tubos con 50 μ l de EDTA Na_2 250 mM colocados en hielo, el plasma se separó a 4°C y se hicieron varias alícuotas que se congelaron a -80°C .

A la orina recolectada se le midió el volumen, se filtró y se separó en diferentes alícuotas para realizar las determinaciones programadas. Cuando se almacenaron estas alícuotas se colocaron a -20°C .

Los conejos, ratas, ratones, hamsteres, cobayos, borregos y perros fueron proporcionados por el bioterio del propio Instituto. Los caballos usados fueron de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Todos los ejemplares de las

distintas especies, así como los humanos tenían una dieta ad libitum.

2. METODOS

2.1 SODIO

a) Sodio sérico. El sodio sérico de las ratas Na, Na 1%, Na 2%, DESH, BIN, N, AN, URE y NEF se midió por flamometría y los resultados se expresan en mEq/L.

b) Sodio urinario. Este parámetro se midió de igual manera que el sodio sérico en las ratas de los grupos N, ↓Na, Na 1%, Na 2%, DESH y NEF, y los resultados se expresan en mEq/24 h.

c) Sodio en el alimento. Para la determinación del contenido de sodio en el alimento se tomaron 100, 200 y 500 mg de éste y se les adicionó 10 ml de ácido nítrico concentrado, después de 24 h se les adicionó 90 ml de agua, se hizo una dilución posterior 1:5 y se determinó el sodio por flamometría. Antes de la adición del agua se filtró para eliminar los residuos no digeridos. El resultado en mg Na/100 g.

2.2 CREATININA

a) Creatinina sérica. Este parámetro se midió en los siguientes grupos de ratas: BIN, N, URE, DESH, ↓Na, Na 1% y Na 2%. Se usó un autoanalizador que usa la reacción de Jaffé. Los resultados se expresan en mg/100 ml.

2.3 PROTEINAS TOTALES:

a) Proteínas séricas. Para esta determinación se usó un método modificado de Lowry et al. (79) usando como patrón ASB. El método fue el siguiente: Se prepararon las siguientes soluciones:

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

Solución B: Sulfato de cobre al 0.5%

Solución C: 50 ml de A + 1 ml de B. Se prepara al momento de usarse

Solución D: Folín 1 N, se diluye la solución concentrada 2 N con agua.

Solución E: Solución patrón de ASB, 1 mg/ml

Para la determinación se tomaron 0.05 ml de una dilución 1:100 de la muestra o la cantidad correspondiente de la solución E + 1 ml de la solución C. Después de 10 min se adicionó 0.1 ml de solución D, y después de 30 min se leyó la D.O. a 660 nm contra su propio blanco. La curva patrón se muestra en la Fig 7. Los resultados se expresan como mg/100 ml.

b) Proteínas urinarias. Esta determinación se hizo de la misma manera que en el suero, solo que en este caso se utilizaron 0.05 ml de la muestra concentrada y cuando se requirió se diluyó la muestra. Los resultados se expresan como mg/24 h. Las muestras se dializaron previamente durante 24 h contra solución salina al 0.9% y a 4°C. Para este fin se usaron las bolsas de diálisis de un tamaño de poro de 6000 a 8000 d.

Las determinaciones de proteínas séricas y urinarias se realizaron en las ratas de los grupos N y NEF.

2.4 ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE RENINA (APR) Y CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RENINA (CPR).

Estas se midieron por RIA de AI. En la medición de APR se usó el sustrato endógeno y en la medición de la CPR se adicionó un exceso de angiotensinógeno (plasma de ratas binefrectomizadas 24 h antes). Las muestras se incubaron a pH 6.0 y 37°C durante 1 h en presencia de EDTA Na₂, 8-hidroxiquinoleína y de dimercaprol (inhibidores de la ECA y de las angiotensinas). Una alícuota de la muestra se incubó en forma paralela a 4°C. Una alícuota de estas muestras se sometió a RIA de AI, se incubó la muestra con cantidades constantes de anticuerpo y angiotensina I - ¹²⁵I (aproximadamente 6000 cpm) durante 18 a 24 h, a 4°C. Al final de este período se separó la radiactividad libre de la unida al anticuerpo con una solución de carbón al 0.6% con dextrán al 0.0625% y se contó el sobrenadante (radiactividad unida al anticuerpo). Se trazó una curva patrón graficando el logit ($\text{logit} = \log \frac{B/B_0}{1-B/B_0}$) contra el logaritmo de la concentración del patrón usado (0.1 a 5.0 ng de AI/ml). Una curva típica se muestra en la Fig 8. La CPR se midió en las ratas de los grupos N, AN y NEF, y la APR se midió en las ratas de los grupos N, CLO, ISO y PRO.

2.5 ALDOSTERONA:

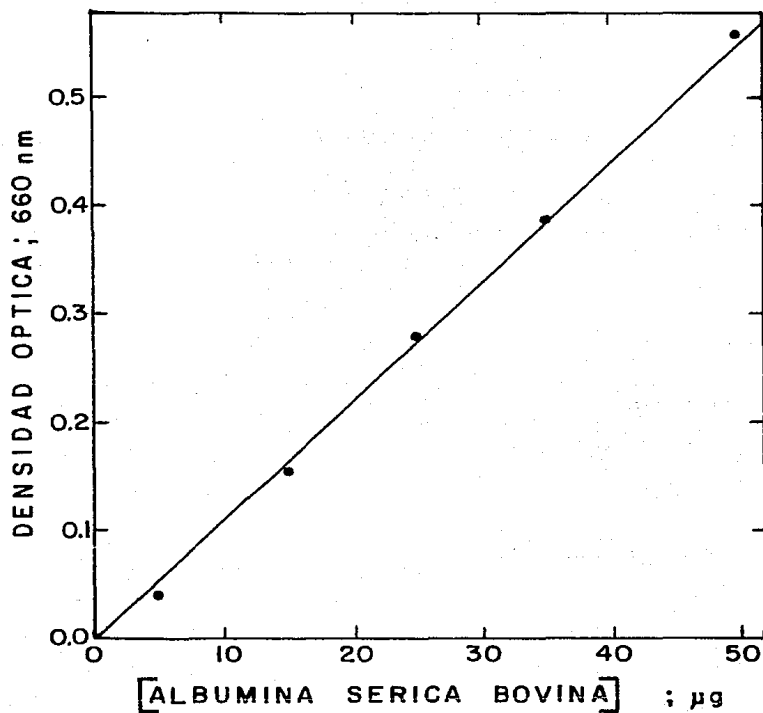


FIGURA 7. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY (79).

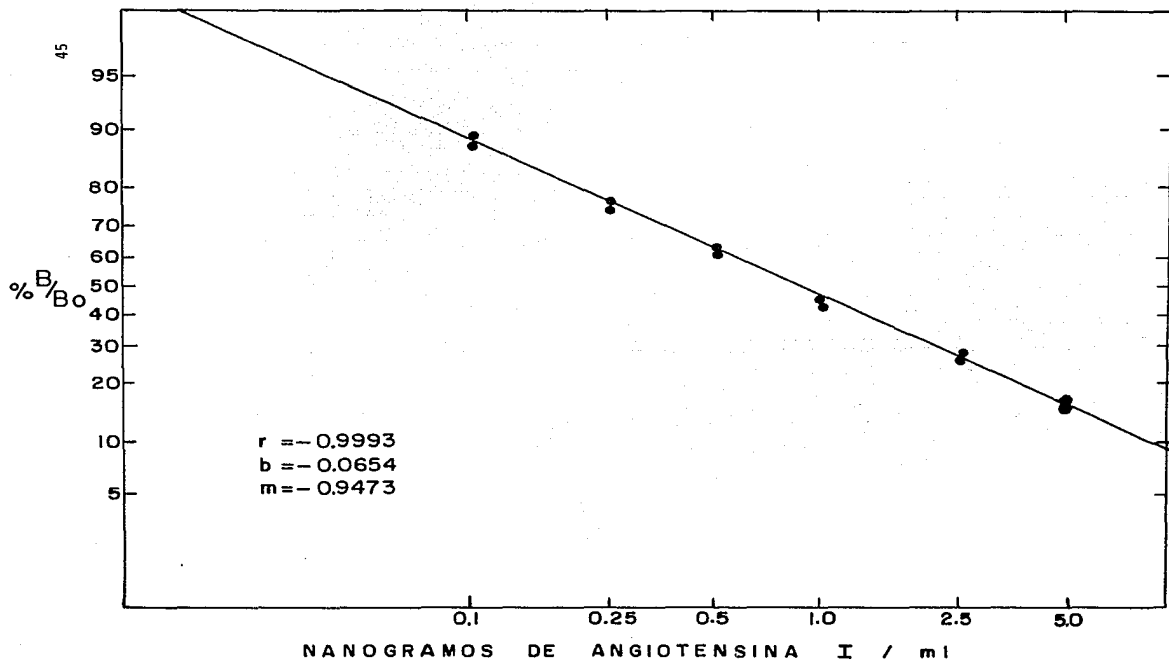


FIGURA 8. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE ANGIOTENSINA I POR RIA, USADA PARA LA DETERMINACION DE APR Y CPR.

a) Aldosterona plasmática. La aldosterona en el plasma de las ratas N y NEF se midió por RIA directo. Se incubaron 0.1 ml de muestra con 0.7 ml del amortiguador de fosfatos con la sal sódica del ácido 8-anilino-1 naftalensulfónico. Se adicionó una cantidad constante de aldosterona-¹²⁵I (aproximadamente 9000 cpm). El anticuerpo viene unido a los tubos. Se incubó a 4°C durante 18 a 24 h. Los tubos se decantaron, se enjuagaron y se contó la radiactividad unida. Se trazó una gráfica logit-log similar a la usada para el RIA de AI. Los patrones usados fueron de 50 a 1000 pg/ml. En la Fig. 9 se muestra una curva típica para esta determinación.

b) Aldosterona urinaria. Esta se midió después de la hidrólisis ácida de la orina: a 0.5 ml de orina se le adicionó 1 ml de HCl 0.2 M para llevar la muestra a un pH de 1.0. La muestra ácida se incubó durante 15 a 20 h a 30±2°C. La aldosterona se midió en 40 µl de la orina hidrolizada. A cada tubo se le adicionaron 100 µl de ASB al 30%. El ensayo se realizó como se describió para plasma. Los patrones usados para hacer la curva patrón fueron de 0.78 a 25 ng/ml y esta curva se muestra en la Fig. 10. Esta determinación se realizó en los grupos de ratas N y NEF.

2.6 TENSION ARTERIAL.

Este parámetro se midió con un fisiógrafo en las ratas de los grupos N e HIP REN. El manguillo del fisiógrafo se colocó en la base de la cola de los animales previamente calentados para la dilatación de la vena caudal.

2.7 ACTIVIDAD SERICA DE LA ECA

La medición de la actividad de la ECA se realizó de acuerdo al método de Lieberman et al. (57); el cual es un método modificado del método original descrito por Cushman y Cheung (31). En este trabajo se sustituyó el agua por el alcohol etílico para resuspender la muestra después de la evaporación del acetato de etilo por problemas de turbidez. El esquema para la determinación de la actividad de la ECA se muestra en la Fig. 11.

2.7.1 FUNDAMENTO. La ECA hidroliza al HHL en AH y el dipéptido His-Leu (Fig. 12) El AH se extrae con acetato de etilo y se mide su extinción a 228 nm. La actividad de

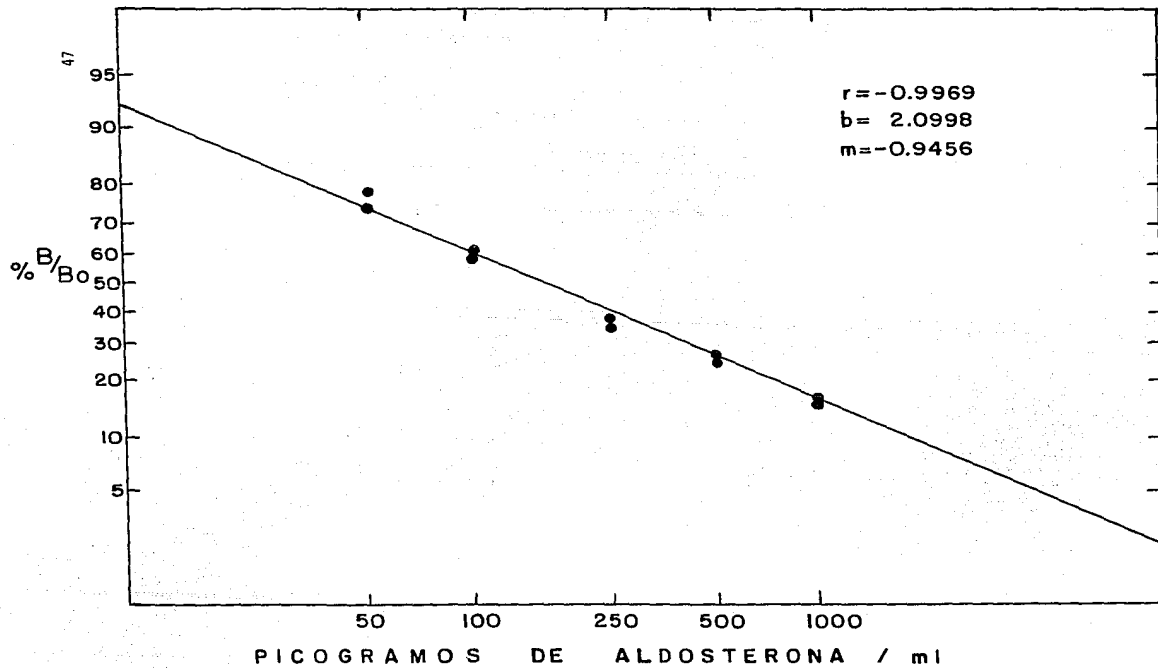


FIGURA 9. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE ALDOSTERONA EN PLASMA O SUERO POR RIA.

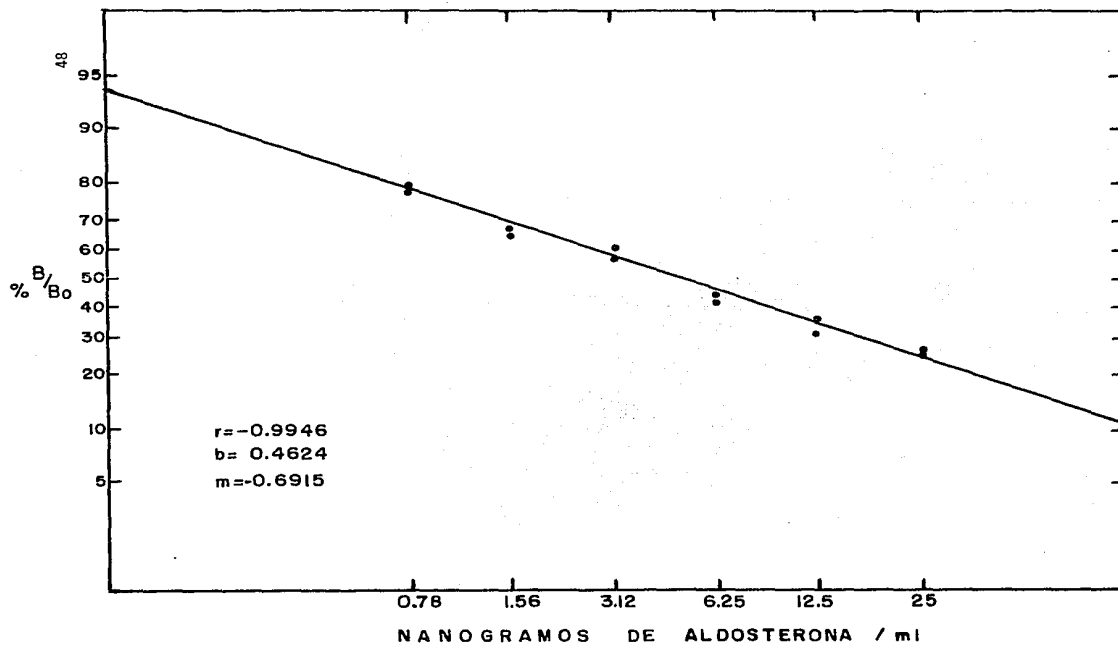


FIGURA 10. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE ALDOSTERONA EN ORINA POR RIA.

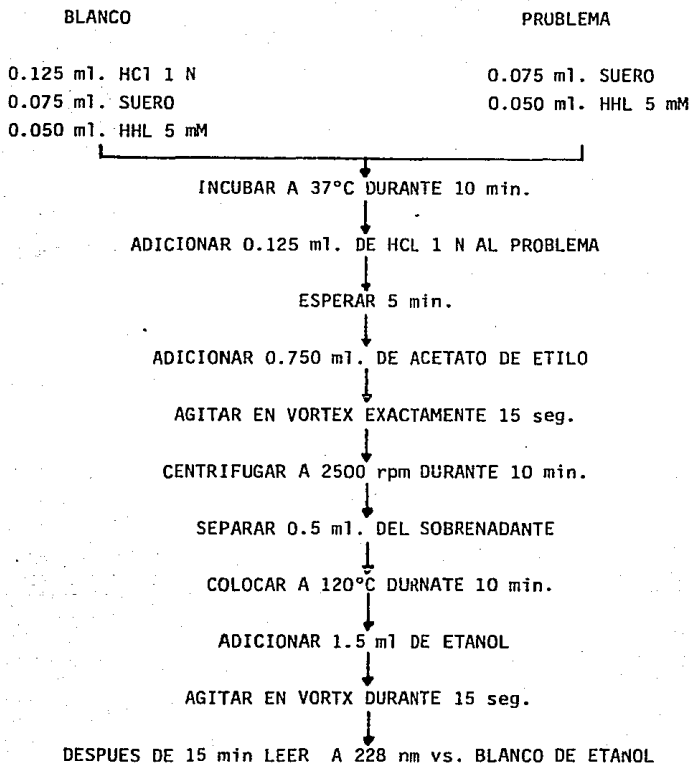
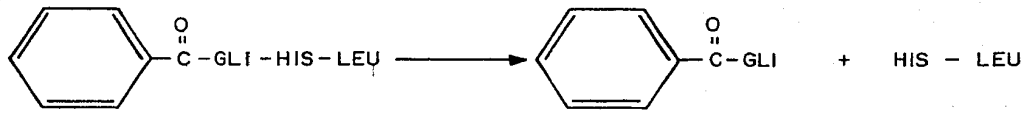


FIGURA 11. ESQUEMA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA SEGUN EL METODO UTILIZADO EN ESTE TRABAJO.



HIPURATO DE HISTIDIL - LEUCINA
(HHL)

ACIDO HIPURICO
(AH)

+ HISTIDIL - LEUCINA

FIGURA 12. REACCION EN LA QUE SE BASA EL METODO UTILIZADO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE ECA (32)

la ECA se expresa en nanomoles de AH por ml de suero por minuto de incubación a 37°C

2.7.2 RECUPERACION DE AH. Antes de montar la técnica para medir la actividad de la enzima, se midió la recuperación del AH adicionando al suero sanguíneo una cantidad conocida de AH que sustituye al sustrato en el esquema de la Fig. 11 en las muestras problema. Esta cantidad conocida de AH fue de 0.05 ml de una solución 2.5 mM. En las muestras blanco se agregó 0.05 ml más de amortiguador para mantener los mismos volúmenes. La concentración y la cantidad total de AH extraído se calculó aplicando la Ley de Lambert y Beer. El coeficiente de extinción mM del AH es de 9.8. La recuperación se calculó dividiendo la cantidad extraída de AH entre la cantidad adicionada. La recuperación se midió en cada ensayo a lo largo del presente trabajo.

2.7.3 PREPARACION DE SOLUCIONES.

a) Amortiguador de fosfato de potasio 500 mM-cloruro de sodio 750 mM, pH 8.3

Solución A: 8.7 g/100 ml de K_2HPO_4 + 4.38 g de NaCl

Solución B: 6.8 g/100 ml de KH_2PO_4 + 4.38 g de NaCl

Se adicionó suficiente solución B a los 100 ml de la solución A para llevar el pH a 8.3. El amortiguador se almacenó a 4°C.

b) HHL 12.5 mM. El HHL tiene un PM de 429.5 d y contiene 3 moléculas de agua de hidratación, por lo tanto el PM total es de 483.5 d. Se disolvieron 60.4375 mg en 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 8.3. Se almacenó a -20°C y antes de usarse se puso en baño a 37°C para disolverlo totalmente.

c) HCl 1 N. Se tomaron 8.3 ml de HCl concentrado (PM 36.465, densidad = 1.1875, %P/P = 37) y se aforaron a 100 ml

d) AH 2.5 mM. Se hizo una dilución 1:20 de una solución 50 mM. El PM del AH es de 179.2, por lo que esta solución se preparó disolviendo 89.6 mg en 10 ml del amortiguador de fosfatos.

2.7.4 CALCULO DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA

$$\text{nm AH/ml/min} = \frac{(A_{228} - A_{228} \text{ blanco}) \times 10^3}{E \times a \times b \times c \times d}$$

E = Coeficiente de extinción mM del AH ($9.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

a = Fracción de AH extraída (calculada para cada ensayo)

b = Fracción transferida del extracto de acetato de etilo (0.67)

c = Tiempo de incubación en minutos (variable)

d = Mililitros de suero por tubo (variable)

A_{228} = D.O. a 228 nm.

10^3 = Factor para convertir a milimoles.

2.7.5 PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD.

a) Interensayo. Se hizo la determinación de la actividad de la ECA de una misma mezcla de sueros de ratas normales en diferentes ensayos. Se calculó el coeficiente de variación.

b) Intraensayo. En este caso se hizo la determinación de la actividad de la ECA de la misma mezcla de sueros de ratas normales 7 veces dentro de un mismo ensayo. Este experimento se repitió 3 veces, y, al igual que en el caso anterior, se calculó el coeficiente de variación.

2.7.6 CALCULO DEL GASTO DE SUSTRATO. A lo largo del presente trabajo se calculó la cantidad de sustrato consumido en la reacción enzimática. Para realizar este cálculo se tomó en cuenta que se adicionaron 625 nanomoles de HHL (50 μ l de una solución 12.5 mM). Después se calculó la cantidad de AH producido en el tiempo total de incubación, tomando en cuenta la actividad de la muestra. En seguida se calcula la relación entre AH producido y la cantidad de sustrato original.

2.7.7 CURVAS DE LINEARIDAD. Antes de estudiar la actividad de la ECA en las diferentes especies (incluyendo a la rata), se seleccionó la cantidad de muestra y el tiempo de incubación a usar, probando que estuvieran en un rango lineal. Para este fin se construyeron curvas a diferentes volúmenes de suero (cantidad de enzima) con un tiempo de incubación fijo para cada especie y se seleccionó el punto intermedio de cada recta. En el caso de la rata también se hizo una curva a volumen de suero constante y tiempos de incubación variables. Para construir estas curvas se hizo una mezcla de 10 muestras de suero para cada especie.

2.7.8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA DE LAS DIFERENTES ESPECIES Y MODELOS DE RATAS. Validado el método y encontradas las condiciones de ensayo, se midió la actividad enzimática para las muestras de las distintas especies, así como de los diferentes modelos de ratas.

2.7.9 CURVAS DE SATURACION. El siguiente paso en la caracterización de la enzima de las diferentes especies fue la determinación de la K_m y la V_{max} . Estos datos se

obtuvieron de la curva de saturación de la enzima con el sustrato. Las concentraciones (mM) de HHL utilizadas fueron: 7.5, 5.0, 2.5, 1.667, 1.25, 0.75 y 0.625. La K_m y la V_{max} se calcularon a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk ($1/V$ vs $[S]$) y esta información se verificó usando la gráfica de Hanes-Woolf ($[S]/V$ vs $[S]$). El valor de K_m está expresado en mM y la V_{max} en nm de AH/ml/min.

2.7.10 CURVAS DE INHIBICION. El último paso en la caracterización de la enzima de las diferentes especies fue el cálculo de la I_{50} y de la K_i para el inhibidor captopril. La I_{50} se calculó usando una concentración de sustrato de 5.0 mM y las siguientes concentraciones (M) de captopril: 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} y 1×10^{-5} . En el caso del ratón se usaron las siguientes concentraciones (M): 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 3×10^{-6} , 5×10^{-6} y 7×10^{-6} y en el caso del borrego fueron las siguientes concentraciones (M): 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , 7×10^{-9} , 1×10^{-8} y 3×10^{-8} . La I_{50} es la cantidad de captopril que inhibió el 50% de la actividad enzimática calculada gráficamente. El captopril se preparó en amortiguador de fosfatos pH 8.3 a una concentración de 1×10^{-3} M (PM = 217). A partir de esta solución (2.2 mg/10 ml) se hicieron las diluciones correspondientes. Se colocó en frasco ámbar y se guardó a -20°C . La K_i para cada especie se calculó a partir de la K_m y de la I_{50} , utilizando la fórmula de Cheng y Prusoff (80):

$$I_{50} = K_i \left(1 + \frac{(S)}{K_m} \right)$$

2.8 PRUEBAS ESTADISTICAS.

a) Error patrón. Los resultados de las distintas determinaciones están expresados como el valor promedio \pm error patrón (EP), que es igual al cociente de la desviación patrón (DP) entre la raíz cuadrada del número de determinaciones (n).

b) Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba "t" de Student para diferenciar entre dos medias. Se usó el programa correspondiente de una calculadora Hewlett Packard (HP 33E). Cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05, la diferencia entre las dos medias se consideró estadísticamente significativa.

c) Coeficiente de variación. Se usó como prueba estadística para la recuperación de AH y para las pruebas de reproducibilidad. Este se define como el cociente de la DP entre la media, multiplicado por 100 (CV).

IV RESULTADOS

IV

R E S U L T A D O S

1. VALIDACION DEL METODO PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA

1.1 RECUPERACION DE AH.

Se midió la recuperación de AH en las mismas condiciones de ensayo como primer paso antes de montar la técnica para medir la actividad de la ECA, obteniéndose un valor promedio de $87.64 \pm 0.72\%$, CV = 8.8%, n = 120.

1.2 PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD.

En las pruebas de reproducibilidad realizadas se obtuvieron los siguientes resultados: a) Interensayo. Actividad promedio de ECA = 163.98 ± 7.2 . CV = 10,7%, n = 6. b) Intraensayo. Ensayo 1, actividad promedio de ECA = 166.11 ± 4.03 , CV = 6.42%, n = 7; ensayo 2, actividad promedio de ECA = 176.89 ± 3.91 , CV = 5.85%, n = 7.

1.3 CURVAS DE LINEARIDAD Y GASTO DE SUSTRATO.

Se probó la linealidad de producción de AH contra tiempo de incubación (Fig. 13) y contra concentración de muestra (Fig. 14-A) en suero de rata. De acuerdo a estos resultados se decidió hacer las determinaciones en el suero de los diferentes grupos de ratas, según lo muestra la tabla V. Al medir la actividad sérica de ECA de los distintos modelos también se calculó el gasto de sustrato (tabla V). La linealidad de las diferentes especies se muestran en las Figs. 14-A, 16-A, 18-A, 20-A, 22-A, 24-A, 26-A, 28-A y 30-A, y las condiciones de ensayo y gasto de sustrato se muestran en la tabla VI.

2. CURVAS DE SATURACION.

Uno de los pasos para la caracterización de la enzima de las diferentes especies fué la construcción de curvas de saturación con HHL (Figs. 14-C, 16-C, 18-C, 20-C, 22-C, 24-C, 26-C, 28-C y 30-C), calculando con los métodos de Lineweaver-Burk y Hanes-Woolf sus Km y Vmax para el HHL (Figs. 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31). Las diferencias de estos valores en las diferentes especies se pueden apreciar en la tabla VII.

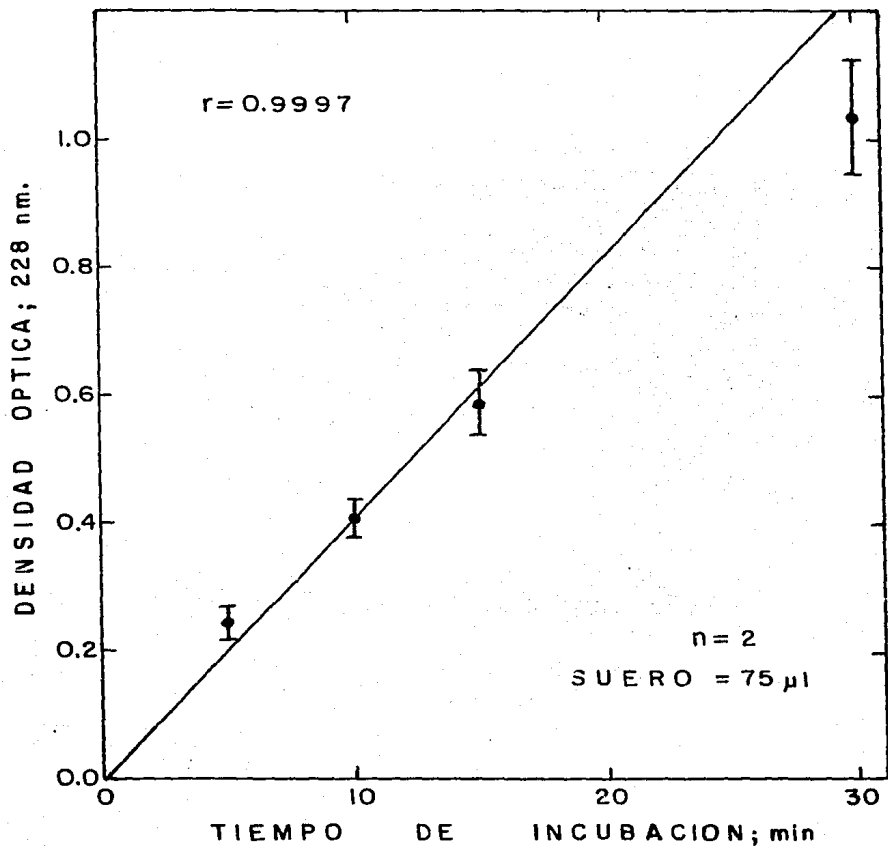


FIGURA 13. PRODUCCION LINEAL DE ACIDO HIPURICO EN FUNCION DEL TIEMPO.

R A T A

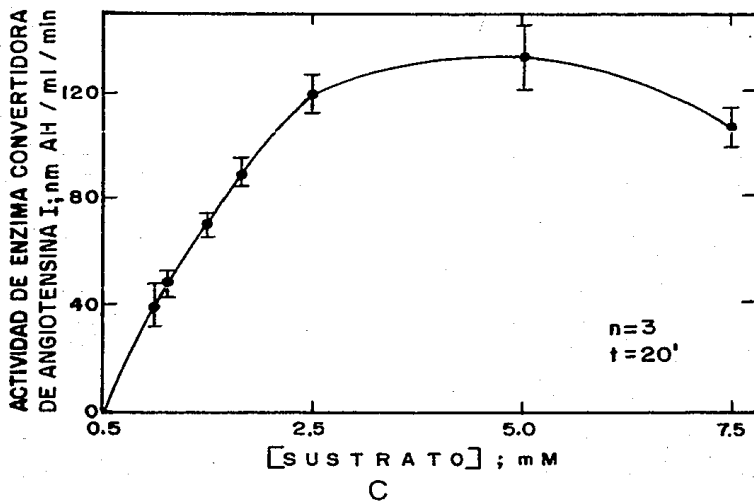
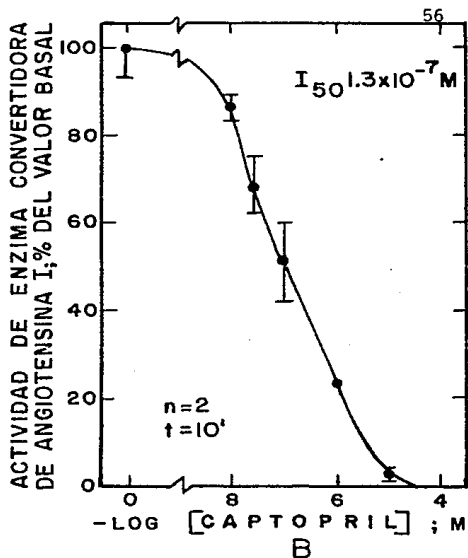
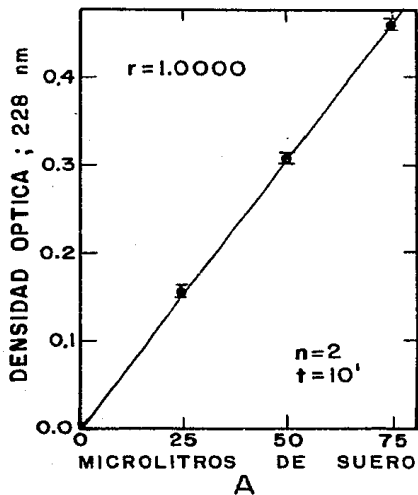


FIGURA 14. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) y SATURACION (C) DE LA ECA DE RATA

R A T A

57

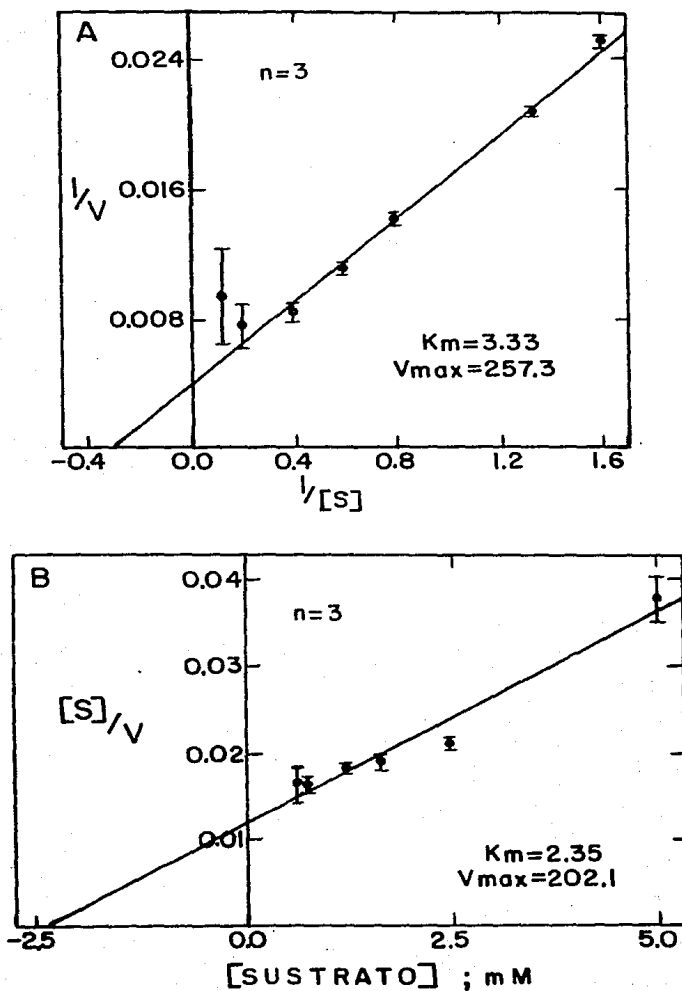
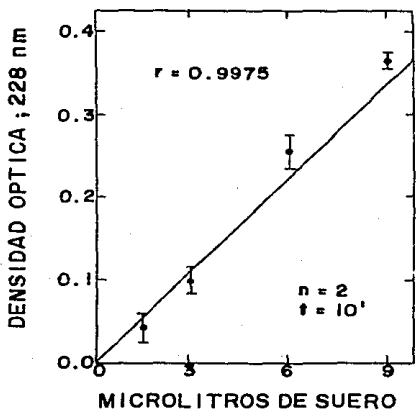
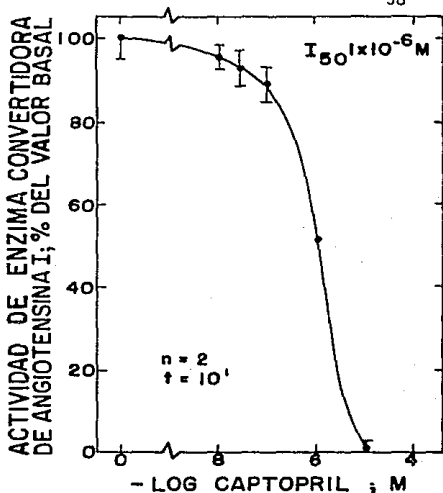


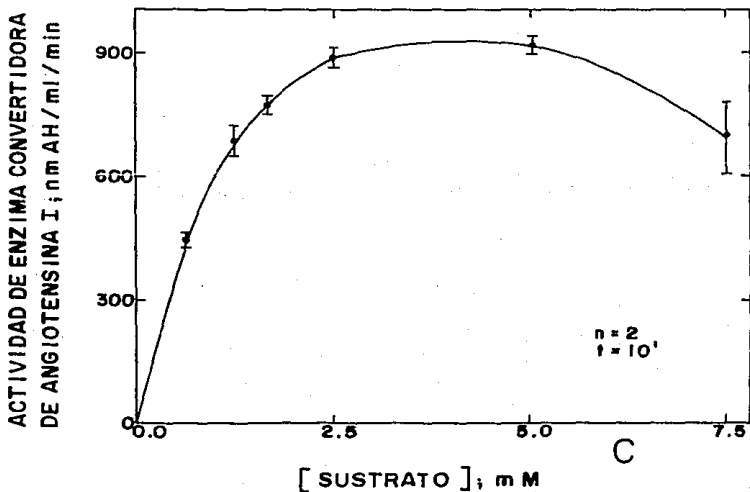
FIGURA 15. DETERMINACION DE K_m y V_{max} DE LA ECA DE RATA POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK (A) Y HANES-WOOLF (B).



A



B



C

FIGURA 16. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B), Y SATURACION (C) DE LA ECA DE COBAYO.

C O B A Y O

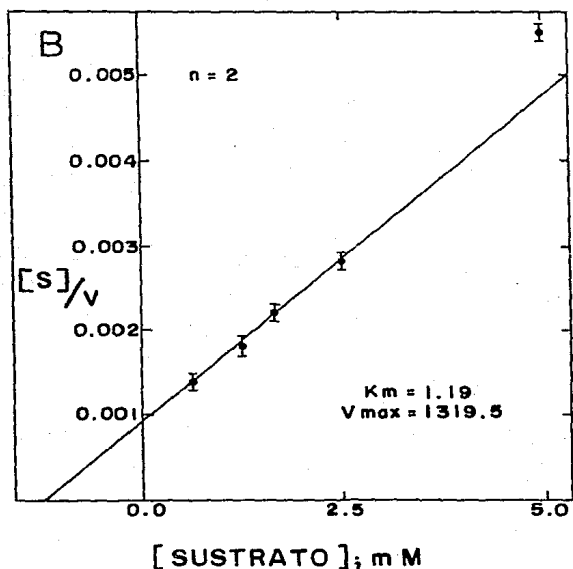
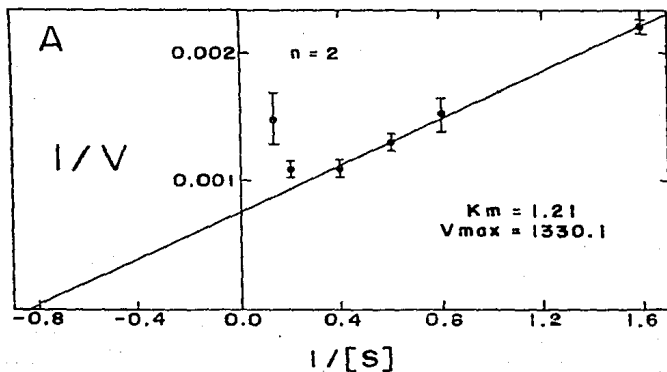


FIGURA 17. DETERMINACION DE K_m Y V_{max} DE LA ECA DE COBAYO POR LO METODOS DE LINEWEAVER-BURK (A) Y HANES-WOOLF (B).

R A T O N

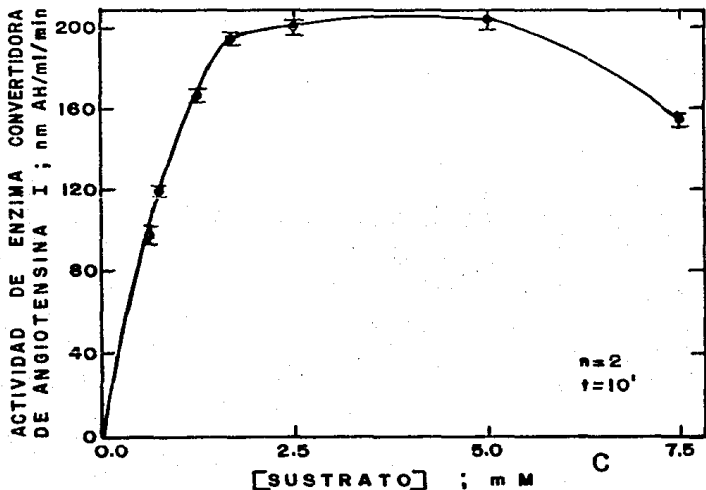
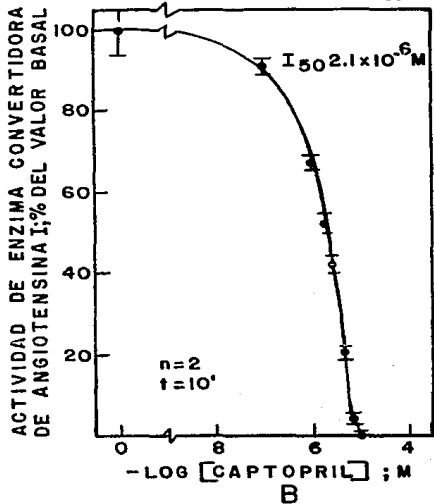
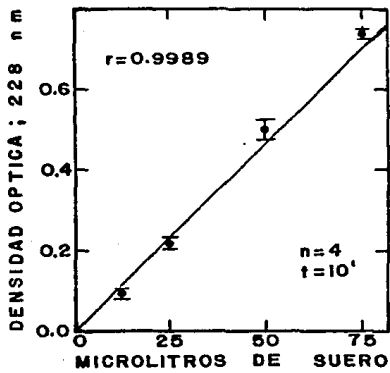


FIGURA 18. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION DE LA ECA DE RATON

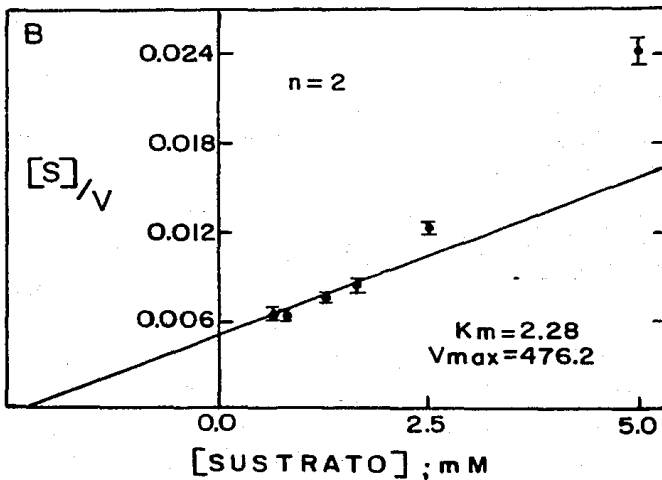
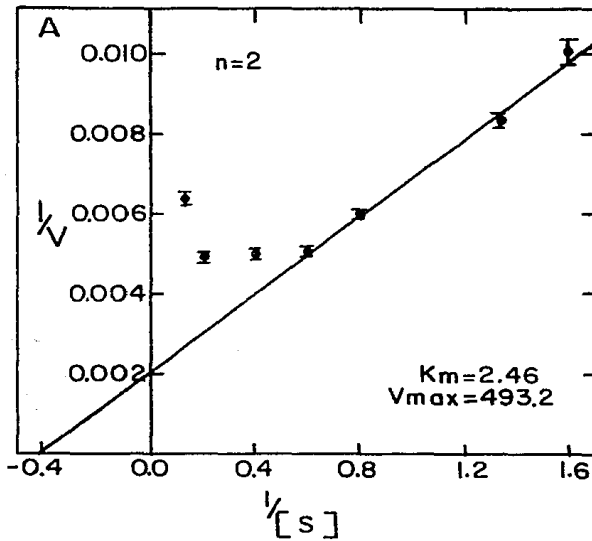


FIGURA 19. DETERMINACION DE K_m y V_{max} DE LA ECA DE RATON POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK (A) Y HANES-WOOLF (B).

H A M S T E R

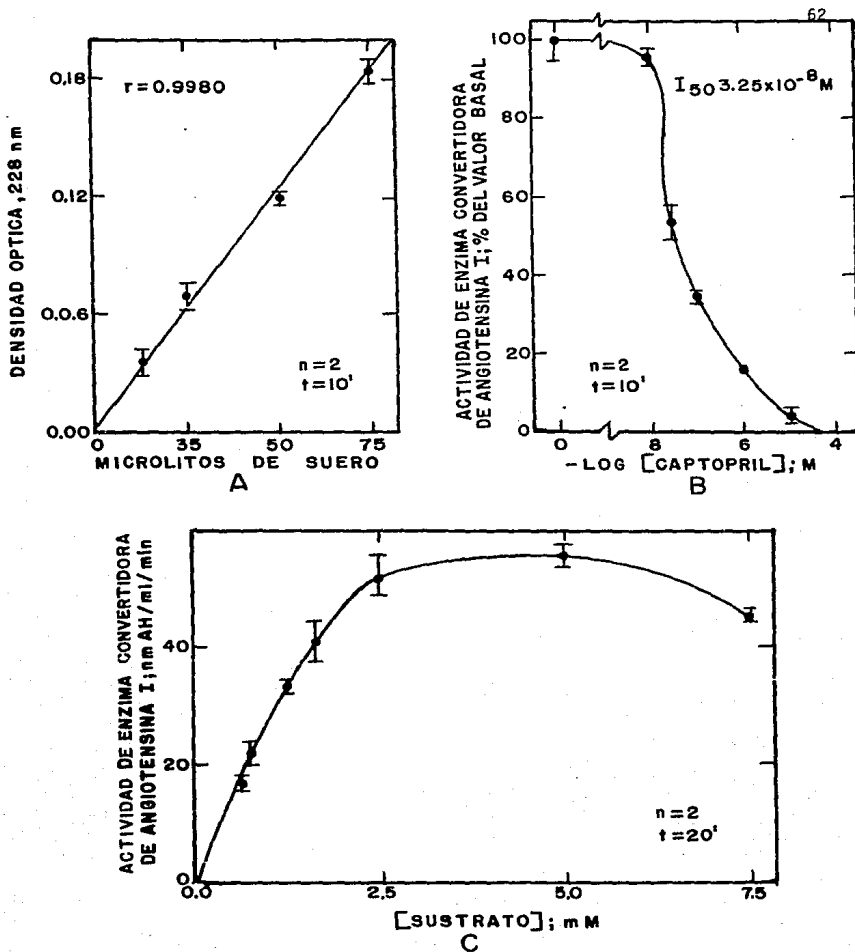


FIGURA 20. CURAVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION (C) DE LA ECA DE HAMSTER

H A M S T E R

63

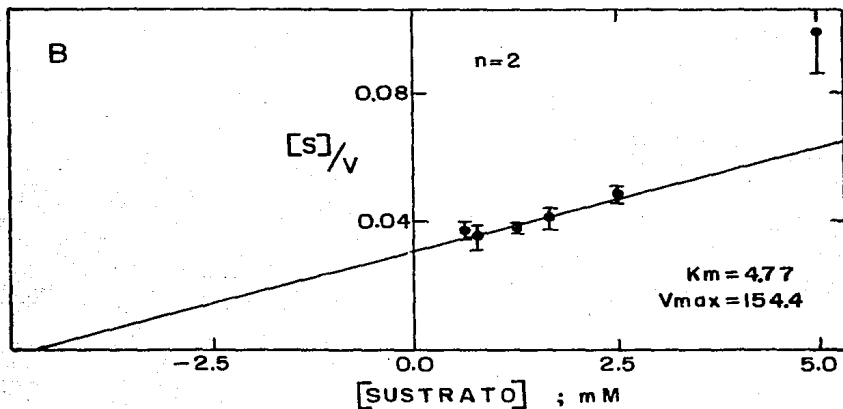
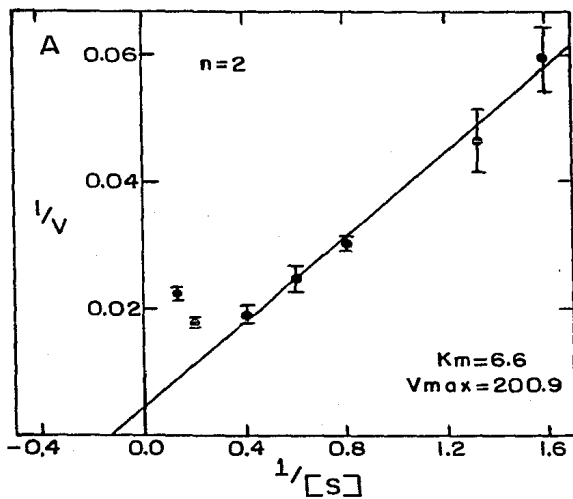


FIGURA 21. DETERMINACION DE K_m y V_{max} DE LA ECA DE HAMSTER POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK (A) Y HANES WOOLF (B).

C A B A L L O

64

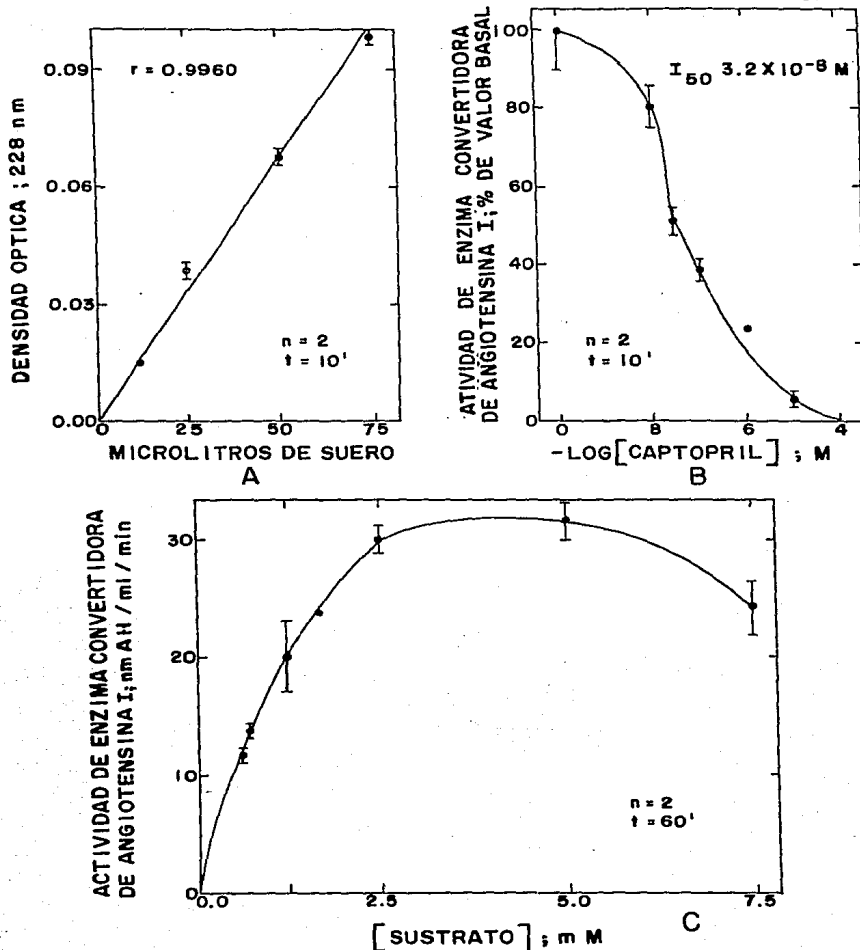


FIGURA 22. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION (C) DE LA ECA DE CABALLO

C A B A L L O

65

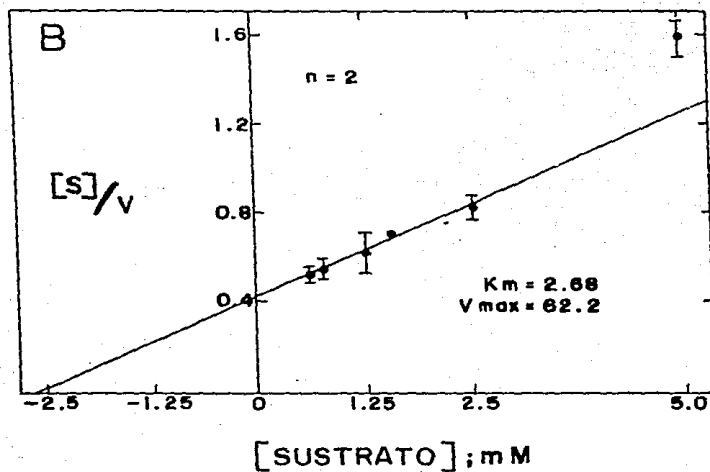
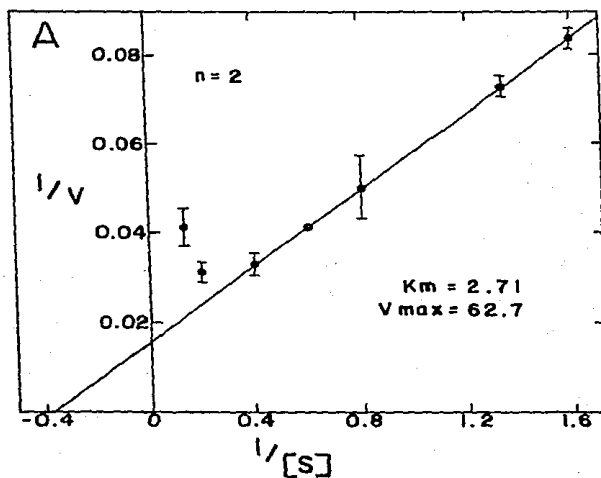


FIGURA 23. DETERMINACION DE K_m Y V_{max} DE LA ECA DE CABALLO POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK (A) Y HANES-WOOLF (B).

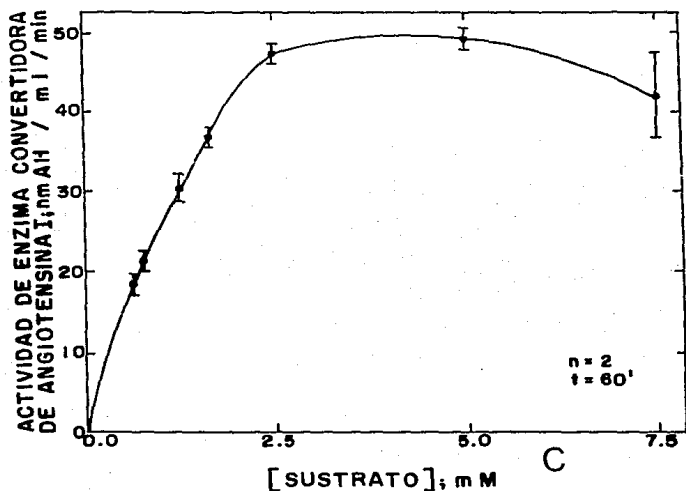
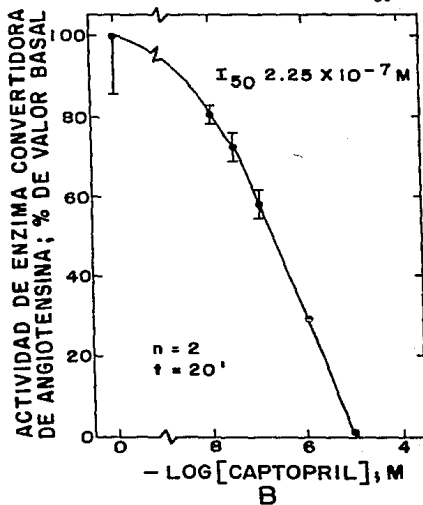
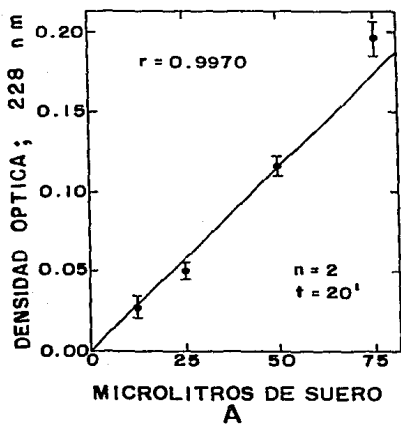


FIGURA 24. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION (C) DE LA ECA DE CONEJO.

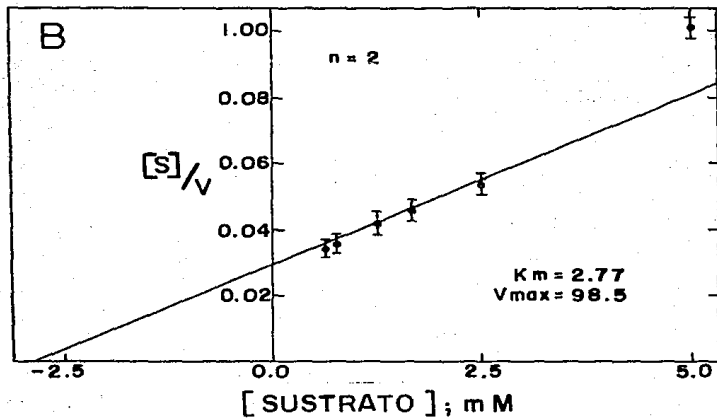
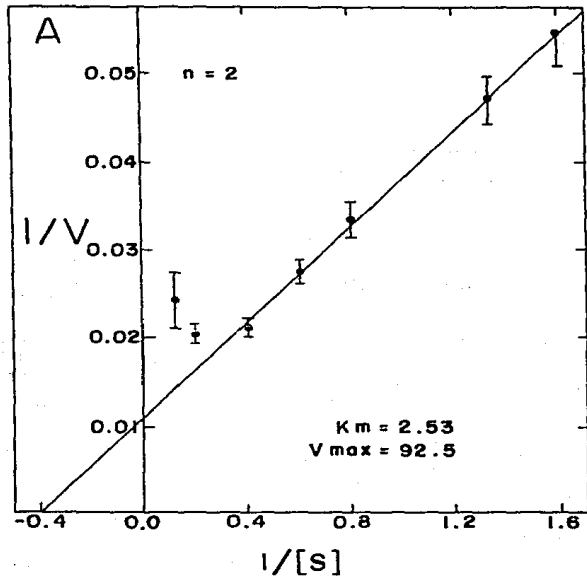


FIGURA 25. DETERMINACION DE K_m y V_{max} DE LA ECA DE CONEJO POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK (A) Y HANES-WOOLF (B).

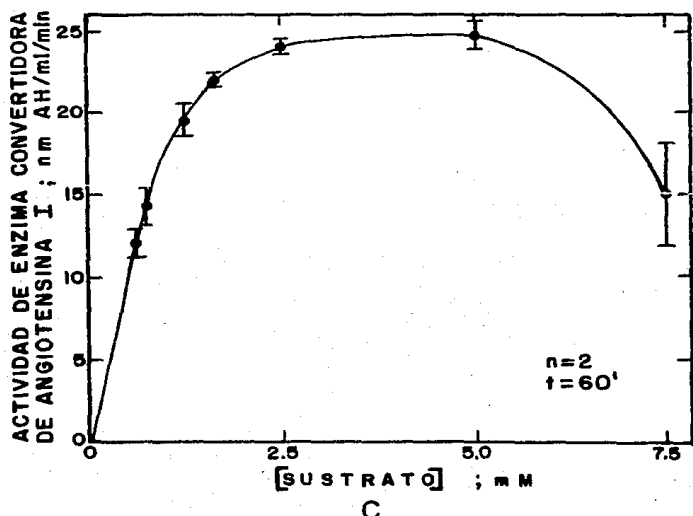
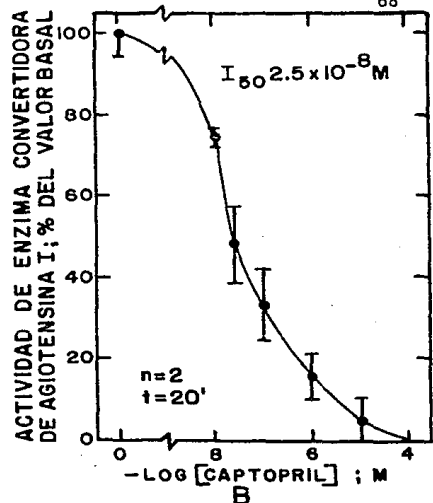
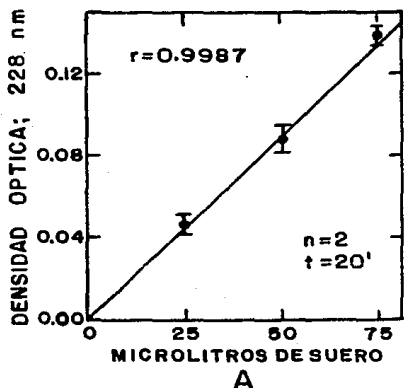


FIGURA 26. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION (C) DE LA ECA DE HOMBRE

H O M B R E

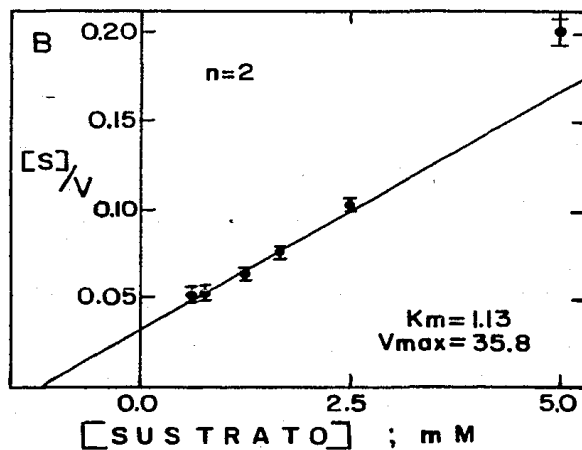
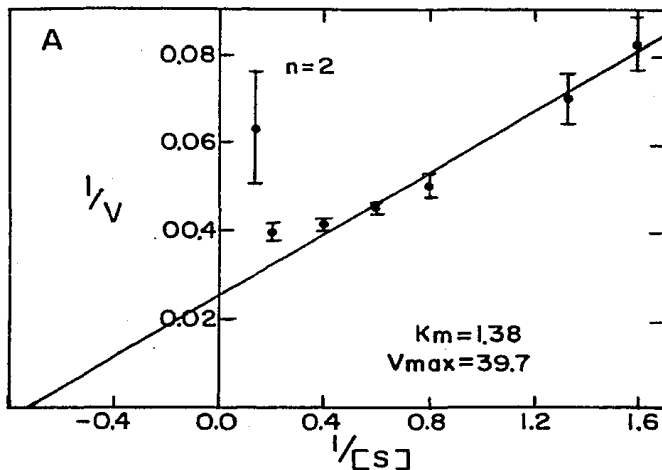
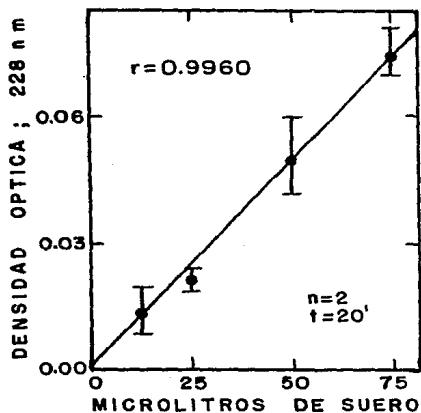
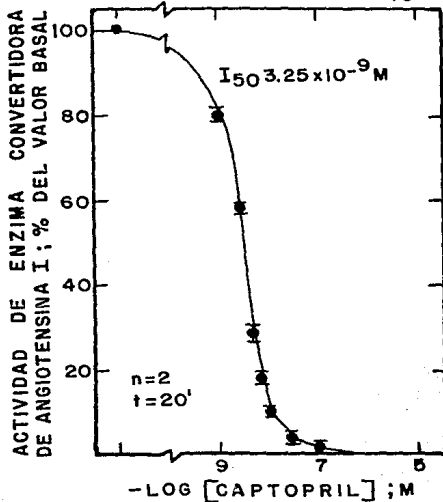


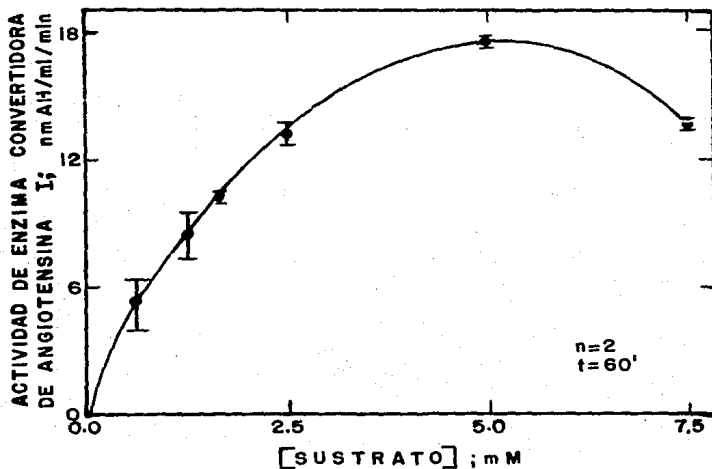
FIGURA 27. DETERMINACION DE K_m y V_{max} DE LA ECA DE HOMBRE POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK Y HANES-WOOLF.



A



B



C

FIGURA 28. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION (C) DE LA ECA DE BORREGO

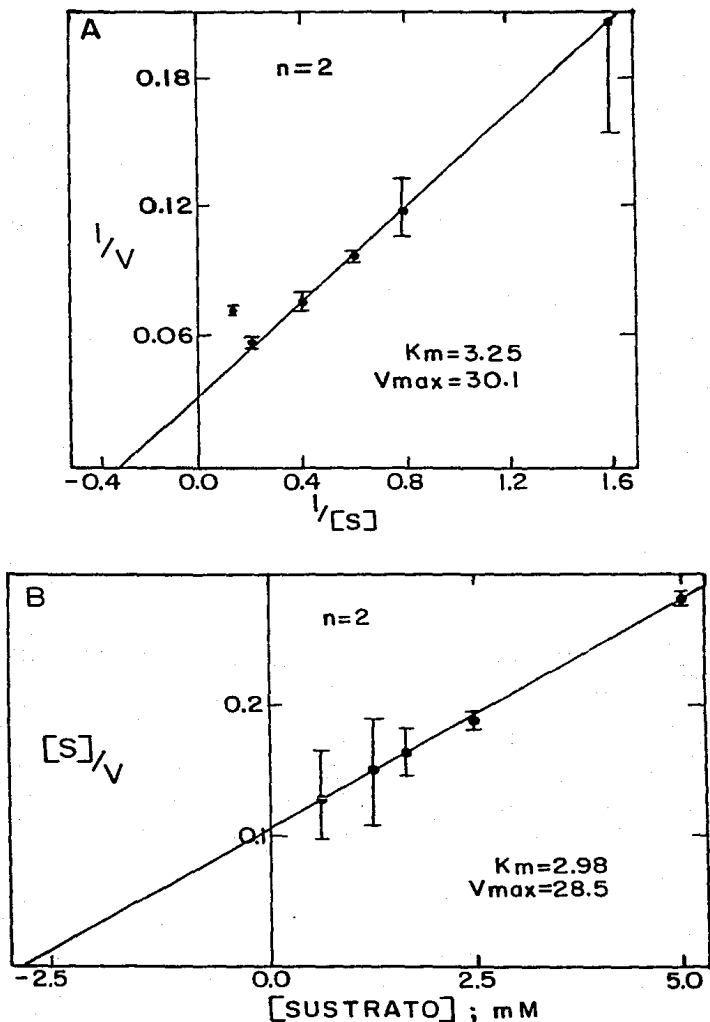


FIGURA 29 . DETERMINACION DE K_m y V_{max} DE LA ECA DE BORREGO POR LO METODOS DE LINEWEAVER-BURK Y HANES-WOOLF.

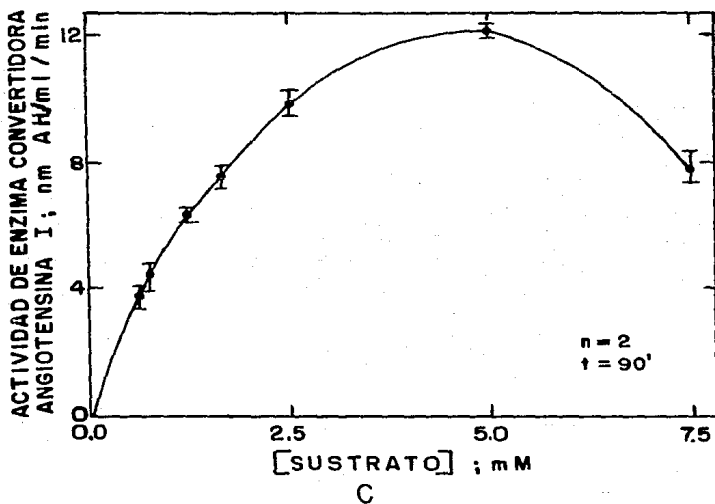
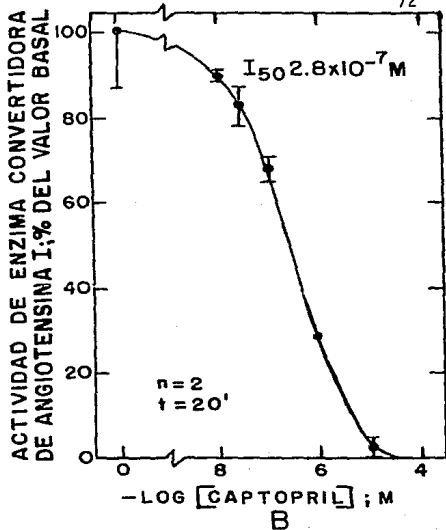
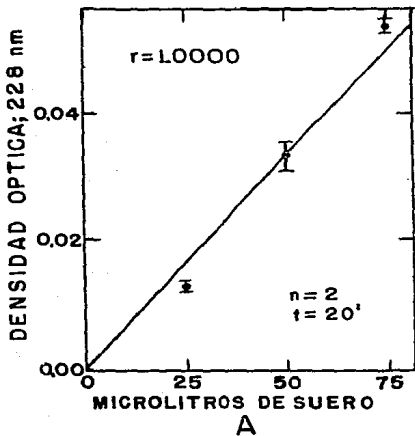


FIGURA 30. CURVAS DE LINEARIDAD (A), INHIBICION (B) Y SATURACION DE LA ECA DE PERRO.

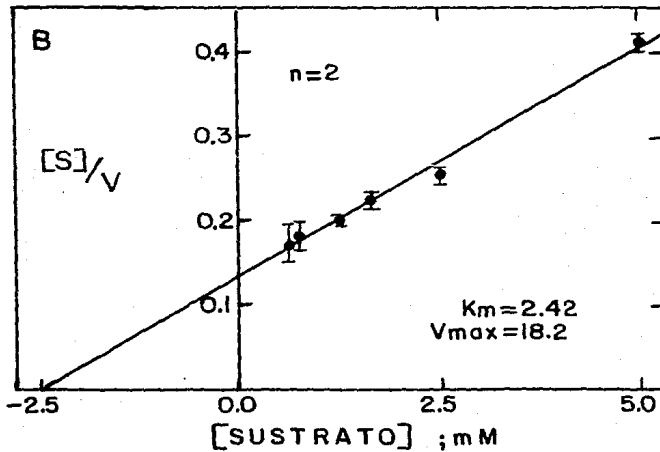
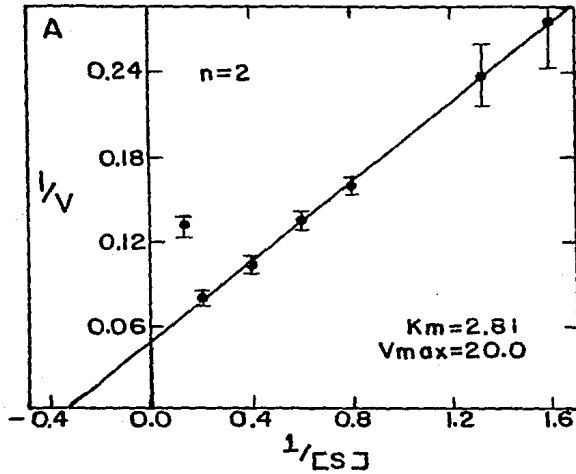


FIGURA 31. DETERMINACION DE LA K_m Y V_{max} DE LA ECA DE PERRO POR LOS METODOS DE LINEWEAVER-BURK Y HANES-WOOLF.

TABLA V. CONDICIONES OPTIMAS DE ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ECA, ACTIVIDAD DE ECA Y GASTO DE SUSTRATO EN CADA GRUPO DE RATAS.

GRUPO	VOLUMEN DE INCUBACION (μ l)	TIEMPO DE INCUBACION (min)	ACTIVIDAD DE ECA nm AH/ml/min.	GASTO DE SUSTRATO %
↓Na	50	10	115.0	9.20
BIN	50	10	121.5	9.72
PRO	50	10	130.4	10.43
CLO	50	10	132.9	10.63
DESH	50	10	135.0	10.80
ISO	50	10	135.4	10.83
Na 1%	50	10	143.8	11.50
AN	50	10	144.9	11.59
Na 2%	50	10	146.5	11.72
N	50	10	152.6	12.21
URE	30	10	163.8	7.86
HIP REN	30	10	174.5	8.38
NEF	25	10	309.5	12.38

3. CURVAS DE INHIBICIÓN.

También se construyeron curvas de inhibición con captopril que, además de probar que se estaba midiendo la ECA, nos dió información acerca de la sensibilidad diferencial (en las distintas especies) a la inhibición por esta droga. Las curvas de inhibición se presentan en las figuras 14-B, 16-B, 18-B, 20-B, 22-B, 24-B, 26-B, 28-B, 30-B. A partir de estas curvas de inhibición se calculó la I_{50} y la K_i para cada una de las especies. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla VII. Como se puede observar la especie que presenta una K_i mayor es el ratón y la que presenta una K_i menor es el borrego.

4. ACTIVIDAD DE ECA EN LAS DISTINTAS ESPECIES ESTUDIADAS

Estos resultados de actividad de ECA se muestran en la tabla VI y en la Fig. 32.

TABLA VI. CONDICIONES OPTIMAS DE ENSAYO, ACTIVIDAD DE ECA Y GASTO DE SUSTRATO EN
CADA ESPECIE ESTUDIADA

ESPECIE	Vol. Inc. (μ l)	Tiempo Inc. (min)	Act. ECA nm/ml/min	Gasto Sust. %
Cabayo	5	10	937.7	7.50
Ratón	30	10	282.9	13.58
Rata	50	10	152.6	12.21
Hamster	50	10	72.9	5.83
Caballo	50	10	43.3	3.46
Conejo	50	20	38.3	6.13
Hombre	50	20	22.9	3.66
Borrego	50	20	22.7	3.63
Perro	50	20	12.8	2.05

TABLA VII CARACTERISTICAS DE LA ECA EN LAS DIFERENTES ESPECIES ESTUDIADAS EN ESTE TRABAJO.

ESPECIE	ACTIVIDAD nm AH/ml/min	Km mM	Vmax nm AH/ml/min	I ₅₀ M	Ki M
COBAYO	937.7	1.21	1330.1	1.0×10^{-6}	1.95×10^{-7}
RATON	282.9	2.46	493.2	2.1×10^{-6}	6.92×10^{-7}
RATA	152.6	3.33	257.3	1.3×10^{-7}	5.2×10^{-8}
HASMTER	72.9	6.56	200.9	3.2×10^{-8}	1.84×10^{-8}
CABALLO	43.3	2.71	62.8	3.2×10^{-8}	1.12×10^{-8}
CONEJO	38.3	2.53	92.5	2.2×10^{-7}	7.56×10^{-8}
HOMBRE	22.9	1.38	39.7	2.5×10^{-8}	5.41×10^{-9}
BORREGO	22.7	3.25	30.1	3.2×10^{-9}	1.26×10^{-9}
PERRO	12.8	2.81	20.0	2.8×10^{-7}	1.01×10^{-7}

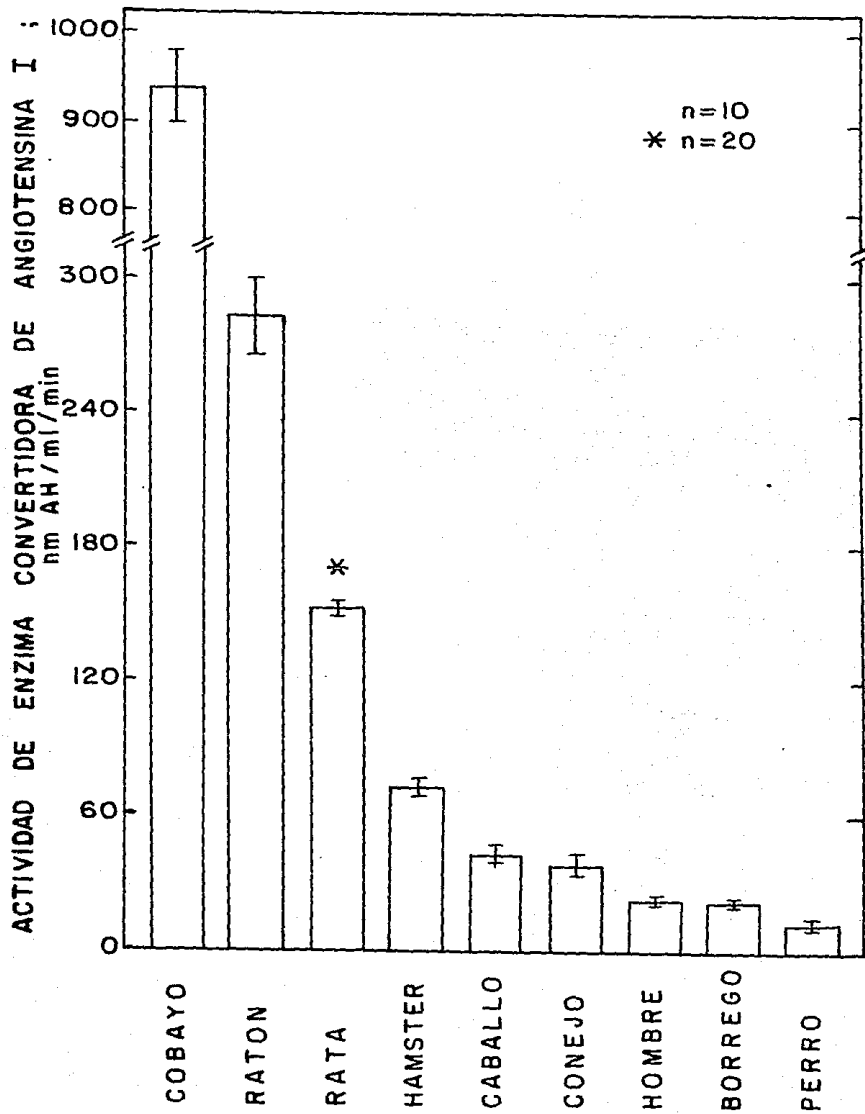


FIGURA 32. ACTIVIDAD SERICA DE ECA EN LAS DIFERENTES ESPECIES ESTUDIADAS

Como se puede observar la especie que presenta la mayor actividad sérica de ECA es el cobayo, y es casi 80 veces el valor obtenido para el perro, que es la especie que presenta la menor actividad.

5. CARACTERIZACION DE LOS DIFERENTES MODELOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS DE RATAS

5.1 SODIO

Los valores de Na urinario en los grupos de ratas normales y con distintas dietas de cloruro de sodio se observan en la Fig. 33 comparados con los valores séricos de ECA. Se puede ver que en el grupo de dieta baja en Na hay una excreción muy reducida de Na con respecto a las normales ($p < 0.005$) y en los grupos con dietas de Na al 1% y al 2% el aumento en la excreción de Na es significativamente mayor que en el grupo de ratas normales ($p < 0.005$ en ambos casos), presentando la mayor excreción el grupo de Na al 2%.

Con respecto a la concentración de Na sérico se observa un aumento en los grupos Na ($p < 0.025$), Na 2% ($p < 0.05$), DESH ($p < 0.005$) y AN ($p < 0.025$). Se observa una disminución en los grupos BIN ($p < 0.025$) y URE ($p < 0.01$). El único grupo que no presentó diferencia significativa en este parámetro fue Na 1% (Fig. 34).

5.2 CREATININA

Los resultados de creatinina sérica obtenidos están graficados en la Fig. 34, donde podemos observar los cambios que presentan los diferentes grupos de ratas en este parámetro junto con la actividad de ECA y el Na en suero. La concentración de creatinina en el suero de las ratas URE y BIN está marcadamente elevada con respecto al resto de los grupos, lo cual confirma la insuficiencia renal aguda de esas ratas. Las ratas de estos dos grupos tuvieron anuria como era de esperarse. En el caso de las ratas URE se observó un considerable aumento en el tamaño de sus riñones.

5.3 RENINA

La secreción de renina está aumentada en la dieta baja en Na, y en las ratas deshidratadas (ver figura 3 a). La secreción de renina está suprimida en las ratas del grupo BIN. La anestesia aumenta considerablemente la secreción de renina, y este aumento puede explicarse de manera muy importante por el aumento de la actividad adrenérgica, ya que es bloqueado casi en su totalidad por el propranolol (81). El isoproterenol agonista beta puro aumenta la secreción de

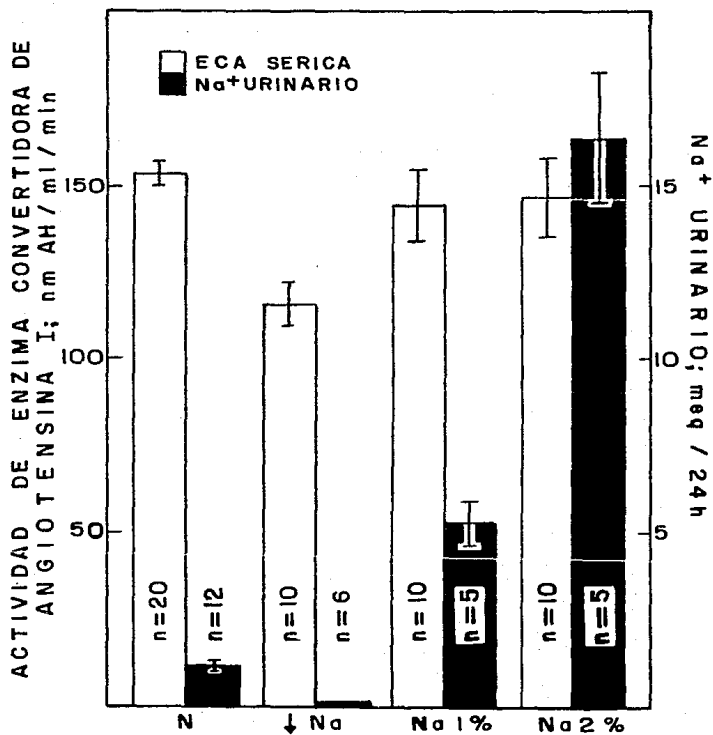


FIGURA 33. COMPARACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE ECA Y EL SODIO EXCRETADO EN LAS RATAS CON DISTINTAS DIETAS DE SODIO.

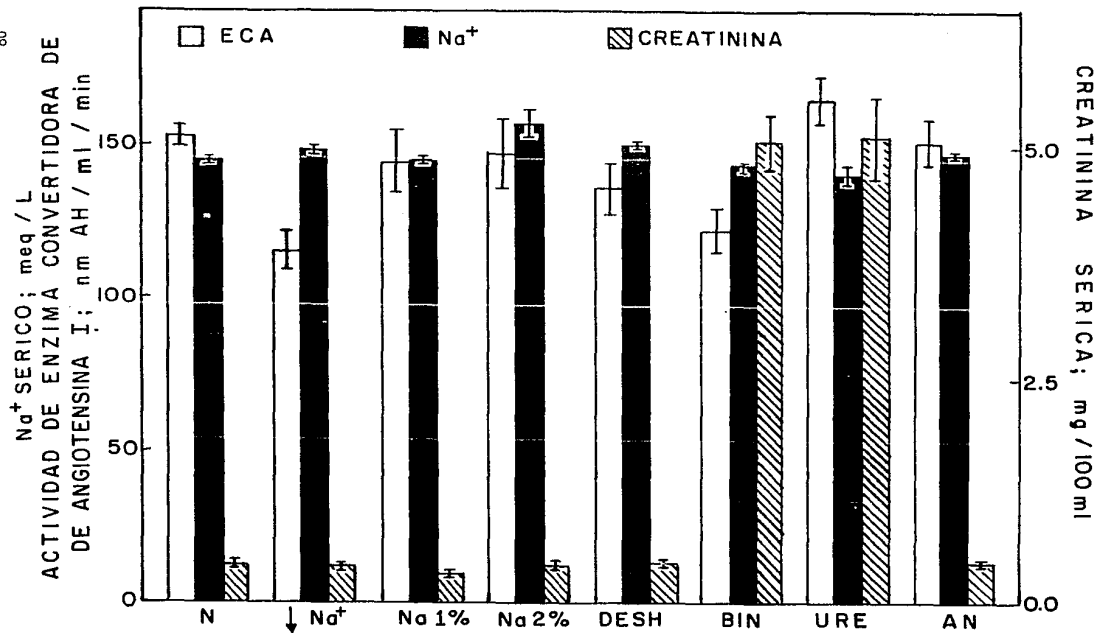


FIGURA 34. COMPARACION DE ACTIVIDAD DE ECA, SODIO Y CREATININA SERICOS EN DIFERENTES MODELOS DE RATAS.

renina considerablemente (81, 82), al igual que la clonidina (82), un agonista alfa-2 adrenérgico (83) (Tabla VIII). Las ratas urémicas (URE) no muestran cambios en la secreción de renina (84). En las ratas hipertensas renovasculares (HIP REN) es bien conocido que la hipertensión es causada por un aumento en la secreción de renina (2), ya que es revertida por bloqueadores del SRAA. La secreción de renina está aumentada en el síndrome nefrótico experimental (85).

TABLA VIII. MODULACION ADRENERGICA Y POR ANESTESICOS DE LA SECRECION DE RENINA (81, 82).

CPR		
CONTROL	58 [±] 6	n=7
ETER	250 [±] 49	n=6
APR		
CONTROL	8 [±] 0.4	n=10
CLO	1 [±] 0.4	n=10
ISO	100 [±] 5.0	n=10
PRO	1 [±] 0.2	n=10

Todos los grupos presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

5.4 TENSION ARTERIAL

Las ratas HIP REN presentaron un aumento en la tensión arterial media de 100[±]8 mm de Hg en las controles a 178[±]6.9 mm de Hg (n=9), p 0.005.

5.5 SINDROME NEFROTICO

El síndrome nefrótico se caracterizó por proteinuria, hipoproteinemia, alta concentración de aldosterona en suero, alta concentración de renina, disminución de la excreción de sodio, aumento en la excreción de aldosterona y disminución de la concentración de angiotensinógeno (Tabla IX).

En la tabla X se resumen los parámetros por medio de los cuales se validó cada uno de los modelos fisiológicos y patológicos estudiados.

TABLA IX. DETERMINACIONES REALIZADAS PARA CARACTERIZAR AL SINDROME NEFROTICO.

PARAMETERO	CONTROLES	NEFROTICAS
PROTEINA EN SUERO (g/100 ml)	7.39 [±] 0.32	4.88 [±] 0.19
PROTEINA EN ORINA (mg/24 h)	8.26 [±] 3.45	300.00 [±] 51
CPR (ng AI/ml/h)	29.33 [±] 8.33	177.33 [±] 16.67
ALDOSTERONA EN PLASMA (pg/ml)	351.30 [±] 43.48	808.70 [±] 95.65
ALDOSTERONA EN ORINA (ng/24h)	20.69 [±] 1	327.59 [±] 26.21
SODIO EN ORINA (mEq/24 h)	0.94 [±] 0.06	0.20 [±] 0.09

NOTA: Todos los valores son significativamente diferentes del control ($p < 0.005$)

TABLA X. RESUMEN DE LOS PARAMETROS QUE CARACTERIZAN A CADA MODELO USADO.

MODELO	PARAMETROS
DIETA BAJA EN SODIO (↓Na)	Sodio urinario y sérico, renina
DIETA CON NaCl 2% (Na 2%)	Sodio urinario y sérico, renina
DIETA CON NaCl 1% (Na 1%)	Sodio urinario
DESHIDRATADAS (DESH)	Sodio sérico, renina
BINEFRECTOMIZADAS (BIN)	Creatinina, renina, angiotensinógeno
ANESTESIADAS (AN)	Renina
UREMICAS (URE)	Creatinina, angiotensinógeno
ADRENERGICOS (ISO,PRO,CLO)	Renina
HIPERTENSAS (HIP REN)	Tensión arterial, renina.

6. ACTIVIDAD DE ECA EN LOS DIFERENTES MODELOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS DE RATAS.

Los valores obtenidos para la actividad sérica de ECA en los distintos grupos de ratas estudiadas se muestran en la tabla V y en la Fig. 35. Como se puede observar, los grupos con diferencia significativa son: a) Con valores menores que el grupo normal: ↓ Na, DESH, BIN, ISO, PRO y CLO; b) Con valores mayores que el grupo normal: HIP REN y NEF.

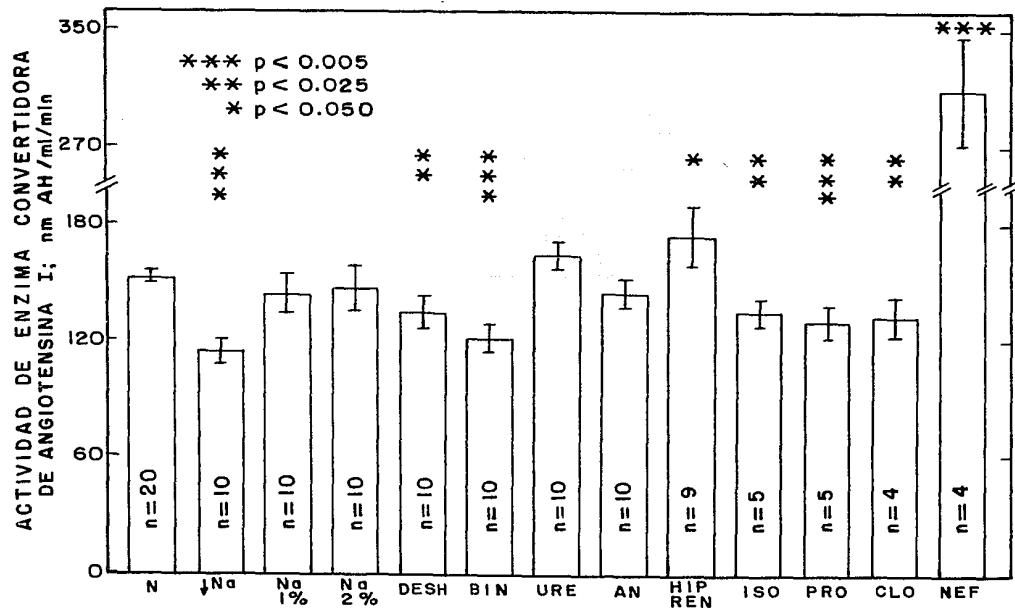


FIGURA 35. ACTIVIDAD DE ECA EN LOS DIFERENTES MODELOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS ESTUDIADOS.

V D I S C U S I O N

D I S C U S I O N

La ECA es una enzima muy importante dentro del SRAA. Para tratar de investigar el posible papel regulatorio de esta enzima y sus características en diferentes especies de mamíferos que pueden ser utilizados en un momento dado como animales de experimentación, se realizó el presente trabajo escogiendo y desarrollando un método para medir la actividad sérica de ECA. Aunque hoy en día existen diversos métodos para medir su actividad (46-51, 86), el más utilizado ha sido el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung (32) con algunas variaciones (57, 87). Este fue el método utilizado a lo largo del presente trabajo encontrándose que es un método sencillo y sensible que requiere solo de equipo de laboratorio común y es relativamente barato. Además, este método ha sido comparado con otros (48) y utilizando otros sustratos (86) encontrándose una alta correlación.

Aunque algunos autores (86) afirman que este método no es bueno para determinar la actividad de la ECA en muestras que contengan altas concentraciones de lípidos debido a que estos pueden extraerse y absorben a 228 nm, por la experiencia en el presente trabajo, sobre todo en el caso de las muestras de ratas nefróticas que presentan una lipemia bastante marcada, se puede decir que esta afirmación no tiene validez, ya que, aunque sí se observa una absorbencia mayor en estas muestras que en el resto que no presentan lipemia, esta posible alteración en la determinación de la actividad de la ECA se evita al restar la absorbencia de las determinaciones blanco a las problema. Por otra parte, cuando se empezó a montar la técnica para medir la actividad de la ECA se tuvieron problemas de turbidez al redisolver en agua destilada lo extraído con el acetato de etilo, estos problemas seguramente se debían a que no solo se extrae el ácido hipúrico producido durante la incubación en el acetato, sino también otros componentes del suero como por ejemplo lípidos. Esto se pudo resolver resuspendiendo lo extraído con el acetato de etilo en etanol quedando las muestras totalmente transparentes.

Algunos autores como Baggio et al (70) han reportado una disminución en la actividad de la ECA en muestras que han sido sometidas a congelaciones y descongelaciones sucesivas. En contraste, otros autores como Pietilä y Koivula (88) han encontrado un aumento de aproximadamente un 15% en la actividad de ECA en muestras congeladas y descongeladas (a menos 20 o menos 70°C una sola vez). Sin embargo, en el

presente trabajo se observó que si la muestra de suero se congela y descongela una sola vez, la actividad de la ECA es la misma que aquella determinada recién obtenida la muestra, independientemente del tiempo de congelación (hasta 5 meses) a menos 20°C, pero si la muestra se congela y descongela por segunda vez la actividad de la ECA disminuye. Por esta razón todas las muestras usadas en este trabajo fueron congeladas y descongeladas una sola vez, o bien se les determinó la actividad de ECA recién obtenidas.

La validación del método se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Como primer paso se realizaron pruebas de recuperación de ácido hipúrico obteniendo un promedio del 87.64% el cual se puede considerar como bastante aceptable. Además, en cada ensayo a lo largo del trabajo se hizo una prueba de recuperación corrigiendo con esto el factor de cálculo para cada uno.

b) El segundo paso fueron las pruebas de reproducibilidad intra e interensayo que, por los coeficientes de variación obtenidos en estas, se puede decir que este es un método altamente reproducible.

c) La tercera forma de validar el método fueron las pruebas de linealidad. Aunque el gasto de sustrato en algunos casos fue relativamente alto (tablas V y VI), y la concentración del mismo no fue mucho mayor que la K_m , se consideró estar trabajando en condiciones en la que el sustrato no era una limitante para la reacción (condiciones de saturación) al probar la linealidad de la producción de ácido hipúrico por la hidrólisis del sustrato (HHL) contra el volumen de muestra utilizado (concentración de enzima) en cada una de las especies estudiadas, donde se puede ver que si se duplica el volumen de suero usado, la producción de ácido hipúrico también se duplica (89). Además, como se puede ver en las curvas de saturación de cada especie, el HHL a grandes concentraciones (mayores de 5 mM) inhibe la reacción, observación también encontrada por otros autores (31, 33, 47). Según Lanzillo (42) a concentraciones arriba de cuatro o cinco veces la K_m la ECA presenta una inhibición por sustrato o por una retroalimentación negativa por producto.

d) Como último paso se realizaron las curvas de inhibición con captopril, probando con esto que efectivamente se estaba midiendo la actividad de ECA ya que éste es un inhibidor específico de la enzima.

Probando previamente las condiciones de ensayo que se deben usar, este método es una herramienta útil para comparar la actividad de ECA en diferentes mamíferos que tengan una angiotensina I con la misma secuencia de aa (Ile⁵-angiotensina I), ya que se intentó medir la actividad de ECA en vacas (Bos taurus) que tienen una Val⁵-angiotensina I y no se detectó actividad alguna.

Las especies estudiadas en este trabajo presentan diferentes valores de Km (tabla VII) lo cual puede indicar que la ECA de las diferentes especies presenta distintas afinidades por el HHL. Las diferencias tan grandes en la actividad de la enzima podrían ser resultado de esto y no de una diferencia real en la concentración sérica de ECA en cada especie, pero la actividad de la enzima no refleja la afinidad por el sustrato según los resultados obtenidos en este trabajo (tabla VII).

Al igual que existen diferencias en la actividad de ECA de las diferentes especies por el sustrato, también el captopril, aunque en todos los casos mida la enzima presenta una afinidad distinta por la ECA de cada especie como se puede ver por las diferentes K_i e I_{50} obtenidas (tabla VII). Esto es útil saberlo, ya que al tener una potencia de inhibición diferente para la ECA de cada una de las especies de mamíferos estudiadas, se necesita el uso de diferentes dosis de captopril en distintos animales de experimentación si se desea lograr el mismo efecto. Como se puede ver en la tabla VI, no existe relación entre la actividad sérica de ECA y la capacidad de inhibición de captopril en las especies estudiadas.

El cálculo de K_i no se hizo de la manera clásica (haciendo curvas de saturación con diferentes concentraciones de inhibidor) si no que se utilizó el método descrito por Cheng y Prusoff (80) que resulta ser mucho más sencillo y práctico.

Aunque no en todos los casos, si en la mayoría, los valores de Km y Vmax calculados por el método de Lineweaver-Burk (donde $b=1/V_{max}$ y $x=-1/K_m$) coincidieron con los valores calculados por el método de Hanes-Woolf (donde $x=-K_m$ y $m=1/V_{max}$). Los dos casos en los que estos valores difieren ligeramente son la rata y el hamster.

Las grandes diferencias de Km, Vmax y K_i e I_{50} para el captopril entre las diferentes especies tal vez están reflejando diferencias en la estructura tridimensional de cada una. Aunque algunos autores han reportado semejanzas en cuanto a la se-

cuencia de su estructura o conformación tridimensional puede ser distinta. De hecho, la dependencia al cloro, aunque es similar, no es igual entre las diferentes especies y esto puede ser el reflejo de diferencias en cuanto a su conformación ya que se piensa en el cloro como un modificador conformacional de la enzima (29).

Se han hecho estudios comparativos de la ECA en varias especies. Takada et al (90) estudiaron algunas características bioquímicas e inmunológicas de ECA de riñón de humano, bovino, perro, cerdo, conejo, rata y borrego. Encontraron que el peso molecular de la ECA renal de perro, humano, cerdo, conejo y rata era de 290 000 d, mientras que la de bovino y borrego era de 340 000 d, después del tratamiento con neuroaminidasa. Las propiedades sintéticas de estas preparaciones fueron similares con respecto al valor de Km, activación por cloruro e inhibición por inhibidores de la ECA (captopril y SA-446). Los autores concluyeron que las propiedades catalíticas de la ECA renal de las especies de mamíferos son similares. En este mismo estudio, los anticuerpos contra ECA de riñón humano inhibieron parcialmente la actividad de las enzimas de perro, cerdo y rata, pero no las de bovino, borrego y conejo. No hay una regla general en relación a las propiedades catalíticas e inmunológicas de la ECA de riñón entre las siete diferentes especies desde el punto de vista filogenético, conclusión que también se puede sacar de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por otra parte Miyasaki et al (29) han estudiado la ECA vascular de hombre y otras especies. En cuanto a la dependencia del cloro encontraron que las actividades máximas de ECA de diferentes tejidos de perro, humano, mono y conejo fueron de 800, 600, 600 y 300 mM. Las concentraciones óptimas de cloro fueron idénticas para diferentes tejidos y plasma de la misma especie. También se estudió la inhibición por SA 446, la cual fué dependiente de la concentración. La I_{50} no difirió apreciablemente en arteria pulmonar y renal, pero la diferencia entre las especies no fué estudiada. También encontraron que la ECA en plasma de diferentes especies cambia en el siguiente orden, de mayor a menor: rata, mono, humano y perro, resultados que coinciden con los datos obtenidos en este trabajo.

Existen diferencias considerables en cuanto a la distribución tisular de la enzima de distintas especies. Por ejemplo, el riñón de rata es pobre en ECA, mientras que el riñón humano es rico en esta; en perro, el plexo coroideo presenta mucho mayor actividad de ECA que la corteza cerebral, en cambio en mono la corteza cerebral es más rica en ECA que el plexo coroideo. (29).

De las especies en las que se ha determinado, el cobayo es el que presenta el nivel más alto de actividad de ECA sérica y se puede especular que esto puede proteger al animal por la inactivación rápida de la bradiginina ya que el cobayo es un animal altamente sensible a la broncoconstricción y la bradiginina es un potente broncoconstrictor. Además, la conversión rápida de AI a AII en la sangre de cobayo puede causar la liberación de catecolaminas, las cuales lo protegen contra la broncoconstricción. Este es el único caso en el que se ha encontrado una explicación al nivel de actividad de ECA sérica, pero en términos generales el significado fisiológico de las grandes diferencias de actividad sérica de ECA y distribución tisular entre las diferentes especies de mamíferos estudiados no es claro. No existe ninguna correlación entre los parámetros determinados para la ECA de cada especie estudiada (actividad, K_m , V_{max} y K_i e I_{50} para el captopril) y las relaciones filogenéticas entre ellas, así como su tamaño, tipo de alimentación, forma de vida, etc.

Debido a que la ECA se encuentra en múltiples tejidos, probablemente sus funciones también sean múltiples. Por ejemplo, en el pulmón la enzima se localiza en el endotelio vascular y las arterias pulmonares contienen más ECA que otros vasos. De aquí que la ECA pueda ser importante para la regulación de la presión sanguínea sistémica al metabolizar péptidos vasoactivos por liberación de AII, por inactivación de bradiginina, e, hipotéticamente, por la ruptura de enlaces accesibles en otros péptidos circulantes. Debido a que la enzima es inhibida con relativa facilidad por péptidos que es tán presentes en la sangre, tal como el sustrato competitivo bradiginina, insulina y sus fragmentos, estos inhibidores pueden influir en la acción de la enzima.

En el cerebro y la hipófisis, la ECA puede ser importante para convertir AI debido a los efectos de AII sobre los centros simpáticos y sobre el reflejo de la sed. La presencia de la enzima en el plexo coroideo sugiere la importancia de la conversión de AI para el reflejo de la sed, ya que este se encuentra próximo al cuerpo subfornical, sitio en el que la AII puede producir su acción dipsogénica.

Debido a que el riñón presenta una alta concentración de ECA es probable que, al contrario que en el pulmón, la ECA renal no metabolice péptidos en la circulación sistémica, sino que tenga un papel intrarrenal, ya que la enzima dentro del riñón se localiza no solo en el endotelio vascular sino también en otros tipos de células tales como las células tubulares.

La adición de AI en las arterias de perro aisladas expuestas a soluciones arti-

ficiales produce un rápido desarrollo de la contracción, el cual es suprimido por el tratamiento con inhibidores de la ECA. La enzima presente en la pared arterial parece ser suficiente para convertir AI rápidamente a AII, la cual actúa sobre los receptores de AII en músculo liso responsables de la contracción arterial y sobre las terminaciones adrenérgicas nerviosas responsables de la acelerada liberación del neurotransmisor noradrenalina.

Según los estudios de Oats et al. sobre la ECA durante el embarazo (68), esta enzima se encuentra inversamente alterada con respecto a otros componentes del sistema como por ejemplo la APR, es decir, este parámetro aumenta pero la ECA disminuye. Estos resultados llevaron a los autores a pensar que la ECA puede tener un papel regulatorio del SRAA. Por otra parte, se ha observado que en humanos a grandes altitudes se presenta una alta APR y una baja concentración de aldosterona, y esto se puede explicar por una baja actividad de ECA, lo cual se ha comprobado por los experimentos realizados por Millidge y Catley (45). Estas observaciones también llevan a pensar en un posible papel regulatorio de la ECA sobre el SRAA. En resumen, si la ECA juega un papel regulatorio dentro del sistema, su actividad debe modificarse de manera opuesta al flujo de la vía.

Los modelos fisiológicos que apoyan la teoría de que la ECA puede jugar un papel regulatorio en la actividad del SRAA son:

- a) ↓Na.- En estas ratas se pudo observar una disminución estadísticamente significativa en la actividad sérica de la ECA. Esto puede ser una respuesta al aumento de la APR, es decir, al haber un exceso de renina hay mucho sustrato para la ECA (AI) lo cual agota las reservas de ECA y por lo tanto disminuye su actividad sérica. Por otra parte, también se puede deducir un papel regulatorio de la ECA dentro del SRAA a partir del hecho de que la APR aumenta y, apesar de la disminución de la actividad de la ECA, el sodio sérico también se eleva; si la actividad de la enzima se mantuviese normal o se elevara, la retención de sodio sería aún más marcada y llevaría a concentraciones suprafisiológicas de este parámetro.
- b) DESH.- En este modelo, como era de esperarse, la concentración de sodio sérico aumenta significativamente y el valor de APR aumenta por la necesidad de restablecer el volumen sanguíneo reteniendo agua, sin embargo, la actividad de ECA disminuye, lo cual puede deberse a que se requiere la excreción de sodio para llevar la concentración sérica de este parámetro a niveles normales.

c) ISO.- En el grupo de ratas al que se le administró esta droga, la APR se encuentra significativamente elevada, sin embargo, la actividad sérica de ECA está disminuida. Al igual que en los dos casos anteriores, aquí la ECA puede estar jugando un papel regulatorio de la actividad del SRAA compensando, hasta cierto punto, los efectos que puede acarrear la marcada elevación de la APR.

Los modelos fisiológicos en los que la ECA se mantiene en niveles normales a pesar de las alteraciones que pueda presentar el SRAA son:

- a) Na 2%.- Este es un modelo de deshidratación ya que al ingerir grandes cantidades de sodio es necesario excretarlo, y para lograrlo se necesita también excretar grandes volúmenes de agua, por lo que el animal necesita beber más, pero al hacerlo está ingiriendo más sodio. En los resultados obtenidos se pueden observar altas concentraciones de sodio tanto en suero como en orina al igual que grandes volúmenes urinarios. La renina se encuentra elevada de la misma manera que en el modelo de deshidratación sin agua de beber por la necesidad de restablecer el volumen sanguíneo reteniendo agua, pero en este caso la ECA se mantiene en niveles normales, lo cual lleva a una retención mayor de sodio que en el modelo de deshidratación sin agua de beber.
- b) Na 1%.- En este grupo se puede decir que el solo hecho que la renina disminuya, es suficiente para excretar el exceso de sodio ingerido, ya que los niveles de natriuresis son marcadamente altos, lo cual lleva a niveles normales de sodio sérico y no es necesario un cambio en la actividad sérica de ECA.
- c) AN.- En este modelo de ratas la APR se encuentra significativamente elevada pero la ECA no presenta ningún cambio significativo, por lo que los niveles de sodio sérico también se elevan significativamente.
- d) URE.- La ligación ureteral induce una elevación de la concentración del sustrato de renina (angiotensinógeno) en suero (84), sin embargo, aunque por esta razón se pueda pensar que la actividad del SRAA se encuentra elevada, el sodio sérico disminuye y la actividad sérica de ECA se mantiene en niveles normales. El hecho de que el sodio disminuya a pesar de que se esperaba que aumentara por la obstrucción de su excreción, puede deberse a que también se evita la salida de agua por lo que el sodio se diluye en la sangre.

Los modelos fisiológicos en los que la actividad sérica de ECA se altera en forma paralela a la actividad del SRAA y, por lo tanto, contradicen la teoría de que la ECA puede jugar un papel regulatorio dentro del sistema son:

a) PRO.- Esta droga es un antagonista beta por lo que la APR en este grupo de ratas se encuentra significativamente disminuida, y, en este caso, la actividad sérica de ECA también disminuyó.

b) CLO.- Esta droga, al igual que la anterior, hace que disminuya la APR, solo que en este caso es por medio de su carácter de agonista alfa₂. Aquí también la actividad sérica de ECA disminuye significativamente.

c) HIP REN.- Al contrario que en los dos casos anteriores, en este modelo la APR se encuentra significativamente aumentada y la actividad sérica de ECA también. Este tipo de hipertensión se puede controlar utilizando inhibidores de la ECA como ya se ha dicho.

d) NEF.- En este modelo todos los parámetros que indican la actividad del sistema se encuentran en niveles significativamente elevados, incluyendo la actividad sérica de ECA. Si se sigue la evolución del síndrome en el tiempo, se puede observar que la retención de sodio característica del síndrome se inicia antes de que se eleven los niveles de renina, pero coincide con la elevación de la actividad sérica de ECA, por lo que se puede decir que, aunque la modificación en la actividad de ECA es en sentido paralelo a la modificación en la actividad del SRAA, la enzima puede estar regulando el efecto final de la actividad del sistema.

e) BIN.- Al extraer los dos riñones a estas ratas, se está quitando la fuente de renina por lo que su actividad plasmática es prácticamente nula. Por esta razón no hay producción del sustrato de ECA (AI) y la actividad de esta disminuye, aunque no desaparece. Probablemente este sea un indicio de un mecanismo regulador de la producción de ECA. La concentración de sodio sérico puede deberse a la misma razón que en el caso de las ratas urémicas.

La concentración fisiológica de AI (μM) es un orden de magnitud menor que el valor de K_m de la ECA para este sustrato (mM), lo cual puede asegurar que la ECA no sea un factor limitante para la producción de AII, pero, como lo ya lo hemos visto, existen ciertos estados fisiológicos y patológicos donde efectivamente la actividad séri-

ca de la enzima varía y este fenómeno no solo se ha observado en los modelos estudiados en el presente trabajo sino en muchas otras enfermedades y estados fisiológicos anteriormente mencionados como la sarcoidosis y la hipoxia. Los factores que regulan la producción de ECA no se conocen del todo. A pesar de su importancia, hasta la fecha se conocen solo 3 estímulos que aumentan la biosíntesis de ECA: tratamiento con glucocorticoides (54), activación de macrófagos (56) e inhibidores de ECA (91), pero el mecanismo por el cual estos estímulos regulan la producción de ECA se desconoce.

La importancia fisiológica de la ECA es bastante clara y, como se puede ver, se han hecho estudios comparativos entre la enzima de diferentes especies y sobre la regulación de la actividad de la enzima bajo muchos estímulos, pero la información es aún muy escasa y falta mucha más investigación al respecto. El presente trabajo es una pequeña contribución al conocimiento del papel fisiológico de la ECA y, al caracterizar también la enzima de diferentes especies de mamíferos que pueden ser utilizados en un momento dado como animales de experimentación, se proporciona un medio para corroborar los resultados obtenidos en diferentes modelos de estudio en una especie dada y se da un panorama más general de lo que es la enzima convertidora de angiotensina I,

VI CONCLUSIONES

VI

CONCLUSIONES

1. El método utilizado en el presente trabajo para la determinación de la actividad de la ECA es un método reproducible, sencillo y sensible que requiere solo de equipo de laboratorio común.
2. La ECA de cada una de las especies de mamíferos estudiada parece tener una estructura tridimensional del sitio activo distinta, ya que los valores de K_m , V_{max} , I_{50} y K_i obtenidos para cada una de ellas son diferentes. De aquí se puede inferir que la estructura primaria de estas enzimas puede ser diferente.
3. La actividad de ECA de las diferentes especies no correlaciona con sus valores correspondientes de K_m , por lo que se puede decir que las diferencias en la actividad observada en las diferentes especies es real. El significado fisiológico de las marcadas diferencias en actividad de la ECA observada por el momento no es claro.
4. No existe ninguna correlación entre los parámetros determinados para la ECA de cada especie estudiada (actividad, K_m , V_{max} y K_i e I_{50} para captopril) y las relaciones filogenéticas entre ellas, así como su tamaño, tipo de alimentación, forma de vida, etc.
5. A pesar de que en la literatura no se considera que la ECA juegue un papel regulatorio dentro del SRAA salvo en algunas excepciones citadas en la presente tesis, información obtenida en algunos de los modelos fisiológicos estudiados en este trabajo indican que la ECA sí puede llegar a jugar un papel regulatorio al cambiar su actividad de manera inversa al flujo de la vía (SRAA). Sin embargo otros modelos no apoyan esta teoría.

VII R E F E R E N C I A S

VII
R E F E R E N C I A S

1. Peach, M.J., Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action *Physiol. Rev.* 57(2): 313-379, 1977.
2. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E. y Levine, M. Experimental renal hypertension: The discovery of the renin-angiotensin system. En *Biochemical regulation of blood pressure*, Ed. por R.L. Soffer. Jhon Wiley & Sons, USA pp. 3-338; 1981
3. Wilson J.X. The renin-angiotensin system in nonmammalian vertebrates. *Endocrine Rev.* 5(1): 45-61; 1984.
4. Onkubo, H., Kageyama, R., Ujihara, M., Hirose, T., Inayama, S. v Nakanishi S. cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2196-2200; 1983.
5. Brenner, B.M. v Rector, F.C. Jr. The kidney. Third edition. WB Sanders Co.; p. 289; 1986.
6. Keeton, T.K. y Campbell, W.O. The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32: 81-227; 1980.
7. Inagami, T. Renin. En *Biochemical regulation of blood pressure*, Ed. por R.L. Soffer Jhon Wiley & Sons. pp. 39-71; 1981.
8. Tewksbury, D.A. Angiotensinogen. En *Biochemical regulation of blood pressure*, Ed. por R.L. Soffer, Jhon Wiley & Sons pp. 95-122; 1981.
9. Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lente, K.E., Levine, M. y Skeggs, L.T., Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ. Res.* 31: 356-366; 1972.
10. Friedland, J., Silverstein, E., y Drooker M. Human lung angiotensin convertin enzyme. Purification and antibody preparation. *J. Clin. Invest.* 67: 1151-1160; 1981.
11. Das, M., Hartley, J.L. y Soffer R.L. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. *J. Biol Chem* 252(4): 1316-1319; 1977.
12. Pantoliano, M.W., Holmquist, B. v Riordan, J.F., Affinity Chromatographic purification of angiotensin converting enzyme. *Biochem* 23(5): 1037-1042; 1984.
13. Misono, K.S., Chang, J.H. e Inagami, T. Amino acid sequence of mouse submaxillary gland renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4858-4861; 1982.
14. Panthier, J.J., Foote, S., Chamreud, B., Strosberg, A.D., Corvol, P. y Rougeon, F. Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298: 90-92, 1982.

15. Murakami, K., Hirose, S., Miyasaki, H., Imai, T., Hori, H., Hayashi, T., Kogenyama, R., Ohkubo, H. y Nakanishi, S. Complementary DNA sequences of renin. State of the art review. *Hypertension* 6 (suppl 1): 1-95-1-100, 1984.
16. Harris, R.B. y Wilson, I.B. Sequencing of an active-site peptide of angiotensin I converting enzyme containing an essential glutamic acid residue. *J. Biol Chem.* 260 (4): 2208-2211; 1985.
17. Iwata, K., Lai, Ch., El-Dorriy, H.A. y Soffer, R.L. The NH₂ and COOH-terminal sequences of the angiotensin-converting enzyme isozymes - from rabbit lung and testis. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* (3): 1097-1103; 1982.
18. Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 283-308; 1982.
19. Ondetti, M.A. y Cushman D.W. Inhibition of the renin-angiotensin - system. A new approach to the therapy of hypertension. *J. Med. Chem.* 24(4): 355-361; 1981.
20. Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. y Ondetti, M.A. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Evolution of a new class of antihypertensive drugs, en *Angiotensin converting enzyme inhibitors*, editado por Z.P. Horovitz, U. & Schwarzenbery, 88: 3-25; 1981.
21. Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. y Ondetti, M.A. Design of new antihypertensive drugs. Potent and specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: Captopril and Hypertension. Ed. por D.B. Carl, E.H. Sonnenblick y H. Laragh. Plenum Medical Book Company. - pp 103-113, 1980.
22. Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. Inhibition of the renin angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension. *J. Med. Chem.* 24 (4): 355-361; 1981.
23. Capponi, A.M., Aguilera, G., Fakunding, J.L. y Catt K.J. Angiotensin II: Receptors and mechanisms of actions, en *Biochemical regulation of blood pressure*. Ed. por R.L. Soffer y John Wiley & Sons. USA pp 205-262, 1981.
24. Pobiner, B.F., Hewlet, E.L. y Garrison, J.C. Role of Ni in Coupling Angiotensin Receptors to inhibition of adenilate cyclase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260 (30): 16200-16209; 1985.
25. Mendelsohn, F.A.O., Dunbar, M., Allen, A., Chou, S.T., Millan, M.A., Aguilera, G. y Catt, K.J. Angiotensin II Receptors in the Kidney. *Fed. Proc.* 45 (5): 1420-1425, 1986.
26. Churchill, P.C., Second messengers in renin secretion. *Am. J. Physiol* 249 (Renal Fluid & Electrolyte Physiol.) 18: F175-F184; 1984.
27. Erdős, E.G. The angiotensin I converting enzyme. *Fed. Proc.* 36 (5): 1760-1765; 1977.

28. International Union of Biochemistry, Enzyme Nomenclature. Academic Press Inc. USA. pp 606; 1978.
29. Miyazaki, M., Okunishi, H., Nishimura, K. y Toda, N. Vascular angiotensin-converting enzyme activity in man and other species. *Clin. Sci.* 66: 39-45; 1984.
30. Hayakari, M., Kondo, Y. e Izumy, H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal. Biochem.* 84: 361-369; 1978.
31. Cushman, D.W. y Cheung, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Bioch. Pharmacol* 20: 1637-1648; 1971.
32. Hurst, P.L. y Lovell-Smith, C.J. Optimized assay for serum angiotensin-converting enzyme activity. *Clin. Chem.* 27(12): 2048-2052; 1981.
33. Soffer, R.L., Angiotensin Converting enzyme, en Biochemical regulation of blood oressure. Ed. por R.L. Soffer y John Wiley & Sons, New York, pp 123-164; 1981.
34. Das, M. y Soffer, R.L. Pulmonary angiotensin converting enzyme. S-structural and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 250 (17): 6762-6768; 1975.
35. Erdős, E.G. y Skidgel, R.A. Structure and functions of human angiotensin I converting enzyme (kininase II). *Biochem. Soc. Trans.* 13: pp 42-44; 1985.
36. Harris, R.B. y Wilson, I.B. Glutamic acid is an active site residue of nagiotensin I. Converting enzyme. *J. Biol. Chem* 258 (2): 1357-1362; 1983.
37. Ondetti, M.A. y Cushman, D.H. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological actions. *CRC Critical Reviews in Biochemistry.* 16(4): 381-411; 1984.
38. Erdős, E.G. Conversion of angiotensin I to nagiotensin II. *Am. J. Med.* 60: 749-759; 1976.
39. Hara, A., Fukuyama, K. y Epstein, W.L. Partial purification and characterization of angiotensin converting enzyme in mouse and human skin. *J. Invest. Dermatol.* 72: 503; 1982.
40. Velletri, P.A. Testicular angiotensin I-converting enzyme (E.C. 3.4.15.1). *Life Sci.* 36 (17): 1597-1608; 1985.
41. Velletri, P.A., Aquilano, D.R., Burckwick, E., Tsai-Morris, C.H., Dufau, M.L. y Lovenberg, W. Endocrinological Control and Cellular Localization of Rat Testicular Angiotensin-Converting Enzyme (E.C. 3.4.15.1) *Endocrinol.* 116(6): 2516-2522; 1985.
42. Lanzillo, J.J., Stevens, J., Dasarathy, Y., Yotsumoto, H. y Fanburg, B.L. Angiotensin Converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic and immunological properties. *J. Biol. Chem.* 260 (28): 14938-14944; 1985.

42. Lanzillo, J.J., Stevens, J., Dasarathy, Y., Yotsumoto, H. y Fanburg, B.L. Angiotensin converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic and immunological properties. *J. Biol. Chem.* 260 (28): 14938-14944; 1985.
43. Yaron, A., Mlynar, D. y Berger, A. Dipeptidocarboxypeptidase from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:897-902; 1972.
44. Thampi, N.S. y Huggins, C.G. Angiotensin I converting enzyme activity of subtilisin BPA (Nagarase), a crystalline enzyme from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Pharmacol.* 17: 2018-2019; 1968.
45. Lee, H.J., Laurue, J.N. y Wilson, I.B. Dipeptidyl carboxy peptidase from *Corynebacterium equi*. *Biochim. Biophys. Acta* 250: 608-613; 1971.
46. Piquilloud, Y., Reinhartz, A. y Roth, M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 206: 136-142; 1970.
47. Neels, H.M., Scharpe, S.L., Van Sande, M.E., Verkerk, R.M. y Van Acker, K.J. Improved micromethod for assay of serum angiotensin converting enzyme. *Clin. Chem.* 28 (6): 1352-1355; 1982.
48. Romer, F.K. Comparison of two methods for mesurment of serum angiotensin-converting enzyme in sarcoidosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 42: 197-199; 1982.
49. Kasahara, Y. y Ashihara, Y. Colorimetrt of angiotensin enzyme activity in serum. *Clin. Chem.* 27 (11): 1922-1925; 1981.
50. Howell, R.E., Moalli, R. y Gillis, C.H. Analysis of rabbit pulmonary abgiotensin converting enzyme kinetics in vivo. *J. Pharm. Exp. Ther* 223 (1): 154-160; 1984.
51. Ryan, J.W., Chung, A., Ammons, C. y Carlton, M.L. A simple radioassay for angiotensin-converting enzyme. *Biochem. J.* 167: 501-504; 1977.
52. Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme. En Biochemical regulation of blood pressure. Editado por R.L. Soffer, John Wiley & Sons. USA, pp 165-204; 1981.
53. Johnson, A.R., Schulz, W.W., Noguiera, L.A. y Erdös, E.G. Angiotensin I-converting enzyme (Kininase II), in endothelial cells cultured form human pulmonary arteries and yeins. *Cin. Experr. Hyper.* 2(3 & 4): 659-674; 1980.
54. Friedland, J., Setton, Ch. y Silverstein, E. Induction of angiotensin converting enzyme in human monocytes in culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83(3): 843-349; 1978.
55. Rohrbach, M.S. Metabolism and subcellular localization of angiotensin converting enzyme in cultured human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 124(3):843-949, 1984.

56. Friedland, J., Setton, Ch., Silverstein, E. Angiotensin converting enzyme. Induction by steroids in rabbit alveolar macrophages in culture. *Science* 197: 64-65; 1977.
57. Lieberman, J. Elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am. J. Med.* 59: 365-372; 1975.
58. Schultz, T., Miller, W.C., Bedrossian, C.W.M. Clinical application of measurement of angiotensin-converting enzyme level. *JAMA* 242(5): 439-441; 1979.
59. Davies, S.F., Rohrbach, M.S., Thelen, V., Kuritzky, J., Gruninger, R., Jipmpson, M.L., De Remee, R.A. Elevated serum angiotensin converting enzyme. (SACE) Activity in acute pulmonary histoplasmosis. *Chest* 85(3):307-310; 1984.
60. Brown, R.C., Munday, D.E., Sawicha, V.M. y Wagner, J.C. Angiotensin converting enzyme in the serum of rats with experimental silicosis. *Path.* 64: 286-292; 1983.
61. Forget, G., Brault, C., Cardiocux, A. y Sirois, P. Lack of correlation between serum angiotensin-converting enzyme levels and asbestosis in man, sheep and Guinea-pig. *Lung* 161: 157-164; 1983.
62. Siefkin, A.D., Parsons, G.H., Pjtwell, S.W. y Hollinger, M.A. The value of serial angiotensin converting enzyme determinations in hospitalized patients with lung disease. *Am. J. Med. Sci.* 288 (5): 200-207; 1984.
63. Arvay, G., Szathmary, G y Reuter, M. Changes in angiotensin-converting enzyme activity and angiotensin I level in asthmatic and healthy children after submaximal physical work. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 69(2): 178-180; Feb. 1982.
64. Milledge, J.S. y Catley, D.M. Renin aldosterone and converting enzyme during exercise and acute hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ Exercise Physiol.* 52 (2): 320-323; 1982.
65. Matzuki, K.Y. y Sakata, T. Angiotensin-converting enzyme in diseases of the liver. *Am. J. Med.* 73: 549-551; 1982.
66. Lieberman, J. y Sastre, A. Serum angiotensin converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. *Ann. Int. Med.* 93 (6): 825-826; 1980.
67. Yotsumoto, H., Kusuya, N., Uchimira, H. y Matsuzaky, F. Increased levels of serum angiotensin-converting enzyme activity in hyperthyroidism. *Ann. Int. Med.* 96: 326-328; 1982.
68. Oats, J.N., Broughton Pipkin, F. y Symonds, E." Angiotensin converting enzyme and the renin-angiotensin system in normotensive primigravid pregnancy. *Clin. and Exper. Hyper.* B1(1): 73-91; 1982.
69. Falezza, G. Santonastaso, C.L., Parisi, T. y Muggeo, M. High serum levels of angiotensin-converting enzyme in untreated Addison disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61(3): 496-498; 1985.

70. Baggio, B., Favaro, S., Cantero, S., Bertazzo, L., Frunzio, A. y Borsatti, A. Increased urine angiotensin I converting enzyme activity in patients with upper urinary tract infection. *Clin. Chim. Acta.* 109: 211-216; 1981.
71. Overlack, A., Higuchi, M., Kolloch, R. y Stumpe, K.O. Converting enzyme activity and essential hypertension. *Klin. Wochenschr.* 61: 377-378; 1983.
72. Posadas, R.C., Sánchez, T.G., Boyer, M.J.L., Delmar, J.M. y Serrano, P.A. El efecto de la inhibición de la enzima convertidora con captopril sobre la presión arterial, renina y aldosterona en el hipertenso esencial. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 52: 295-300; 1982.
73. Le Treut, A., Chevet, D., Guenet, L., Leray, G., Afiouni, N., Le Pogamp, P. y Le Gali, J.Y. Serum angiotensin-converting enzyme levels in patients with chronic renal failure. *Path. Biol.* 31 (3): 182-185; 1983.
74. Silverstein, E., Brunswick, J., Sreepada Roa, T.K. y Friedland, J. - Increased serum angiotensin-converting enzyme in chronic renal disease. *Nephron.* 37: 2006-2010; 1984.
75. Rumpf, K.W., Brat, A., Armstrong, V. y Sheler, F. Increased serum angiotensin-converting enzyme in endstage renal disease. *Nephron.* 40: 248-249; 1985.
76. Nielsen, A.H., Knudsen, F. y Kristensen, S.D. Serum angiotensin-converting enzyme increases during hemodialysis. *Nephron.* 40: 100-103; 1985.
77. Romer, F.K. y Schmitz, O. Angiotensin-converting enzyme activity in renal disorders influence of disease pattern, hemodialysis and transplantation. *Clin. Nephrol.* 21 (3): 178-183; 1984.
78. Zúñiga, E.A. Producción de reactivos para la determinación de angiotensina I humana por radioinmunoanálisis. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M.; 1986.
79. Lowry, O.A., Rosenbrought, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-267; 1951.
80. Cheng, Y. Ch. y Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition - constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108; 1973.
81. Pedraza-Chaverri, J., Ibarra-Rubio, M.E., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sainz, J.A. Pertussis toxin potenciales anesthesia-induced renin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 115-117; 1985.
82. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M.C., Ibarra-Rubio, M.E., Peña, J.C. y García-Sainz, J.A. Effect of pertussis toxin on adrenergic regulation of plasma renin activity. *Life Sci.* 35 (16): 1683-1689; - 1984.

83. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García Sainz, J.A. Pertussis toxin enhances the beta-adrenergic and blocks the alpha₂-adrenergic regulation of renin secretion in renal cortical slices. *Life Sci.* 38 (11): 1005-1011; 1986.
84. Hiwada, K., Tanaka, H. y Kokubu, T. The influence of nephrectomy, ureteral ligation and estradiol on plasma renin substrate in unilaterally nephrectomized rats. *Pflügers Arch.* 365: 177-182; 1976.
85. Ibarra-Rubio, M.E., Pedraza-Chaverri, J., de Alba, J.A., Herrero Bervera, B. y Peña, J.C. Angiotensin converting enzyme activity (ACEA) is increased in experimental nephrotic syndrome (ENS). *Kidney Int.* 29 (1): 302; 1986.
86. Friedland, J. y Silverstein, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme with the natural substrate AI. *Am. J. Clin. Pathol.* 68: 225-228; 1977.
87. Kamoun, P.P., Bardet, J.I., Di Guilio, S. y Grunfeld, J.P. Measurements of angiotensin converting enzyme in captopril-treated patients. *Clin. Chim. Acta.* 118:333-336; 1982.
88. Pietilä, K. y Koivula, T. Increase of serum angiotensin-converting enzyme activity after freezing. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44:453-455; 1984.
89. Segel, I.H. *Biochemical calculations*. 2a edición, John Wiley & Sons. p. 281; 1976.
90. Takada, Y., Unn, M., Hiwada K. Kokubu, T. Biochemical and immunological studies of angiotensin converting enzymes from human, bovine, dog, hog, rabbit, rat and sheep kidneys. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B (2): 189-194; 1984.
91. Unger, T., Schüll, B., Hübner, D., Yukimura, T., Lang, R.E., Rasher, W. y Ganten, D. Plasma-converting enzyme activity does not reflect effectiveness of oral treatment with captopril. *Eur. J. Pharmacol.* 72: 255-259; 1981.