



17
28.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**CARACTERIZACION DEL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA
EN EL SINDROME NEFROTICO
EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA TERESA CHAVEZ PONCE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la caracterización secuencial del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome nefrótico experimental inducido en ratas, por una inyección única de aminonucleósido de la puromicina, para evaluar su posible relación con las alteraciones bioquímico-clínicas que se presentan en el síndrome nefrótico, fundamentalmente con el aumento de la retención de sodio.

Se utilizaron ratas cepa Wistar, machos de 90-115 g de peso. Para las determinaciones en orina y en suero o plasma, se estudiaron dos grupos: a) grupo control al cuál se le inyectó subcutáneamente solución salina al 0.9% y b) grupo ANP al cuál se le inyectó también en forma subcutánea el aminonucleósido de la puromicina en una concentración al 2% en solución salina al 0.9% a una dosis de 15 mg/100 g de peso. Para las determinaciones en orina ambos grupos se mantuvieron en jaulas metabólicas desde el día -2 hasta el día 21 en que concluyó el estudio con el fin de recolectar diariamente su orina.

Para las determinaciones en suero o plasma se usaron 95 ratas (15 para el grupo control) y el resto para el grupo ANP (5 ratas diarias desde el día 1 hasta el día 10 y luego los días 12, 14, 16, 18, 20 y 21).

Las determinaciones realizadas fueron:

a) orina: volumen, sodio (por flamometría), proteínas (Lowry) y aldosterona (por radioinmunoanálisis),

b) suero: sodio (flamometría), proteínas (Lowry) y actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I (espectrofotometría ultravioleta).

c) plasma: angiotensinógeno, concentración plasmática de renina y aldosterona (por radioinmunoanálisis).

Las ratas tuvieron una proteinuria masiva desde el día 3 alcanzando valores de hasta 1 g/24 h, lo cual confirmó la existencia del síndrome nefrótico. Las proteínas séricas disminuyeron desde el día 5. El volumen urinario aumentó del día 7 al 10, coincidiendo con la desaparición de la ascitis. La excreción de sodio disminuyó significativamente del día 2 al 7. El sodio sérico se elevó el día 7 y regresó a valores basales el día 21. El angiotensinógeno disminuyó los días 5 al 10. La concentración plasmática de renina aumentó los días 5, 6 y 7 asociándose con la hipoproteinemia. La enzima convertidora de angiotensina I aumenta los días 1 y 2 y luego del 4 al 9 con un máximo de actividad el día 6. La aldosterona urinaria aumentó del día 2 al 4 y de nuevo se elevó del día 6 al 8. La aldosterona plasmática aumentó del día 1 al 3 y nuevamente los días 5 y 6.

El aumento de la secreción de aldosterona y de la actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I antes de la activación de renina puede explicar el aumento de la retención de

sodio antes de la activación de la secreción de renina.

Se puede concluir que:

a) en el síndrome nefrótico experimental inducido por el aminonucleósido de la puromicina hay profundas alteraciones de los componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona y que

b) el aumento de la retención de sodio no puede ser explicado por el aumento en la secreción de renina debido a que éste es un fenómeno posterior. Es probable que el aminonucleósido de la puromicina o sus metabolitos actúen directamente a nivel de las células que sintetizan y almacenan aldosterona y enzima convertidora de angiotensina I y que por eso aumenten tempranamente. Otros factores, probablemente intrarrenales, pueden estar involucrados en el aumento en la retención de sodio en el síndrome nefrótico experimental.

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.....	i
I.-INTRODUCCION.....	1
1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Bioquímica.....	3
1.3 Componentes.....	4
1.3.1 Angiotensinógeno.....	4
1.3.2 Renina.....	6
1.3.3 Angiotensina I.....	14
1.3.4 Enzima convertidora de Angiotensina I (ECA).....	15
1.3.5 Angiotensina II.....	18
1.3.6 Angiotensina III.....	19
1.3.7 Aldosterona.....	20
2. SINDROME NEFROTICO.....	21
2.1 Generalidades.....	21
2.2 Modelos experimentales.....	22
2.3 Mecanismos de proteinuria.....	23
2.4 Alteraciones inmunológicas.....	25
2.5 Anormalidades en la coagulación.....	26
2.6 Factores genéticos.....	26
2.7 Alteraciones en la membrana basal glomerular.....	26

PAGINA

2.8 Alteraciones en las lipoproteínas del plasma.....	29
2.9 La concentración de albúmina plasmática en el síndrome nefrótico.....	29
2.10 El sodio y el sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome nefrótico.....	30
II.- OBJETIVOS.....	33
III.- MATERIALES Y METODOS.....	34
1. MATERIALES.....	34
1.1 Material biológico.....	34
1.2 Reactivos.....	34
1.3 Equipo.....	35
1.4 Soluciones.....	36
1.5 Material de vidriería.....	37
2. METODOS.....	37
2.1 Orina.....	37
2.2 Suero o plasma.....	38
2.3 Determinaciones realizadas.....	38
2.3.1 Orina de 24 horas.....	38
2.3.2 Suero.....	39
2.3.3 Plasma.....	39
2.4 Sodio.....	40

2.4.1 Sodio sérico.....	40
2.4.2 Sodio urinario.....	42
2.5 Proteínas totales.....	42
2.5.1 Proteínas séricas totales.....	42
2.5.2 Proteínas urinarias totales.....	43
2.6 Concentración plasmática de renina (CPR) y de angiotensinógeno (CPA).....	45
2.6.1 Principio del método.....	45
2.6.2 Generación de angiotensina I.....	49
2.6.3 Protocolo de radioinmunoanálisis de A I.....	51
2.6.4 Cálculo de resultados.....	53
2.7 Aldosterona.....	55
2.7.1 Aldosterona plasmática.....	55
2.7.1 a) Fundamento.....	55
2.7.1 b) Protocolo de radioinmunoanálisis.....	57
2.7.1 c) Cálculo de resultados.....	58
2.7.2 Aldosterona urinaria.....	59
2.7.2 a) Fundamento.....	59
2.7.2 b) Protocolo de radioinmunoanálisis.....	59
2.7.2 c) Cálculo de resultados.....	61
2.8 Actividad sérica de la enzima convertidora de angio- tensina I.....	62
2.8.1 Fundamento.....	62

PAGINA

2.8.2 Ensayo.....	62
2.8.3 Cálculo de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I	65
2.9 Análisis de los datos.....	65
2.9.1 Técnica del análisis.....	65
2.9.2 Análisis estadístico.....	66
2.9.2.1 Estadística descriptiva.....	66
2.9.2.2 Inferencia paramétrica.....	66
2.9.2.3 Inferencia no paramétrica.....	67
2.9.2.4 Análisis a lo largo del tiempo.....	67
2.9.2.5 Nivel de significancia.....	68
IV.- RESULTADOS.....	69
V.- DISCUSION.....	98
VI.- CONCLUSIONES.....	104
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	106

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

A I	Angiotensina I
A II	Angiotensina II
A III	Angiotensina III
ADN	Acido desoxiribonucleico
AH	Acido hipurico
ANDEVA	Análisis de varianza
ANP	Aminonucleosido de la puromicina
APR	Actividad plasmática de renina
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ASB	Albumina sérica bovina
%B/Bo	Fracción porcentual de radiactividad unida al anticuerpo en relación a la unión máxima en ausencia de antígeno no radiactivo
°C	Grados centígrados
Ci	Curies
CPA	Concentración plasmática de angiotensinógeno
cpm	Cuentas por minuto
CFR	Concentración plasmática de renina
C-terminal	Carboxilo terminal

d	Daltones
DD	Densidad Óptica
EC	Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EE	Error estándar
EDTA	Acido etilendiamino-tetra-acético
FIG.	Figura
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
^{125}I	Isótopo radiactivo 125 de Yodo
l	Litro(s)
M	Molar
MBG	Membrana basal glomerular
meq	Miliequivalente
min	Minuto(s)
mg	Miligramo(s)
ml	Mililitro(s)
μl	Microlitro(s)
N	Normal (Normalidad)
ng	Nanogramos(s)
nm	Nanómetro(s)
N-terminal	Amino-terminal
p.	Página

PCO	Presión coloidosmótica
pg	Picogram(s)
PM	Peso molecular
pp.	Páginas
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Síndrome nefrótico
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Aminoácidos:

aa	Aminoácido
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Acido Aspártico
Asn	Asparagina
Cis	Cisteína
Fen	Fenilalanina
Gli	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina

Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tir	Tirosina
Tre	Treonina
Val	Valina

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.

1.1 Generalidades

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un sistema hormonal cuya participación en el balance de líquidos y electrolitos y de la presión arterial es primordial. Desde el descubrimiento de la enzima renina por Tigerstedt y Bergmann en 1898 (1), ha continuado la investigación y en las últimas décadas se ha avanzado mucho en el conocimiento de la bioquímica y fisiología del SRAA. 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, secreción y mecanismo de acción de cada uno de los componentes.

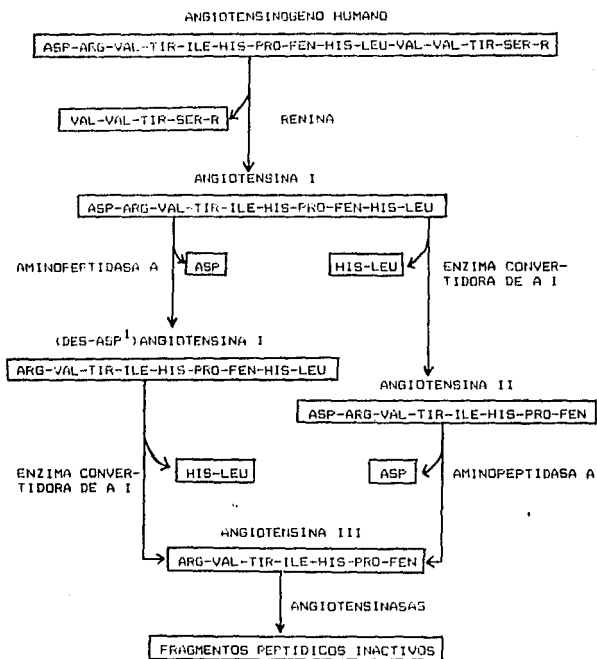
Las moléculas que componen este sistema son (Fig. 1):

Enzimas: a) renina (EC 3.4.99.19), b) convertidora de angiotensina I (EC 3.4.15.1) y c) angiotensinasas.

Peptidos: a) el decapeptido angiotensina I (A I), el octapéptido angiotensina II (A II) y c) el heptapéptido angiotensina III (A III).

Glucoproteína: angiotensinógeno (sustrato de renina).

Hormona esteroide: aldosterona.



R- Resto de la molecula

Fig. 1.- COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

1.2 Bioquímica

El hígado produce el sustrato de renina llamado angiotensinógeno y lo libera al plasma.

La renina actúa hidrolíticamente sobre el angiotensinógeno para liberar a partir de su extremo amino el péptido A I (Fig.1). La renina es una enzima producida principalmente por las células yuxtaglomerulares del riñón y se libera a la circulación general a través de las venas renales.

El decapeptido A I no tiene actividad vasopresora directa.

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA), que se encuentra principalmente en el pulmón, hidroliza a su sustrato A I en el plasma, liberando los dos aminoácidos (aa) del extremo carboxilo. Como resultado de la acción de la ECA se forma el octapéptido A II. Las acciones fisiológicas de la A II son: a) su potente efecto vasoconstrictor (50 veces mayor al de la norepinefrina), b) estimulación de la liberación de aldosterona, la que a su vez promueve la reabsorción de sodio y agua, c) actúa directamente en el cerebro para incrementar la presión sanguínea mediante el sistema nervioso simpático y parasimpático para estimular la sed y la secreción de vasopresina y de la hormona adrenocorticotrópica, d) inhibe la secreción de renina, e) estimula la secreción de angiotensinógeno, f) aumenta la secreción de catecolaminas de las glándulas suprarrenales y facilita la transmisión adrenérgica.

La acción enzimática de la aminopeptidasa A para liberar el Acido Aspártico (Asp) amino-terminal (N-terminal) de la molécula de A II, produce el heptapéptido A III. Como se muestra en la Fig. 1, este heptapéptido también puede formarse por acción de la ECA sobre el nonapéptido des-Asp¹ A I. La A III es menos potente que la A II para estimular la biosíntesis de aldosterona y posee sólo una quinta parte de su potencia vasopresora (2). Como angiotensinasas se conocen colectivamente a un grupo de enzimas hidrolíticas (aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas) que degradan a las angiotensinas a sus correspondientes aminoácidos.

Las moléculas componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona constituyen un sistema que se activa en forma de cascada y que juega un papel muy importante en la homeostasis de la presión sanguínea y en la regulación del volumen sanguíneo circulante (Fig. 2).

1.3 Componentes

1.3.1 Angiotensinógeno

El angiotensinógeno humano es una glucoproteína de peso molecular (PM) de 61,400 daltones (d) y el de la molécula libre de carbohidratos (452 aa) es de 49,770 d (3). El angiotensinógeno de rata tiene un PM de 65,000 d y el de la molécula libre de carbohidratos (477 aa) es de 49,548 d (4).

El angiotensinógeno es la molécula que sirve de sustrato a

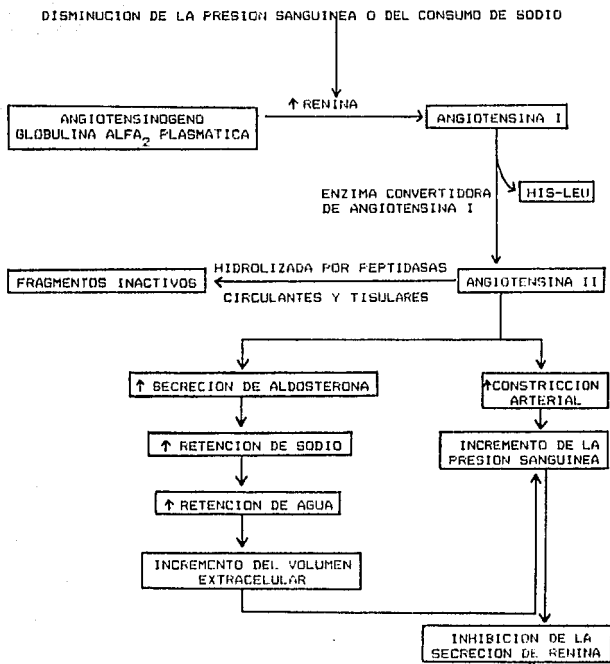


FIG. 2.- REGULACION DEL VOLUMEN SANGUINEO Y DE LA PRESION ARTERIAL POR MEDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.

la enzima renina para obtener A I. Su concentración en plasma es de 4-7 mg/ml (5). Su principal sitio de síntesis es el hígado (6, 7), el cuál no contiene depósitos significativos, aunque también hay evidencias que sugieren que puede ser sintetizado en el riñón y en el cerebro (8, 9). En modelos in vitro se han estudiado los factores que regulan la secreción de angiotensinógeno y se ha demostrado que los estrógenos, los glucocorticoides, la insulina, las prostaglandinas, la A II y la binefrectomía estimulan la secreción de angiotensinógeno (10, 11). Por el contrario, se ha visto que la tiroidectomía y la adrenalectomía disminuyen el nivel plasmático de angiotensinógeno.

Algunos autores han reportado que la concentración plasmática normal de angiotensinógeno es 10,000 veces la concentración molar normal de A I y de A II circulantes (12) y por ésto los cambios a corto plazo de la concentración de renina tienen poco efecto en los niveles de sustrato plasmático que permanecen bastante constantes.

1.3.2. Renina

La renina es la enzima limitante de la velocidad del SRAA y está presente en grandes cantidades en el riñón. Fué descubierta por Tigerstedt y Bergman en 1898 (1).

La renina es sintetizada, almacenada y secretada por las células granulares del aparato yuxtaglomerular que son células de músculo liso diferenciadas, localizadas en las paredes de cada

arteriola renal aferente adyacente al glomérulo (Fig. 3). Se almacena en forma de gránulos en las células yuxtaglomerulares, las cuales contienen retículo endoplásmico y aparato de Golgi, característico de las células con función endócrina.

Un Área del túbulo distal, la mácula densa, permanece en estrecho contacto con las células yuxtaglomerulares en el hilio del glomérulo. Estas células están ricamente inervadas por fibras simpáticas. Son particularmente sensibles a cambios en la presión sanguínea.

La renina también se ha localizado en varios tejidos tales como músculo liso uterino, placenta, cerebro, hipotálamo, glándula pineal, pared de arterias y venas, glándula submaxilar y ciertos tumores también la producen.

En la actualidad se postulan al menos 5 mecanismos fisiológicos que regulan la liberación de renina en riñón y son (13, 14):

- a) un barorreceptor intrarrenal que responde a cambios en la tensión arterial de la arteriola aferente,
- b) la cantidad del ión sodio (o quizá cloruro) que pasa por el segmento de mácula densa del túbulo distal renal,
- c) el sistema nervioso simpático y las catecolaminas circulantes,
- d) factores hormonales tales como prostaglandinas, esteroides, A II, etc.,

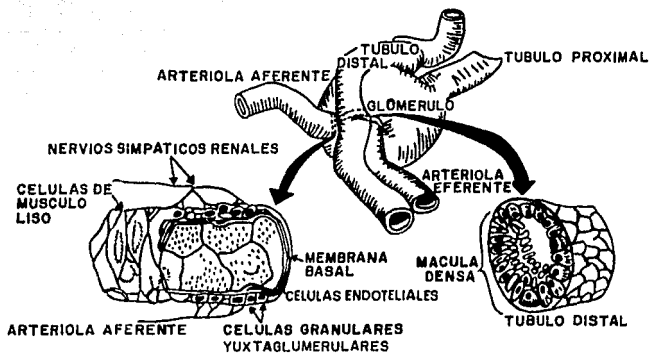


Fig. 3A.- Relaciones anatómicas de las células granulares del aparato yuxtaglomerular, las cuales sintetizan y liberan renina; y la arteriola aferente, los nervios simpáticos renales y las células de la macula densa del túbulo distal.

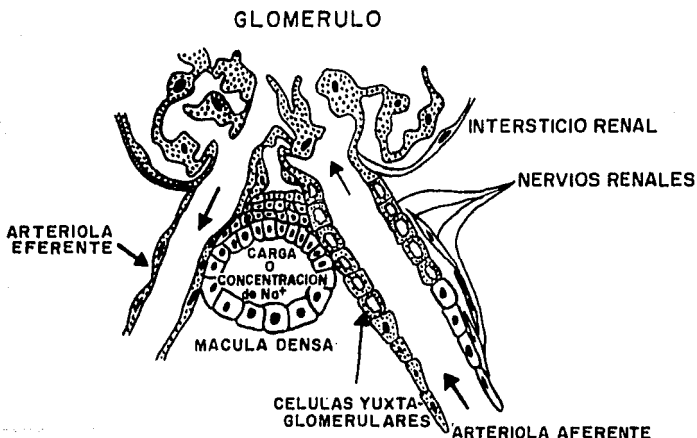


Fig. 3B.- Diagrama del aparato yuxtaglomerular. Se muestran en más detalle las relaciones anatómicas de la fig. 3A.

e) otros electrolitos plasmáticos (como calcio, potasio, etc).

El papel fundamental de las células yuxtaglomerulares es responder a una caída de presión arterial secretando renina, que al producir A II actúa elevando la presión arterial hasta valores normales. El efecto no es permanente porque la cantidad extra de sodio en la sangre y el aumento de presión dentro de la arteriola, actúan haciendo que las células yuxtaglomerulares disminuyan su actividad secretora. Estos mecanismos de retroalimentación negativa evitan que la presión arterial se conserve en valores excesivamente altos.

La enzima renina es una glucoproteína con dos moléculas de Ácido Aspártico en el sitio activo (Fig. 4) y que escinde el enlace Leu-Leu (posiciones 10 y 11 en el caballo, cerdo y rata) o Leu-Val (posiciones 10 y 11 en el hombre) del sustrato angiotensinógeno para producir el decapeptido A I. Se sintetiza como una preproenzima cuya secuencia de aminoácidos ha sido determinada (15). Está formada por 406 residuos de aa. El PM de la prepro-renina humana es de 45,067 d y el de la renina humana de 37,235 d.

La Fig. 5 muestra esquemáticamente las estructuras de la renina de la glándula submaxilar de ratón y de la renina de riñón humano.

La prepro-renina es hidrolizada por una peptidasa en el retículo endoplásmico rugoso para producir pro-renina. En el

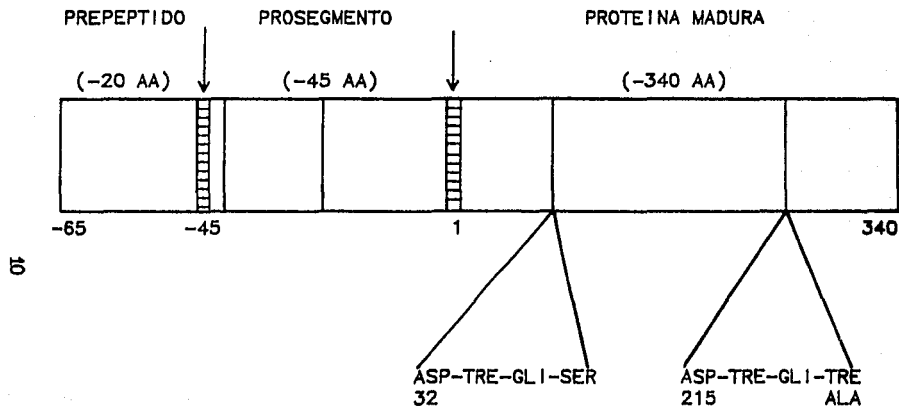


FIG. 4.- ESTRUCTURA GENERAL DE LAS PROTEASAS ACIDAS. ESTAS SON SINTETIZADAS COMO PREPROENZIMAS Y CONTIENEN EN SU SITIO ACTIVO AMINOACIDOS TALES COMO EL ACIDO ASPARTICO. LA RENINA PERTENECE A ESTE GRUPO DE ENZIMAS. LAS SECUENCIAS ASP-TRE-GLI-SER Y ASP-TRE-GLI-TRE INDICAN EL SITIO ACTIVO DE ESTAS ENZIMAS.

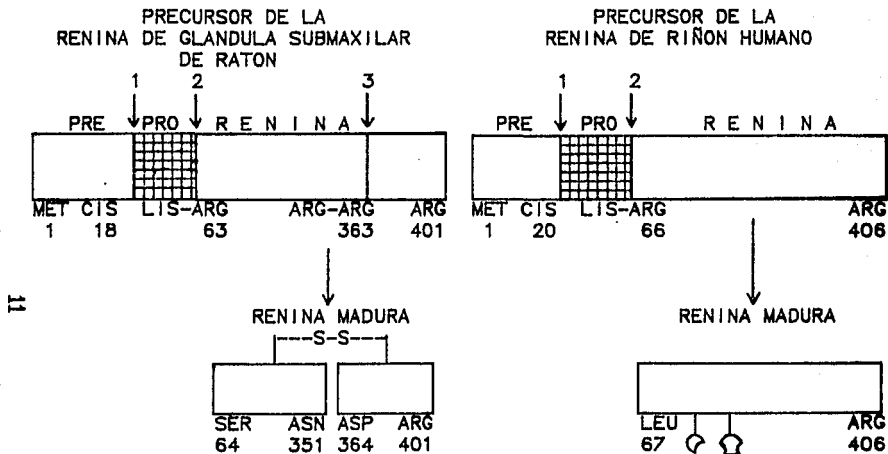


FIG. 5.- MADURACION DE LA RENINA DE RIÑON HUMANO Y DE GLANDULA SUBMAXILAR DE RATON. LAS FLECHAS MUESTRAN LOS SITIOS DE CORTE ENZIMATICO. LA RENINA DE RIÑON HUMANO -EN CONTRAPOSICION A LA RENINA DE LA GLANDULA SUBMAXILAR DE RATON- ES UNA SOLA CADENA POLIPEPTIDICA Y ESTA GLUCOSILADA.

aparato de Golgi ésta es convertida en 15 minutos (min) a la renina que es enzimáticamente activa (Fig. 6).

Se ha observado que parte de la renina circulante se encuentra en estado inactivo y tiene un PM superior a la renina madura o activa (16). La renina inactiva se transforma en una enzima activa por varios procedimientos, incluyendo acidificación, la acción de la tripsina o exposición prolongada a temperaturas comprendidas entre 0 y 5°C (17,18).

También se ha encontrado una forma inactiva de renina que constituye del 10 al 50% de la concentración total de renina plasmática en individuos normales. Se cree, pero no se ha podido demostrar, que la renina inactiva del riñón es el precursor biosintético de la pro-renina.

Los primeros métodos de medición de renina dependían de ensayos biológicos para determinar A I. La confiabilidad en estos ensayos se consideró crítica para confirmar que la sustancia medida era realmente A I (19-23).

A fines de la década de los 60's se introdujo el radioinmunoanálisis (RIA) de A I facilitando ampliamente la tarea de medir la actividad de renina (24, 25).

Los inhibidores de la renina incluyen anticuerpos monoclonales específicos (26), análogos sintéticos del angiotensinógeno (27) y fragmentos de la secuencia de la pro renina, y han servido para demostrar claramente el papel de la renina en la homeostasis de la presión sanguínea.

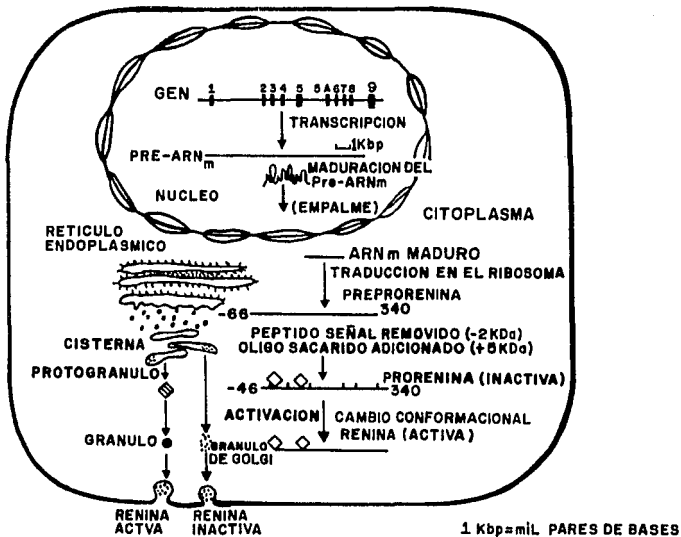
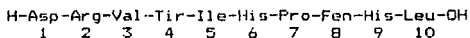


Fig. 6.- Vía biosintética de la renina activa en las células granulares del aparato yuxtaglomerular. Los números en el gen representan los intrones que se van a expresar en el ARNm maduro. Los residuos de azúcar en la proteína están simbolizados por \diamond .

1.3.3 Angiotensina I

La AI es el producto de la reacción de la renina sobre el angiotensinógeno. La AI es un decapeptido de poca o nula actividad biológica.

Su secuencia de aminoácidos en mamíferos tales como caballo, cerdo, rata, perro, conejo y humano es la siguiente:



Comparando la secuencia de aminoácidos anterior con la encontrada en varias especies de vertebrados, se puede observar que los aminoácidos que cambian son el 1, el 5 y el 9. Ejemplos:

Rana toro (anfibio)	H-Asp-Arg-Val-Tir-Val-His-Pro-Fen-Asn-Leu-OH
Serpiente	H-Asp-Arg-Val-Tir-Val-His-Pro-Fen-Tir-Leu-OH
Pollo	H-Asp-Arg-Val-Tir-Val-His-Pro-Fen-Ser-Leu-OH
Salmón	H-Asn-Arg-Val-Tir-Val-His-Pro-Fen-Asn-Leu-OH
Posición	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

La primera preparación pura de angiotensina se obtuvo por incubación in vitro de renina cruda preparada a partir de riñón

de cerdo, con sustrato de renina preparado de plasma de caballo (28). Al poco tiempo se elucidó su secuencia de aminoácidos (29).

1.3.4 Enzima convertidora de angiotensina I (ECA)

Su clasificación según la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica 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 péptidohidrolasa porque actúa sobre un enlace peptídico ("4"); libera un péptido de un polipeptido, por lo que se clasifica como una peptidil-dipéptidohidrolasa ("15"), y por cortar el carboxilo terminal (C-terminal) de sus sustratos se considera una dipeptidil-carboxi-peptidasa (30).

La ECA libera los aminoácidos C-terminales de una enorme variedad de sustratos sintéticos y de los sustratos fisiológicos A I y bradisinina (Fig. 7).

La ECA fué descubierta en plasma de caballo por Skeggs et. al. en 1950 (1) cuando se dieron cuenta de que la A I al perder el dipéptido His-Leu del C-terminal se convertía en A II biológicamente activa. Además de convertir la A I en A II, también inactiva a la bradisinina. La hidrólisis de ésta procede por liberación de los dipéptidos Fen-Arg y Ser-Pro del C-terminal del péptido. De esta forma la misma enzima que produce la sustancia vasoconstrictora (A II), también inactiva otro péptido

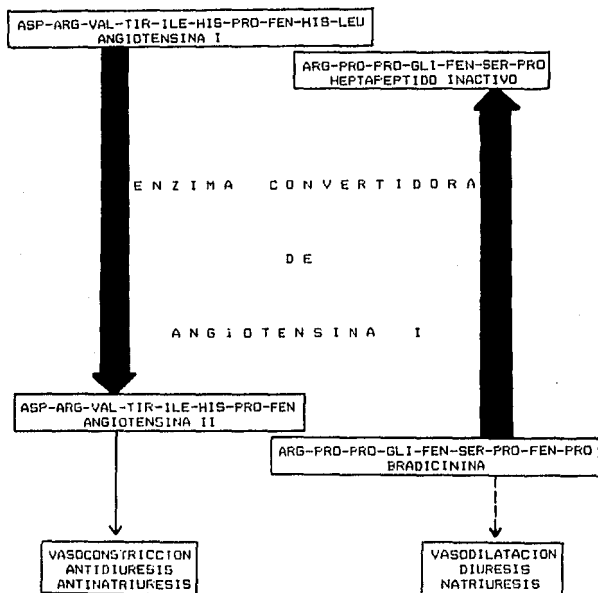


FIG. 7.- REACCIONES FISIOLOGICAS CATALIZADAS POR LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.

con potentes efectos vasodepresores (bradiginina).

La enzima es una metaloproteína (es inhibida por EDTA) y es dependiente de cloruros. Otros aniones monovalentes como los bromuros, los fluoruros o los nitratos pueden sustituir al cloruro en la medición de la actividad enzimática in vitro.

La enzima en mamíferos es una glucoproteína de un PM de 130,000-140,000 d, que está compuesta de una sola cadena polipeptídica y que tiene asociado un equivalente molar de Zinc. La enzima existe en una amplia variedad de organismos desde bacterias hasta mamíferos (31). Está presente en todos los órganos y líquidos corporales de los mamíferos, principalmente en el endotelio vascular del pulmón. En contraste, la bradiginina que tiene una vida media más corta en sangre que la A I o A II, es casi completamente inactivada en la circulación pulmonar.

Se han desarrollado inhibidores específicos y potentes de la ECA en base a sus propiedades y mecanismos de acción. Estos agentes suprimen la respuesta vasopresora de A II, potencian los efectos vasodepresores de bradiginina y revierten la hipertensión experimental dependiente de renina. Uno de los inhibidores más usados en humanos es el captopril (SQ 14,225).

Se han obtenido anticuerpos específicos contra la ECA humana y se han usado para realizar la caracterización inmunológica y el radioinmunoanálisis de la enzima. Los niveles de ECA en el plasma normal están dentro del orden de 10^{-9} mol/l. La ECA inmunoreactiva aumenta en pacientes con sarcoidosis; la enzima en esta

enfermedad es idéntica a la enzima del plasma normal (32). Se sabe poco acerca de la regulación de los niveles de ECA en el plasma.

1.3.5 Angiotensina II

En la década de los 40's Page y Helmer en Estados Unidos (33) demostraron que la renina por sí misma no producía vasoconstricción sino que producía en plasma una nueva sustancia estable al calor, de acción corta y que sí era vasoconstrictora. Denominaron a la nueva sustancia "angiotonina". Por la misma época Braun-Menéndez, et. al. en Argentina (34) descubrieron la misma sustancia y la denominaron "hipertensina". En el año 1961 se llegó al acuerdo de adoptar el término híbrido "angiotensina".

La A II es el componente activo del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Ejerce acción directa sobre las arteriolas estimulando sus paredes musculares para que se contraigan, lo cual disminuye el calibre de las luces arteriolas y esto eleva la presión arterial en el sistema circulatorio en conjunto y además estimula la corteza suprarrenal para producir aldosterona, la cual actúa en las porciones tubulares de las nefronas, haciendo que conserven más sodio y agua y esto aumenta el contenido de líquidos del sistema. Aumenta la reabsorción de agua, el volumen sanguíneo y disminuye el volumen urinario.

La vida media de la A II circulante es corta, aproximadamente de 30 segundos debido a una rápida degradación por angiotensinasas que circulan en la sangre y su producción continua depende de la presencia de angiotensinógeno. Sin embargo, la concentración de éste en sangre es generalmente constante y de hecho es la cantidad de renina circulante la limitante principal en la producción de A II 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 su secreción.

Celio e Inagami (35) demostraron usando técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de A II inmuno-reactiva en las células yuxtglomerulares del riñón de rata y su coexistencia con renina. Ellos proponen que A II no sólo se sintetiza en el torrente circulatorio sino que se forma intracelularmente y se almacena en gránulos, al igual que la renina, en las células yuxtglomerulares.

1.3.6 Angiotensina III

La A II es transformada al heptapéptido A III por la liberación enzimática de una molécula N-terminal de Acido Aspártico, catalizada por la aminopeptidasa A (Fig. 1).

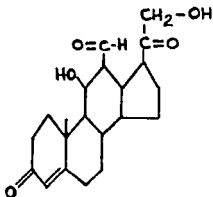
La A III posee la quinta parte de la potencia vasopresora de A II. Estimula la secreción de aldosterona pero también en menor

grado que la A II (2).

1.2.7 Aldosterona

La aldosterona es una hormona esteroide de PM de 360.4 d que es secretada por la zona glomerulosa de la corteza adrenal. Es el regulador más potente de la excreción de electrolitos. Su acción se manifiesta por aumento en la reabsorción de sodio y cloro y facilita la excreción de potasio. Un aumento en la osmolaridad extracelular estimula la secreción de ADH (hormona antidiurética) y ésta facilita la conservación renal de agua. El sodio, cloro y agua son generalmente retenidos o excretados juntos, y la aldosterona promueve, indirectamente, la reabsorción tubular renal de agua.

La estructura de la aldosterona es la siguiente:



El mecanismo que regula la secreción de aldosterona es responsable de los cambios en la hidratación del cuerpo. El sistema renina-angiotensina-aldosterona es el principal mediador de la respuesta adrenocortical a cambios en la hidratación del organismo (36). La A II estimula la secreción de

aldosterona además de su acción vasopresora.

La secreción de aldosterona también es influenciada por: a) la concentración de potasio en los fluidos corporales: la depleción de potasio la disminuye; mientras que la retención de potasio aumenta su secreción, b) la hormona adenocorticotrópica estimula su secreción, c) la concentración de sodio en fluidos corporales: la depleción de sodio aumenta unas 5 veces la secreción de aldosterona mientras que la retención de sodio disminuye la secreción de la hormona (37).

2.- SINDROME NEFROTICO.

2.1 Generalidades

El síndrome nefrótico (SN) se caracteriza por proteinuria (principalmente albuminuria), hipoalbuminemia, disminución de la presión coloidosmótica, ascitis, edema generalizado, hiperlipemia, hipertrofia hepática con aumento de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxiribonucleico (ADN), incremento en la síntesis de proteínas plasmáticas, aumento en la retención de sodio. El aumento en la síntesis de albúmina se ha demostrado in vivo e in vitro en hígado aislado de rata, así como en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo programado con ARNm de hígado de rata nefrótica (38). La síntesis de proteínas hepáticas totales no cambia o aumenta ligeramente. En el síndrome

nefrótico también hay alteraciones del metabolismo del calcio y vitamina D.

La explicación fisiopatológica clásica de la retención de sodio es que la caída en la concentración de albúmina plasmática, y por lo tanto en la presión oncótica, conduce a una transudación del fluido a través de los capilares y a una reducción del volumen sanguíneo, lo cuál estimula entonces al sistema renina-angiotensina-aldosterona para retener sodio y agua. Sin embargo, evidencias recientes demuestran que muchos pacientes con síndrome nefrótico tienen actividad plasmática de renina (APR) baja o normal aún cuando estén reteniendo activamente sodio. Lo anterior sugiere que existen mecanismos intrarrenales que provocan la retención de sodio.

Por otra parte, el captopril no tuvo efecto sobre la retención de sodio en pacientes nefróticos que estaban reteniendo activamente sodio (39), lo cuál sugiere que esta retención es independiente de la actividad del sistema renina-angiotensina.

2.2 Modelos experimentales

Hay diversos modelos experimentales para estudiar el síndrome nefrótico. Entre ellos se encuentran los siguientes:

- a) inyección de suero anti-rinón de rata (40-42),
- b) inyección de aminonucleósido de la puromicina (ANP): 6 di metilamino-9- (3' amino - 3 - desoxi -D-beta-ribofuranosil) purina

(inyección única o dosis repetidas) (38, 43, 44),

c) inyección de adriamicina (doxorubicina) (45),

d) inyección de daunomicina (o daunorubicina) (46).

Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Fig.

B.

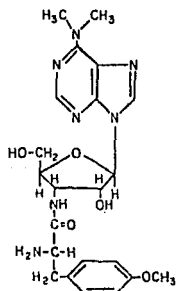
El síndrome nefrótico experimental inducido por el aminonucleósido de la puromicina se parece mucho al síndrome con lesiones mínimas encontrado en humanos (43, 47).

Grond, J., et. al. (48) reportaron que inyecciones repetidas del aminonucleósido (nefrosis crónica) producían un daño renal irreversible. Observaron que había presencia de esclerosis en las células mesangiales (acumulación de lípidos). En el modelo de nefrosis aguda por el derivado de la puromicina también había acumulación de lípidos en el área mesangial. En el caso del síndrome producido por una sola inyección de 3 mg/kg de peso de adriamicina (proteinuria por meses), no se observó esclerosis glomerular. Las lesiones túbulo intersticiales parecen ser el determinante más importante para la progresión del daño renal en este modelo (49, 50).

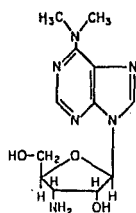
2.3 Mecanismos de proteinuria

Se piensa que la proteinuria es el resultado de la destrucción de la barrera de filtración de las proteínas séricas de las paredes de los capilares glomerulares. Dicha barrera está compuesta de 2 sistemas: a) la barrera del tamaño

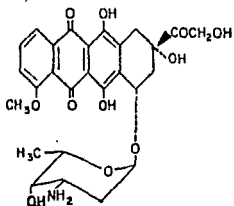
848. PUROMICINA (P.M.=471.51)



AMINONUCLEOSIDO DE LA PUROMICINA
(P.M.= 294)



3435. DOXORUBICINA (P.M.=543.54)
(ADRIAMICINA)



2815. DAUNORUBICINA (P.M.=527.11)
(DAUNOMICINA)

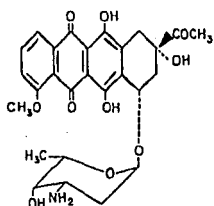


Fig. B.- Estructura de los compuestos usados para producir SN experimental. La puromicina se muestra como comparación con el ANP. Todos son antibióticos. Los números corresponden al Index Merck, décima edición. La puromicina es producida por Streptomyces alboniger, la doxorubicina por la variante caesius de Streptomyces peucetius y la daunorubicina es un antibiótico del grupo rodomicina producido por Streptomyces peucetius.

cuya función está determinada por la efectividad del tamaño del poro de los capilares glomerulares y el radio molecular de la albúmina sérica y b) la barrera de carga en la cuál la repulsión eléctrica entre los sitios aniónicos de los capilares glomerulares y las cargas negativas de la albúmina es crucial.

En ratas con síndrome nefrótico se ha reportado una disminución de las cargas eléctricas. Los sitios aniónicos de la barrera de carga están compuestos primariamente de ácido siálico y glucosaminoglicanos. El primero, tiene una carga negativa fuerte debida a la polaridad del grupo carboxilo, y es uno de los componentes de la cubierta de las células epiteliales, que es necesaria para la fijación de dichas células a la membrana basal glomerular (MBG) (51).

De las dos barreras antes descritas, la pérdida de cargas negativas parece ser la causa más importante del dano, ya que permite la filtración de proteínas cargadas negativamente (52).

2.4 Alteraciones inmunológicas

Shalhoub propuso que el mecanismo patogénico de la nefrosis lipídica puede ser el resultado de un dano primario en la función de las células T. Hay una disminución de IgG e IgA y un aumento de IgM. La disminución en la síntesis de IgG, función de las células B controlada por células T, se revierte en la remisión del síndrome nefrótico. En niños con este síndrome se

encontraron cuentas aumentadas de plaquetas y además se ha observado que dichos pacientes están predispuestos a contraer infecciones por organismos encapsulados. Lo anterior demuestra una hipofunción esplénica (52).

2.5 Anormalidades en la coagulación

En pacientes con síndrome nefrótico se ha visto un aumento de casos con trombosis venosa (52).

2.6 Factores genéticos

Se ha asociado la incidencia de síndrome nefrótico al sistema HLA (antígenos de histocompatibilidad B12, B8 y DR7). Se encontró que el antígeno B12 lo tenían 54% de los pacientes con dicho síndrome contra un 15% de individuos normales (52).

2.7 Alteraciones en la membrana basal

En el síndrome nefrótico la glucosa y la manosa se acumulan principalmente en las glicoproteínas componentes de la membrana basal glomerular e inducen cambios en la orientación de su estructura tridimensional. Esto produce cambios marcados en el

tamaño de los poros que conducen a un aumento en la excreción de proteínas. Se ha propuesto que es el conjunto del efecto total de la interacción molecular de lípidos, proteínas y carbohidratos y no de la acción de alguno de ellos por separado.

Se ha visto que los glucocorticoides (usados en la terapia del síndrome) alteran la composición química de la membrana basal glomerular tanto en condiciones normales como de proteinuria, influenciando las actividades metabólicas y biosintéticas de las células glomerulares (53,54).

Estudios realizados por Caulfield, et. al. (55) muestran que esta membrana está dañada en el síndrome nefrótico producido por el aminonucleósido de la puromicina y que esto permite la pérdida de proteínas. Sin embargo, parece que el principal sitio de acción del aminonucleósido de la puromicina es en el epitelio, conduciendo a la producción de una membrana basal glomerular defectuosa.

En el síndrome nefrótico producido con el aminonucleósido de la puromicina se ha visto (56) que la hipoxantina es a) producto de degradación del aminonucleósido y b) sustrato para la xantina oxidasa (que cataliza su conversión a xantina y ácido úrico, produciéndose el anión superóxido en el proceso) (Fig. 9). Se estudió si los radicales libres del oxígeno contribuían a la aparición de proteinuria en el modelo de SN por ANP. Se usaron las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, así como el alopurinol (inhibidor de la xantina oxidasa). Los grupos con

superóxido dismutasa y alopurinol mostraron disminución en la proteinuria comparados con el grupo con ANP solo. Lo anterior, junto con observaciones al microscopio, dan evidencia indirecta de que los radicales libres del oxígeno generados son importantes mediadores de la proteinuria inducida por el ANP.

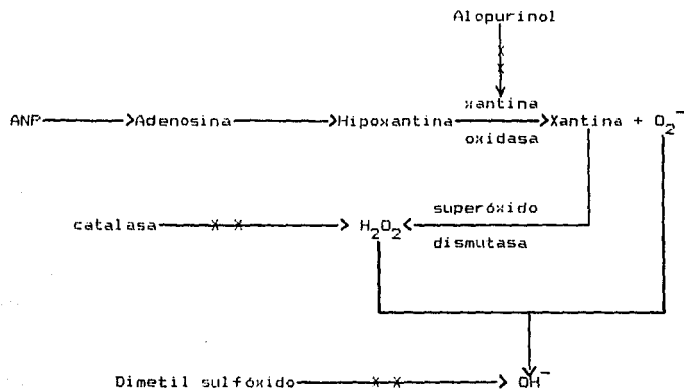


Fig. 9.- Degradación metabólica del ANP. Se ilustra la formación de radicales libres de oxígeno vía xantina oxidasa. O₂⁻: Anión superóxido, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, OH⁻: radicales hidroxilo. Las flechas con dos cruces indican inhibición (alopurinol), función barridora o lavadora (dimetil sulfóxido) o catalizadora de la hidrólisis del H₂O₂ (catalasa) (56).

2.8 Alteraciones en las lipoproteínas del plasma

Se ha postulado que la hiperlipemia del síndrome nefrótico es debida a una sobreproducción hepática de lipoproteínas plasmáticas que son muy grandes para ser eliminadas en la orina. Se ha comprobado la sobreproducción hepática en hígado perfundido aislado y en rebanadas del órgano. En SN producido con suero anti-rinón se ha visto que hay hipertrofia hepática (aumenta el peso del hígado un 30% de lo normal). Con aminonucleósido de la puromicina no se observa hiperplasia tal vez porque los metabolitos activos de dicho aminonucleósido son inhibidores de la síntesis del ARN (57).

Durante la etapa de proteinuria, se encuentran elevados los niveles de triglicéridos y del colesterol. En la fase de remisión (sin proteinuria) la distribución y composición de lipoproteínas es similar que en los controles sanos (58).

2.9 La concentración de albúmina plasmática en el síndrome nefrótico

Es la más abundante y la más estudiada de las proteínas de la circulación. Su concentración en plasma ha sido usada como un indicador de salud y enfermedad. A la albúmina se le han atribuido dos funciones principales: el mantenimiento de la

presión coloidosmótica (PCO) y el transporte de diferentes sustancias (ácidos grasos de cadena larga, calcio, vitaminas, etc.). La albúmina juega un papel muy importante en el metabolismo de las grasas, une los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo y los transporta en forma soluble en el plasma (38).

Al aumentar la presión coloidosmótica la síntesis de albúmina disminuye y viceversa. En la cirrosis, SN y edema pulmonar hay disminución de la PCO. En el SN se ha propuesto, como causa de los bajos niveles de albúmina, además de la pérdida en la orina, al aumento de la degradación de ésta por los riñones (38).

En los animales nefróticos, el edema y la ascitis se deben a la disminución de la PCO provocada por la pérdida de proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. Durante el SN aumenta la permeabilidad de la membrana basal glomerular a proteínas séricas de PM intermedio (60,000-200,000 d). La albúmina es la proteína predominante en la orina de estos pacientes, pero también hay cantidades importantes de otras proteínas de tamaño intermedio tales como la transferrina y la IgG (38).

2.10 El sodio y el sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome nefrótico

El sodio es el principal catión de los fluidos

extracelulares. Bajo condiciones normales, la pérdida de sodio por la piel es despreciable. Dicha pérdida puede ser considerable si aumenta la temperatura ambiental, o bien con fiebre o ejercicio muscular. En el caso de un individuo sano, si aumenta la temperatura ambiental, la principal regulación de sodio ocurre en los riñones. El balance de sodio es influenciado por la secreción adrenal de aldosterona, el inhibidor natural más potente de la excreción renal de sodio.

Para poder establecer el mecanismo causante de la retención de sodio en este síndrome, es esencial estudiar al paciente (o al animal de experimentación) cuando esté reteniendo sodio. Se deben evitar maniobras que se sepa de antemano que activan el sistema renina-angiotensina-aldosterona. En diversos estudios reportados en la literatura se concluye que el sistema se activa al disminuir tanto la albúmina como el volumen sanguíneo. No parece haber evidencia de que el sistema renina-angiotensina-aldosterona intervenga en la retención de sodio en el síndrome nefrótico (59-63).

Bohlin, et. al. (64), establecieron que la retención de agua en el síndrome nefrótico (25 niños estudiados) es secundaria a la retención de sodio.

En estudios en ratas con proteinuria unilateral producida por perfusión renal con ANP, se encontró que la excreción de sodio estaba aumentada en el riñón control sano y que en el riñón

perfundido estaba disminuida. Se observó que la excreción aumentada de sodio del riñón sano se compensaba con la retención de sodio del riñón proteinúrico (65).

Por las características de este síndrome y los antecedentes mencionados, se escogió el modelo de síndrome nefrótico inducido con aminonucleósido de la puromicina para estudiar la influencia del sistema renina-angiotensina-aldosterona sobre la retención de sodio.

II.- OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización secuencial del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome nefrótico experimental inducido en ratas, por una inyección única de aminonucleósido de la puromicina para evaluar su posible relación con las alteraciones bioquímico-clínicas que se presentan en el síndrome nefrótico, fundamentalmente el aumento de la retención de sodio.

Este trabajo permitirá explicar lo que sucede en el humano dado que el modelo de SN por ANP en ratas, ha sido aceptado como un buen modelo de lo que sucede en humanos nefróticos.

Previo a este trabajo se realizó la caracterización de este modelo de SN en el laboratorio de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (66).

III.- MATERIAL Y METODOS

III.- MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES.

1.1 Material biológico

Los animales utilizados fueron ratas (Rattus norvegicus), cepa Wistar, machos de entre 90 y 115 gramos (g) de peso. Se criaron y mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán con una dieta normal y agua ad libitum.

1.2 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron comprados de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo): reactivo de folin-fenol y Ciocalteu, aminonucleósido de la puromicina, albúmina sérica bovina grado RIA fracción V, aceite de cacahuete, ácido maléico (PM=116.1), carbón activado, dextrán grado clínico (PM=70,000), 2,3 dimercaptopropanol (Dimercaprol, BAL, PM=124.2), sulfato de 8-hidroxiquinolina (PM=194.2), trizma base, tris (hidroximetil) aminometano (PM=121), benzoato de bencilo, hipurato de histidil-leucina (HHL), Sigmacote y renina de riñón porcino.

De J.T. Baker fueron comprados: el cloruro de sodio, EDTA Na₂, acetato de etilo, ácido clorhídrico, alcohol etílico, fosfato dibásico de potasio, fosfato diácido de potasio,

hidróxido de sodio, sulfato de cobre, tartrato de sodio y carbonato de sodio.

En Sigma de México se compraron los amortiguadores de referencia para el potenciómetro (pH=7.38 y pH=6.0).

El estuche para medir aldosterona en plasma y orina fue comprado a International CIS (Francia).

De New England Nuclear se obtuvo la A I marcada con ^{125}I (actividad específica aproximada de 2000 Ci/mmol), las soluciones patrón de A I (de 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 ng de AI/ml).

El anticuerpo contra A I usado en el RIA fue obtenido en nuestro laboratorio (67) de acuerdo al método de Moore, et. al. La reactividad cruzada contra A II fué de 0.03%.

1.3 Equipo

A lo largo de este trabajo se usó el siguiente equipo:

Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II, potenciómetro de Orion Research modelo 201, baño de incubación a 37°C de Precision GCA Corporation, contador de centelleo sólido Gammacord II (AMES), congelador American (-20°C), centrifuga refrigerada Damon/IEC Division modelo PR-6000, vortex de Scientific Products SB 220, decapitador de Harvard Apparatus Co (catálogo 55-0012), micropipetas Oxford P 7000 (de 50, 100 y 200 microlitros), repipeteadores Gilson F 5000 (5 ml), F 1000 (1 ml), F 200 (0.2 ml) y P 20 (0.02 ml), repipeteadores de 10, 5 y 1 ml. de

Lab industries, bolsas de diálisis de Spectrapor (tamaño de poro de 6000 a 8000), papel filtro Whatman #42 de 11 cm. de diámetro, flamómetro IL 443, 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, jeringas de 1 ml. con agujas del número 25, celdillas de cuarzo 100 OS 1.000 10 mm Carl-Zeiss, celdillas de vidrio 104 OS 1.000 10 mm Carl-Zeiss, jaulas metabólicas de fabricación nacional para recolectar la orina de las ratas libre de heces. Las jaulas constan de una malla metálica (que permite el paso de la orina y retiene las heces) y de un cono colector para que escurra la orina hacia un recipiente. El comedero y bebedero están fuera del cuerpo de la jaula para que éstos no contaminen la orina. La comida se coloca en polvo. También se utilizaron tubos de vidrio de 12 X 75 mm, tubos borosilicados de la misma medida, gradillas metálicas, gradillas de acrílico para RIA, charolas de plástico para colocar en baño de hielo las gradillas de RIA, liofilizadora Labconco Freeze Dryer y finalmente un sistema purificador de agua Millipore modelo Milli-Q.

1.4 Soluciones

Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada y desionizada en un sistema purificador Millipore.

1.5 Material de vidriería

Los tubos para la recolección de la sangre se siliconizaron con Sigmacote al 1% en solución acuosa durante 15 minutos o se utilizaron tubos borosilicados para evitar la hemólisis. El resto del material de vidriería se usó después de lavarlo y enjuagarlo perfectamente con agua bidestilada y secarlo con calor.

2.0 METODOS

2.1 Orina

Se estudiaron dos grupos de ratas:

a) grupo control (n=10) al cual se le administró una inyección subcutánea de NaCl al 0.9% y

b) grupo con ANP (n=10) al cual se le administró una inyección subcutánea única de ANP en una dosis de 15 mg/100 gramos de peso corporal. El ANP se preparó al 2% en solución salina al 0.9%, por lo que a cada rata de 100 g se le inyectó un volumen de 0.75 ml.

Ambos grupos se mantuvieron en jaulas metabólicas desde el día -2 hasta el día 21 en que concluyó el estudio.

El día 0 es el día de la inyección de NaCl y de ANP al grupo control y al grupo experimental respectivamente. Se recolectó diariamente la orina de 24 h de las 20 ratas y se registró su peso corporal.

2.2 Suero o plasma

Se utilizaron 95 ratas distribuidas de la siguiente forma:

a) grupo control (n=15) y b) grupo con ANP (n=80).

Las inyecciones de NaCl al 0.9% y ANP fueron efectuadas en la misma forma que se describió para orina.

Las determinaciones del grupo control fueron realizadas los días -2, -1 y 0 y se obtuvo el promedio de los tres días. Para el grupo con ANP fué desde el día 1 hasta el día 21. Se sacrificaron 5 ratas diariamente desde el día -2 hasta el 10 y luego cada tercer día (días 12,14,16,18,20 y 21). En algunos casos fué posible aumentar el número de ratas y por lo tanto de las determinaciones. En otros casos el número de determinaciones fue menor porque la muestra fue insuficiente o por muerte de las ratas.

2.3 Determinaciones realizadas

2.3.1 Orina de 24 horas

A la orina recolectada se le midió el volumen, se filtró y se separó en alícuotas para las diferentes determinaciones, congelándolas posteriormente a -80°C .

Las determinaciones realizadas fueron sodio, proteínas y aldosterona.

2.3.2 Suero

Se separó de sangre obtenida por punción cardíaca o por decapitación de la rata. La sangre se recolectó en tubos perfectamente siliconizados para evitar la hemólisis y lograr una buena retracción del coágulo (aproximadamente 90 min). Luego se procedió a centrifugar las muestras durante 15 min a 2000 rpm; se sacó el coágulo y se volvieron a centrifugar por otros 15 min a 2000 rpm. El suero se separó en alícuotas. Algunas determinaciones se hicieron inmediatamente pero otras hubieron de realizarse posteriormente para lo cuál fueron congeladas las muestras a -20°C o menos si era posible.

En suero se determinó sodio, proteínas y actividad sérica de la ECA.

2.3.3 Plasma

El plasma se separó de sangre obtenida forzosamente por decapitación de la rata ya que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (13) y en reportes encontrados en la literatura, se ha demostrado que la concentración de los componentes del SRAA (con excepción de ECA), aumenta significativamente por la anestesia con éter (necesaria para realizar la punción cardíaca).

La sangre se colectó en tubos conteniendo 50 microlitros (μl) de EDTA 250 mM. Los tubos se sumergieron inmediatamente en baño de hielo y se centrifugaron a 4°C para obtener el plasma, el

cuál se separó en alícuotas las cuales se conservaron congeladas a -80°C .

Matsunaga et. al. (68) encontraron que el plasma puede ser almacenado a -20°C por lo menos 4 semanas sin cambios significativos en el nivel de renina activa. Encontraron que la concentración de ésta se aumenta por almacenamiento a 4°C porque hay conversión de renina inactiva a activa.

En el plasma se determinó la concentración plasmática de angiotensinógeno (CPA) y de renina (CPR) y la de aldosterona.

2.4 Sodio

2.4.1 Sodio sérico

Se midió por flamometría y los resultados se expresan en meq/l.

a) Principio del método

El primer uso de la flama como una fuente espectroscópica es generalmente atribuido a Bunsen y Kirchoff en 1860. La relación entre la composición química de las sustancias y el color resultante de la flama fué reportado por 1862; sin embargo, el uso del fotómetro de flama no se extendió hasta después de 1945 en que se desarrollaron comercialmente dichos aparatos. Ahora, el espectrofotómetro de emisión de flama es uno de los instrumentos más importantes en los laboratorios de química clínica.

En la flamofotometría intervienen electrones excitados en un

átomo usando energía calorífica de una flama. Cualquier sustancia, cuando se expone a temperaturas suficientemente elevadas, pasa a un estado excitado y tiene colisiones térmicas. Ya que este estado es inestable, los átomos o moléculas excitados regresan a su estado natural, dispersándose la energía absorbida en varias formas, una de las cuales es la emisión de luz. Cada molécula o átomo se ha asociado con una serie de niveles discretos de energía. La intensidad de la luz emitida (espectro) es directamente proporcional al número de átomos sometidos a transición. Así pues, por monitoreo selectivo a la longitud de onda característica de un elemento volatilizado y excitado en la flama, se mide directamente su concentración.

b) Metodología

El flamómetro utilizado es automático y seguro en la ignición. La medición se efectúa rápidamente. La calibración del aparato es simple; se efectúa en dos pasos. Se usa una solución blanco de 15 mM de Li en agua destilada y una solución patrón de calibración que para suero es de 140 mmol/l y para orina de 100 mmol/l de sodio. El flamómetro queda calibrado para dar una lectura lineal en un gran intervalo de concentraciones de sodio. El aparato indica directamente la concentración de sodio en meq/l; en el tablero frontal se muestra si la presión del aire o del gas es muy baja.

Al flamómetro IL 443 se le puede adaptar el dilutor IL 144. Este diluye automáticamente la muestra o los patrones con el

patrón interno de litio. La dilución efectuada es 1:200. Las muestras de orina y suero pueden aspirarse directamente al dilutor minimizando así errores de dilución, siempre y cuando se esperen valores menores a 200 mmol/l de sodio. El aparato se apaga automáticamente si la flama aumenta o si la presión del aire o del gas se elevan por arriba de límites de seguridad.

2.4.2 Sodio urinario

Se midió de igual manera que el sodio sérico y los resultados se expresan como meq/24 h. Se usaron 250 μ l de orina los cuales se diluyeron con 1 ml de agua destilada (dilución 1:5). La determinación en el flamómetro se realizó en esta dilución.

2.5 Proteínas totales

2.5.1 Proteínas séricas totales

Se usó el método de Lowry, et. al., (69) usando como patrón albúmina sérica bovina (ASB). El color se desarrolla en 2 pasos: a) la reacción de la proteína con cobre en condiciones alcalinas y b) la reducción del reactivo fosfo-molibdico-fosfotúngstico por la proteína tratada con cobre. La proteína se cuantifica por la cantidad de Tirosina y Triptofano presentes en ella comparada con la cantidad de estos aminoácidos en la proteína usada como patrón.

El método fué el siguiente:

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 la solución A + 1 ml. de la B.

Solución D: folín-fenol y Ciocalteu 1 N.

Solución E: solución patrón de ASB (1 mg/ml).

Para la determinación se tomaron 50 μ l 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 adicionaron 100 μ l de la solución D y se agitó en vortex; se dejó reposar 30 min. a temperatura ambiente y luego se leyó la densidad óptica (DO) a 660 nm contra su propio blanco. La curva patrón se muestra en la fig. 10. Los resultados se expresan como g/100 ml.

2.5.2 Proteínas urinarias totales

Se hizo la determinación igual que para suero pero utilizando 200 μ l de muestra para el ensayo. Para ello, previamente fueron dializados 500 μ l durante 24 horas contra solución salina al 0.9% y a 4°C con 5 cambios del líquido de diálisis. La muestra dializada queda totalmente transparente si no tiene proteínas, a diferencia de la orina que sí tiene y que toma el aspecto del suero de la rata dependiendo de la cantidad presente de proteínas.

Los resultados se expresan como mg/24 horas.

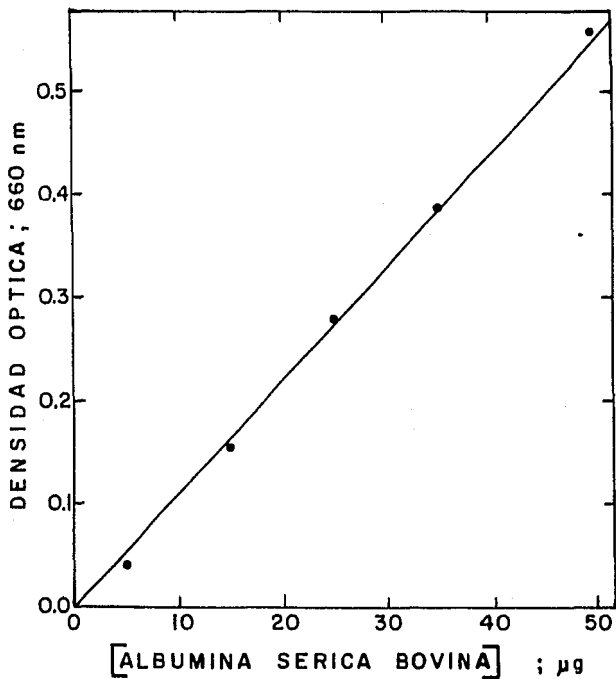


Fig. 10.- Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Lowry (69).

2.6 Concentración plasmática de renina (CPR) y de angiotensinógeno (CPA)

Su cuantificación se hizo por la técnica de RIA (70) de A I basada en el método de Haber y cols., quienes en 1965, subrayaron el significado fisiopatológico de las mediciones de renina y descubrieron las ventajas de un procedimiento de RIA para la estimación directa del producto primario de la actividad de renina: A I. Bajo las condiciones del ensayo se ve favorecida la acumulación de A I ya que se permite a la renina endógena reaccionar con su sustrato en presencia de reactivos que inhiben tanto a la ECA como a las angiotensinasas. Las condiciones del ensayo favorecen la generación de A I en un sistema amortiguado dentro de su pH óptimo de 5.5 a 6.0 en presencia de inhibidores adecuados (25).

2.6.1 Principio del método

Bleigs y cols. (71) demostraron que la A I es el metabolito resultante de la acción de la renina y que se rompe para dar A II bajo la acción de la enzima convertidora de A I. Tomando precauciones específicas para bloquear a ECA y a las angiotensinasas presentes normalmente en plasma, se puede decir que la acumulación de A I bajo condiciones controladas refleja la actividad enzimática de renina. La inhibición de la enzima convertidora de A I y angiotensinasas durante la generación de

A I se lleva a cabo por el uso de EDTA (en el tubo de recolección de la muestra), dimercaprol en solución oleosa al 1.7% conteniendo benzoato de bencilo al 3.3% en aceite de cacahuete y sulfato de 8-hidroxiquinolina en solución acuosa al 6.6%. Debido a que la reacción se lleva a cabo en condiciones óptimas (amortiguador de maleato 0.2 M, pH=6) el tiempo de generación de A I es de 1 hora. La cantidad de A I generada se mide por RIA; la separación del antígeno libre y unido se lleva a cabo por adsorción diferencial del material libre sobre carbón activado. La concentración del antígeno unido al anticuerpo se determina por conteo en un contador de radiaciones gama del líquido sobrenadante. La relación unido/libre (B/F) se expresa mediante una curva patrón de A I, de la cual los valores de las muestras desconocidas se obtienen por interpolación. La APR y la CPR se expresan como ng de A I generada/ml/h de incubación a 37°C.

En la medición de APR se usa el sustrato endógeno y en la medición de CPR se adiciona un exceso de angiotensinógeno. Este exceso se logra adicionando plasma de ratas binefrectomizadas 24 horas antes de la obtención del plasma. Este plasma no tiene niveles detectables de renina y su concentración de angiotensinógeno es aproximadamente 8 veces mayor al del plasma normal (72). Por esta razón es una fuente ideal de angiotensinógeno. En la práctica se obtuvo la sangre de las ratas binefrectomizadas por punción cardíaca, usando EDTA (50 µl de una

solución 250 mM) como anticoagulante. El plasma de varias ratas se mezcló y se liofilizó para almacenarlo. El día del ensayo el polvo se reconstituyó al volumen original con agua destilada.

En la determinación de la concentración plasmática de angiotensinógeno se adiciona un exceso de renina porcina para que todo el sustrato presente se transforme a A I y ésta se mida por RIA.

La renina porcina comercial utilizada contiene 50% de proteína. El contenido del frasco comercial es el siguiente: 1.7 unidades de enzima, 0.48 mg de sólido, 0.24 mg de proteína, es decir, que tiene 3.5 unidades/mg de sólido y 7.1 unidades/mg de proteína. Una unidad libera 100 μ g de A I a partir de angiotensinógeno a pH= 6.0 y 37°C. El frasco se reconstituyó en 10 ml de amortiguador de maleato (pH= 6.0) diluido 1:3 en agua destilada.

La A I radiactiva es comercial y viene liofilizada. Su actividad específica es de 2200 Ci/mmol (1550 μ Ci/ μ g). Cada lote trae indicada su actividad total (que es alrededor de 10 μ Ci) y la fecha en que fué envasado.

Los pasos que se siguen para calcular la cantidad de angiotensina radiactiva adicionada a cada tubo son los siguientes:

1.- El día que se reconstituye se cuentan los días transcurridos desde tal fecha para ver en qué porcentaje ha decaído el ¹²⁵I (la tabla de decaimiento viene incluida con el

frasco de A I radiactiva).

2.- Se calcula la actividad total real para el día de reconstitución (dato A) en μCi .

3.- Se divide la actividad total (dato A) entre la actividad específica (en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) para obtener la masa radiactiva (en μg). Este dato se transforma a pg (dato B).

4.- Se multiplica el volumen empleado de radiactivo ($50 \mu\text{l}$) por el número de tubos del ensayo para obtener los ml. requeridos/ensayo (dato C).

La masa radiactiva/tubo recomendada para el RIA de A I debe ser menor o igual a la concentración del patrón más bajo de la curva empleada, que es de 100 pg/ml (puede incluso ser de 10 pg/ml).

5.- Se multiplica el volumen requerido/ensayo (dato C) por 100 pg/ml (dato D) para obtener la masa radiactiva/ensayo (dato E).

6.- Se divide la masa radiactiva calculada para la fecha de reconstitución (dato B) entre la masa radiactiva/ensayo (dato E) para obtener el número de ensayos que pueden correrse con A I radiactiva en una concentración de 100 pg/ml (dato F).

7.- La hoja que acompaña al frasco con el péptido liofilizado recomienda reconstituir en agua destilada a una concentración de $50 \mu\text{Ci/ml}$. Se calcula el volumen de agua requerido (dato G) para reconstituir el frasco de acuerdo a la

actividad total existente el día de la reconstitución (dato A).

8.- El polvo se reconstituye en el volumen antes calculado (dato G) y se separa en el número de alícuotas calculado (dato F). Las alícuotas así obtenidas se congelan a -80°C . El día del ensayo se descongela una alícuota y se le agrega la cantidad requerida de amortiguador Tris-acetatos 0.1 M, $\text{pH}=7.38$ (dato B).

El radioinmunoanálisis de A I fue estandarizado en nuestro laboratorio previamente a su utilización (67). Se corrieron muestras de concentración conocida de A I en los niveles bajo, medio y alto de la curva patrón (0.175, 0.75 y 3.75 ng de A I/ml) en 15 ensayos y se calculó el promedio y la desviación estándar de cada uno y se graficaron.

Cada vez que se efectuó un RIA de A I se metieron nuevamente los controles y se tomó como regla descartar el ensayo si la concentración interpolada de dos o más controles caía fuera del intervalo de 2 desviaciones estándar.

2.6.2 Generación de angiotensina I

Las muestras de plasma congelado se ponen en un baño de agua a 4°C para descongelarlas.

El procedimiento seguido para medir la CPR fué el siguiente:

En un tubo se colocaron

- a) 50 μl de plasma
- b) 5 μl de dimercaprol
- c) 5 μl de 8-hidroniquinolina

d) 450 μ l de sustrato de renina (plasma de ratas binefrectomizadas)

e) 1 ml. de amortiguador de maleato, pH=6.

El tubo se agitó en vortex y se puso en baño María por una hora a 37°C. Pasado el tiempo de generación, se pusieron los tubos en el baño a 4°C. Se procedió a hacer el RIA tomando 100 μ l de muestra generada por tubo (se hace por duplicado).

El procedimiento seguido para la determinación de la CPA fué:

En un tubo se colocaron

a) 25 μ l de muestra

b) 5 μ l de dimercaprol

c) 5 μ l de 8-hidroxiquinolina

d) 5 μ l de EDTA 250 mM

e) 5 μ l de renina porcina

f) 360 μ l de amortiguador de maleato, pH=6

El tubo anterior se agitó perfectamente en un vortex y se incubó en baño María a 37°C por una hora. Al concluir la generación, se pusieron los tubos en baño a 4°C y se aforaron a 1 ml. con amortiguador de ensayo (tris-acetatos, pH=7.38). Para realizar el RIA se hizo una dilución 1:10 con amortiguador de ensayo, y se tomaron 50 μ l + 50 μ l de ASB al 5% para completar los 100 μ l del ensayo.

La generación de muestras para APR no se hizo en este

trabajo, pero se pondrá aquí su procedimiento por considerarlo de interés para ver las diferencias que existen con CPR en el mismo.

En un tubo se colocan:

- a) 300 μ l de muestra
- b) 5 μ l de dimercaprol
- c) 5 μ l de 8-hidroxiquinolina
- d) 600 μ l de amortiguador de maleato, pH=6

Se agita en vortex y se separa en dos tubos; uno se deja a 4°C y el otro se incuba a 37°C por una hora. Al final de la generación, se ponen los tubos a 4°C y se procede a realizar el RIA tomando 100 μ l de cada una de las dos muestras. La actividad plasmática de renina se obtiene restando el valor de 4°C del valor obtenido a 37°C.

2.6.3 Protocolo de RIA de angiotensina I

a) Se numeran los tubos y se mantienen en un baño de hielo a 4°C, al igual que los reactivos y las muestras generadas.

Los tubos 1 y 2 son para cuentas totales; los tubos 3 y 4 son para el blanco (unión no específica); los tubos 5, 6, 7 y 8 son para el 100% de unión (patrón cero o unión máxima); los tubos 9 y 10 para el patrón de 5 ng de A I/ml; los tubos 11 y 12 para 2.5 ng de A I/ml.; y así sucesivamente para los demás patrones de 1.0, 0.5, 0.25 y 0.1 ng de A I/ml (completando hasta el tubo 20). A partir de ahí se pusieron las muestras problema por duplicado.

b) Se ponen 500 μ l de amortiguador de ensayo (Tris-acetatos

0.1 M, pH=7.38) en los tubos blanco y 1500 μ l en los tubos de cuentas totales.

c) Se agregan 100 μ l de albúmina sérica bovina al 5% en los tubos blanco (unión no específica) y en los tubos del patrón cero (unión máxima) (tubos del 3 al 8).

d) Se ponen 100 μ l de cada patrón de A I (según el protocolo previamente realizado) en los tubos correspondientes. Los patrones vienen liofilizados y deben ser reconstituídos con agua fría para después separarlos en alícuotas y congelarlos.

e) Se ponen 100 μ l de cada muestra generada en los tubos pre-establecidos para los casos de APR (tanto de la muestra generada a 4°C como la de 37°C) y CPR. Para la determinación de la CPA se toman 50 μ l de la dilución 1:10 hecha después de la generación y se le adicionan 50 μ l de ASB al 5%. Para todos los casos deben correrse las muestras por duplicado en el ensayo.

f) Se agregan 50 μ l de la solución de A I marcada con ¹²⁵I a todos los tubos.

g) Se agregan 500 μ l de la solución de anticuerpo en todos los tubos excepto en los de cuentas totales y blanco. El anticuerpo se tiene congelado en alícuotas que al hacer el ensayo se descongelan y se les agrega 90 ml. de amortiguador de ensayo por c/u. A esta concentración une aproximadamente el 50% de la radiactividad adicionada (66).

h) Se agitan todos los tubos en vortex de 2-5 segundos y se

incubaban a 4°C durante 18 a 24 h (cuarto frío).

i) Antes de completar el período de incubación, se pone a agitar a 4°C una suspensión de carbón activado (carbón al 0.6% y dextrán al 0.0625% en amortiguador de ensayo) por una hora.

j) Finalizado el período de incubación, todas las muestras se colocan en un baño de hielo a 4°C y se les adiciona (excepto a los tubos de cuentas totales) 1 ml. de la suspensión de carbón activado que se mantiene en agitación y en baño de hielo.

k) Se agitan los tubos en vortex y se centrifugan a 4°C a 2000 rpm durante 15-20 minutos (con un cabezal de radio= 24 cm).

l) Se decanta el sobrenadante de cada tubo (menos cuentas totales) en otra serie de tubos con la misma numeración y se cuenta la radiactividad contenida en ellos por 1 min. La A I marcada unida al anticuerpo permanece en el sobrenadante y la fracción libre se adsorbe sobre el carbón. El protocolo para el RIA de A I se resume en la Tabla 1.

2.6.4 Cálculo de resultados

a) Las cuentas promedio del blanco (unión no específica) se le restan a las cuentas de los patrones (sin promediar) y al promedio de las muestras problema.

b) Se calcula el porcentaje de unión (B/Bo) para cada patrón y para el promedio obtenido con cada problema, en donde:

B= cpm obtenidas con cada patrón o muestra

Bo= cpm obtenidas con el patrón cero o 100% de unión

NUM. DE TUBO	AMORTI- GUADOR	A S B AL 5%	PATRONES	HUESTRA PROBLEMA	125 I-AI	ANTI CUERPO.	SE AGITA EN VORTEX Y SE INCUBA DE 18-24 HORAS A 4°C.	CARBON ACTIVADO	SE CENTRIFUGAN (TODOS MENOS CUENTAS TOTALES). SE MIDE LA RADIOACTIVIDAD DEL SOBRENADANTE EN UN CONTADOR GAMA.
CUENTAS TOTALES (1,2)	1500 μl	---	---	---	50 μl	--		--	
BLANCO (UNION INES- PECIFICA) (3,4)	500 μl	100 μl	---	---	50 μl	--		1000 μl	
PATRON CERO (UNION MAXIMA) (5-8)	---	100 μl	---	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
PATRONES DE AI (ng/ml) 0.1	---	---	100 μl	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
0.25	---	---	100 μl	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
0.5	---	---	100 μl	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
1.0	---	---	100 μl	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
2.5	---	---	100 μl	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
5.0	---	---	100 μl	---	50 μl	500 μl		1000 μl	
APR	---	---	---	100 μl	50 μl	500 μl	1000 μl		
CPR	---	---	---	100 μl	50 μl	500 μl	1000 μl		
CPA	---	50 μl	---	50 μl	50 μl	500 μl	1000 μl		

TABLA 1.- PROTOCOLO PARA DETERMINAR ANGIOTENSINA I POR RIA.

c) Usando papel semilogarítmico o papel logit-log se traza la curva patrón graficando el logit del % B/Bo contra el logaritmo de la concentración del patrón usado (de 0.1 a 5.0 ng de A I/ml.)

$$\text{logit (B/Bo)} = \log_{10}((B/Bo)/(1-B/Bo))$$

d) Se determina la concentración de A I para cada muestra interpolando en la gráfica correspondiente.

e) El resultado obtenido se multiplica por 3 (factor de dilución) para AFR, por 30 para CPR y por 800 para angiotensinógeno. Las unidades obtenidas son ng de A I/ml/h de incubación.

Una curva patrón típica obtenida por RIA de A I se muestra en la fig. 11.

2.7 Aldosterona

2.7.1 Aldosterona Plasmática

Se midió por RIA directo.

a) Fundamento

Se basa en la competencia entre la aldosterona marcada y la aldosterona presente en patrones o muestras problema, por los

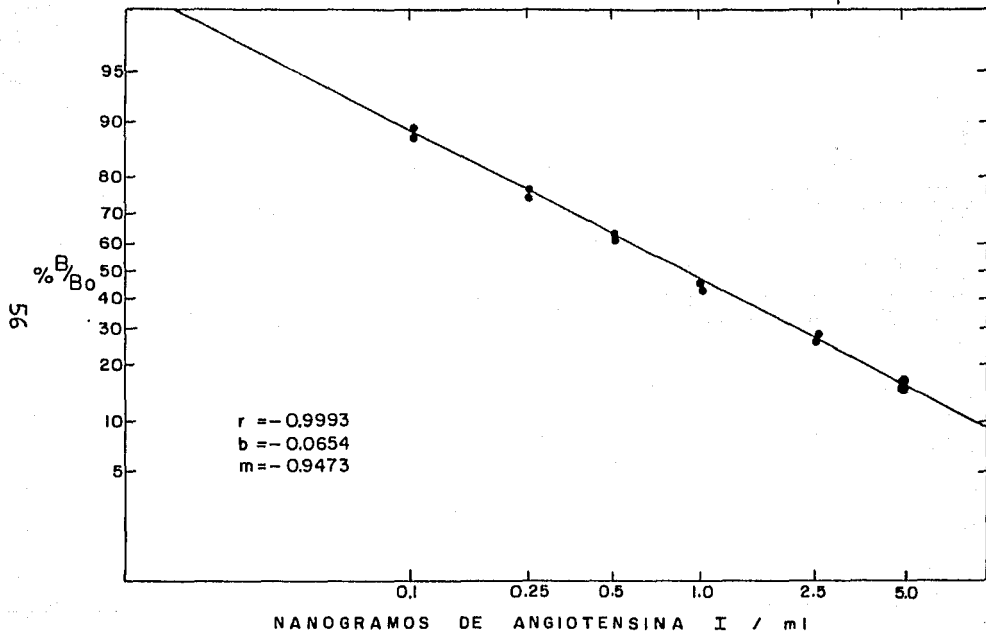


Fig. 11.- Curva patrón para la determinación de A I por RIA, usada para la determinación de APR, CFR y CPA. La escala de las ordenadas es logit y la de las abscisas es logarítmica.

sitios activos de anticuerpo presente en cantidad limitada. Después de la incubación, la cantidad de aldosterona marcada unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de aldosterona no marcada presente en la muestra. El método utilizado para la separación de la fracción libre de la unida se basa en el uso de tubos con el anticuerpo unido a sus paredes (fase sólida).

b) Protocolo RIA aldosterona

No se necesita hacer extracción previa de la muestra. No se deben usar muestras hemolizadas.

Se debe reconstituir la aldosterona marcada con 6 ml. de agua destilada. Los patrones (0, 50, 100, 250, 500 y 1000 pg de aldosterona) se reconstituyen con 1 ml. de agua destilada. El amortiguador de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4) de pH=7.4 se reconstituye con 80 ml. de agua destilada y posteriormente se le agrega la sal disódica del ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS) provista en el estuche.

Los tubos que vienen en el estuche traen unido el anticuerpo. Se deben tener a temperatura ambiente antes de abrir la bolsa que los contiene para evitar la condensación del vapor de agua. Se numeran de acuerdo a un protocolo escrito previamente. Se realizan las determinaciones por duplicado. El ensayo se efectúa a temperatura ambiente (18-25°C).

El esquema de trabajo es el siguiente:

Tubo	Amortiguador-ANS	Patrones	Muestra	Aldo- ¹²⁵ I
Patrones	700 μ l	200 μ l	-----	100 μ l
Problemas	700 μ l	-----	100 μ l	100 μ l

Todo lo anterior se mezcla en vortex y se incuba de 18 a 24 h de 2-8°C.

Al final de la incubación se aspira el contenido de todos los tubos (o se pueden decantar) y se enjuagan 2 veces con 2 ml. de agua destilada usando un repipeteador y posteriormente se aspira el agua con vacío. Se mide la radiactividad presente en los tubos en un contador de radiaciones gama por 1 minuto.

c) Cálculo de resultados

Se restan las cpm del fondo del aparato para ¹²⁵I de las cpm de todos los tubos. Tanto para los patrones como para la media de las muestras problema se obtiene el cociente B/Bo igual que como se explicó para A I.

Se traza la gráfica patrón en papel logit-log graficando el logit del %B/Bo contra el logaritmo de la concentración del patrón usado (de 50 a 1000 pg de aldosterona/ml).

Se determina la concentración de aldosterona plasmática de

las muestras problema interpolando el logit obtenido en la gráfica correspondiente. El resultado obtenido se multiplica por 2 (ya que se pone la mitad de muestra con respecto a los patrones). Una curva patrón típica obtenida para aldosterona plasmática se muestra en la fig. 12.

2.7.2 Aldosterona urinaria

a) Fundamento

Es el mismo que para la aldosterona plasmática.

b) Protocolo RIA

Se debe efectuar una hidrólisis ácida de la orina: a 100 μ l de orina se le agregan 200 μ l de HCL 0.2 N para llevar a un pH de 1.0; se tapan los tubos, se mezclan y se incuban de 15 a 20 h a 30°C.

El amortiguador-ANS utilizado y la aldosterona marcada son los mismos que los usados para el RIA de plasma. Los patrones para orina se obtienen a partir de una solución de 400 ng de aldosterona en 1 ml. de etanol. Se hacen diluciones seriadas con el amortiguador-ANS a tener los siguientes patrones: 0.70, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 y 25 ng/ml. La ASB que se utiliza en el siguiente esquema es ASB al 30%.

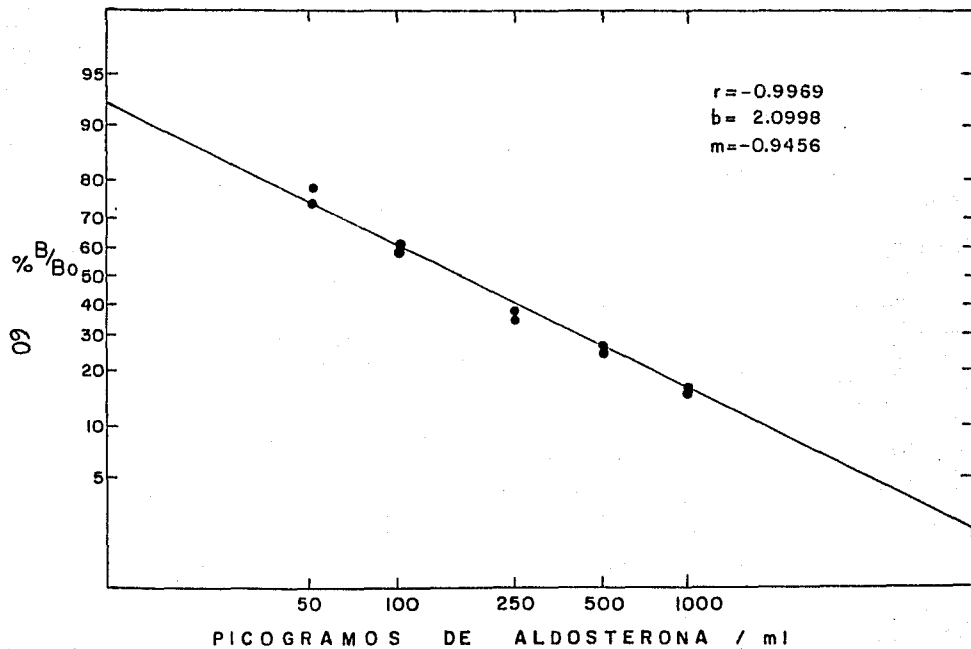


Fig. 12.- Curva patrón para la determinación de Aldosterona en plasma o suero por RIA.

Tubo Amortiguador-ANS ASB	Patrones	Muestras	Aldo- ¹²⁵ I
Patrón 0 700 µl 100 µl	-----	-----	100 µl
c/patrón 700 µl 100 µl	20 µl	-----	100 µl
Problemas 700 µl 100 µl	-----	40 µl	100 µl

Todo lo anterior se mezcla en vortex y se incuba de 18 a 24 horas de 2 a 8°C.

Se mide la radiactividad de los tubos en un contador de radiaciones gama después de haber decantado o aspirado el contenido de los mismos y haberlos enjuagado 2 veces con agua destilada. El tiempo de conteo es de 1 minuto.

c) Cálculo de resultados

Se hace exactamente igual que para la aldosterona plasmática sólo que el resultado obtenido se divide entre 2 (ya que se puso el doble de muestra con respecto a los patrones).

Debido a que la orina se diluyó 1:3 con el HCl 0.2 N, la concentración de aldosterona interpolada se multiplica por 3. El resultado se multiplicó posteriormente por el volumen (en mililitros) de orina colectada en 24 horas, para obtener la

excreción diaria de aldosterona (ng de aldosterona/24 horas).

En la fig. 13 se muestra una curva patrón típica obtenida en un RIA de aldosterona urinaria.

2.8 Actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I

Se realizó de acuerdo al método de Lieberman, et. al. (73), que es una modificación del método descrito por Cushman y Cheung (74). En este trabajo se sustituyó al agua por alcohol etílico para resuspender la muestra después de la evaporación del acetato de etilo por problemas de turbidez (75).

2.8.1 Fundamento

La ECA hidroliza al sustrato sintético hipurato de histidil leucina (HHL) en ácido hipúrico (AH) y el dipeptido His-Leu. El AH se extrae con acetato de etilo y se mide su extinción a 228 nm. La actividad se expresa en nanomoles de AH/ ml. de suero/ minuto de incubación a 37°C.

2.8.2 Ensayo

El esquema para la determinación de la actividad de la ECA se muestra en la fig. 14.

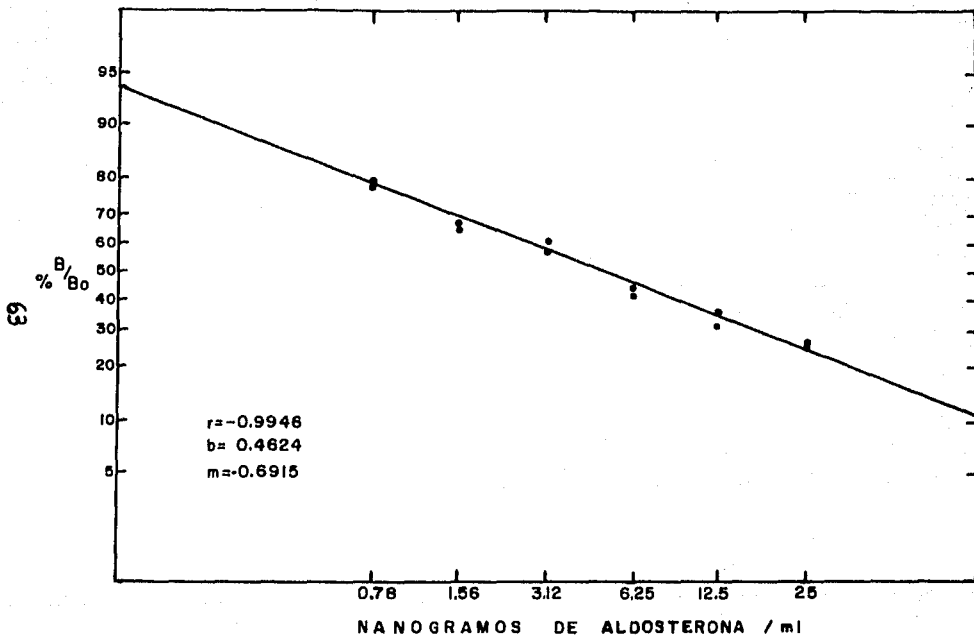


Fig. 13.- Curva patrón para la determinación de Aldosterona en orina por RIA.

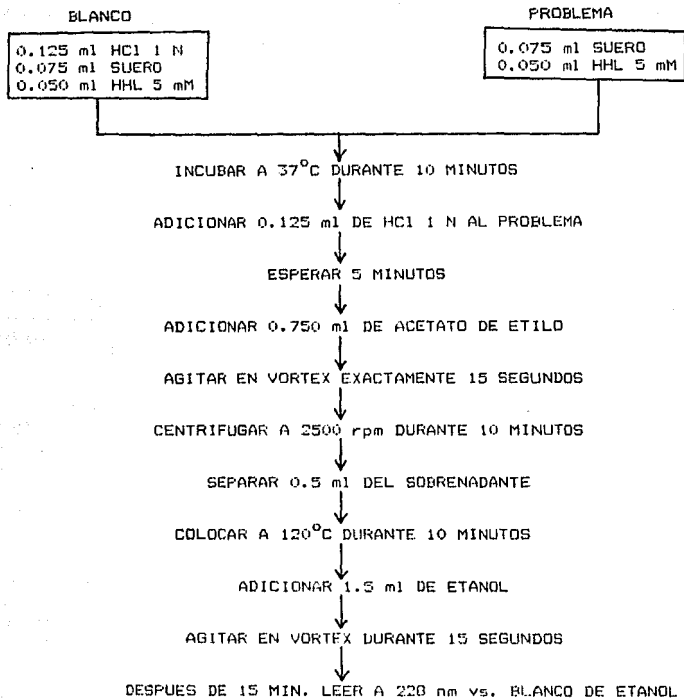


FIG. 14.- ESQUEMA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD SERICA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I SEGUN EL METODO UTILIZADO EN ESTE TRABAJO (75).

2.8.3 Cálculo de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I

Se utiliza la siguiente fórmula (74, 75):

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

donde:

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

a = fracción de AH extraída (calculada en cada ensayo)

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

c = tiempo de incubación en minutos (10 min)

d = mililitros de suero por tubo (50 μl)

A_{228} = absorbencia a 228 nm

10^3 = factor para convertir a milimoles.

2.9 Análisis de los datos

2.9.1 Técnica del análisis

Los resultados de las variables estudiadas fueron tabulados por grupo y por animal de experimentación. Posteriormente los datos fueron codificados y capturados en formato fijo equivalente

a FORTRAN IV, en una minicomputadora Hewlett-Packard 3000/49 del Departamento de Informática del Instituto.

Una vez capturados todos los datos se obtuvo una impresión de los mismos y se realizó una "corrección de sábanas" para asegurar la correcta captura de todos los parámetros.

Los datos fueron analizados mediante diversos programas del paquete estadístico S.P.S.S. (Statistical Package for the Social Sciences), (76).

2.9.2. Análisis estadístico

2.9.2.1. Estadística descriptiva

De cada una de las variables de estudio se efectuó el análisis de sus parámetros descriptivos mediante el programa FRECUENCIAS de los cuales se reportan la media como medida de tendencia central y el error estándar como medida de dispersión. Dichos resultados se encuentran en las tablas y figuras correspondientes.

2.9.2.2. Inferencia paramétrica

Por tratarse exclusivamente de variables paramétricas, se empleó la prueba T de Student bimarginal para la comparación de las medias. En vista de que el grupo control y el experimental son diferentes animales y que además no siempre tenían el mismo número de observaciones, se empleó la variedad No Pareada de la

prueba. Los cálculos fueron efectuados mediante el programa T-TEST que emplea la técnica de Varianzas Acumuladas.

En todos los casos, junto con la determinación del valor de T se obtuvo la prueba de Bartlett, con el objeto de comparar la homogeneidad de las varianzas (homosedasticidad). En todos aquellos casos en los que la prueba de Bartlett fue significativa ($p < 0.05$) demostrando heterogeneidad en las varianzas (heterosedasticidad), el valor obtenido de la T de Student fue desechado independientemente de su grado de significancia probabilística.

El empleo de la T de Student como prueba inicial de comparación fue elegido por su potencia y sensibilidad estadística, a pesar de el número limitado de observaciones en algunos de los experimentos.

2.9.2.3. Inferencia no paramétrica

En aquellos casos en los que las varianzas fueron heterogéneas y que por lo tanto violaban un principio básico de la estadística paramétrica, se decidió efectuar la comparación de los grupos mediante la U de Mann-Whitney (corregida para empates). Esta fue calculada mediante el programa NPAR TESTS y constituye el equivalente no paramétrico de la T de Student No Pareada, con una potencia relativa de 95%.

2.9.2.4. Análisis a lo largo del tiempo

En los estudios longitudinales como el presente, la

comparación de un parámetro contra una determinación basal en ocasiones no refleja el cambio "biológico" obtenido. En esos casos, la variación de los resultados obtenidos en diversas determinaciones a lo largo del tiempo puede en conjunto reflejar de una manera más precisa dicho cambio.

El empleo de métodos automatizados en el análisis de los datos ha permitido que en la actualidad sea factible realizar ese tipo de comparaciones que de otra manera implicarían una alta complejidad matemática y técnica.

En las determinaciones efectuadas en la orina de los animales de experimentación se contó con un grupo control que fue seguido a lo largo del tiempo con el grupo de estudio. En esas variables se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) para Mediciones Repetidas mediante el programa RELIABILITY.

2.9.2.5. Nivel de significancia

Para todas las pruebas empleadas se eligió el nivel alfa de 0.05 o menor para rechazar las hipótesis de nulidad.

IV.- RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Los resultados presentados en las siguientes tablas y figuras representan la media (\bar{x}) \pm el error estándar (EE).

1.- Proteínas totales

1.1 Proteínas totales urinarias

La tabla 2 y figura número 15 muestran la proteinuria que se presenta en el SN inducido por ANP. La tabla 3 muestra el ANDEVA de mediciones repetidas.

La proteinuria observada en protocolos anteriores se presenta nuevamente en forma masiva el día 4 sólo que alcanzando valores de hasta 1 g/24 h el día 9 (a diferencia de los 300-400 mg/24 h anteriores). El día 21, final del estudio, las proteínas aún no regresaban a los valores basales como en ocasiones anteriores, pero probablemente se deba a que se alcanzaron cifras más elevadas y se hubieran requerido más días de estudio para lograrlo.

1.2 Proteínas totales séricas

La tabla 4 y figura 16 número muestran la pérdida de proteínas en suero durante el SN.

Las proteínas séricas disminuyeron desde el día 5 regresando a valores normales el día 12.

2.-Volumen urinario

Está expresado en ml/24 h. En la tabla número 5 y figura número 17 se muestran los resultados obtenidos de volumen urinario. En la tabla número 6 se muestra el ANDEVA de mediciones repetidas.

Se observa que el volumen urinario se encuentra significativamente elevado del día 7 al 10, coincidiendo con la desaparición de la ascitis.

3.- Sodio

3.1 Sodio urinario

Está expresado en meq/24 h y los resultados se muestran en la tabla 7 y figura número 18. Los resultados del ANDEVA de mediciones repetidas se muestran en la tabla 8.

La excreción de sodio disminuyó notablemente el día 2 para regresar a valores normales el día 8. Se aprecia en el día 4 un pequeño pico de aumento de sodio urinario (sin llegar a valores normales) que puede sugerir dos fases de retención, una inicial o temprana (días 2 y 3) y otra final o tardía (días 5-7).

3.2 Sodio sérico

Los resultados se resumen en la tabla 9 y figura número 19. El sodio sérico está expresado en meq/l.

El sodio sérico se encontró significativamente elevado a partir del día 7 y regresó a valores basales el día 21.

4.- Angiotensinógeno

La tabla 10 y figura número 20 muestran la marcada disminución del sustrato de renina durante el SN inducido por el ANP.

El angiotensinógeno disminuyó los días 5-10 y regresó a valores basales el día 12. Ya que el PM del angiotensinógeno es de 49,548 d, es de esperarse que se esté perdiendo por la orina. El perfil del sustrato es muy similar al observado para proteínas séricas totales.

5.- Concentración plasmática de renina

La tabla 11 y figura 21 muestran el aumento que ocurre en la CPR durante el estudio. Se encuentra expresada como ng de A I liberada/ ml de plasma/ hora de generación.

La concentración plasmática de renina aumentó los días 5, 6 y 7, asociándose con la hipoproteïnemia, la cuál produce una disminución de la presión coloidosmótica y una disminución del volumen circulante, el cuál puede ser un estímulo para el aumento en la secreción de renina.

6.- Enzima convertidora de angiotensina I

Se expresa en nanomoles de ácido hipúrico liberado por ml de suero por minuto de incubación. La figura 22 y tabla 12 muestran los cambios observados en la actividad de la ECA en el SN.

La actividad de la enzima convertidora de A I presenta

también un patrón bifásico de aumento de actividad, el primero los días 1 y 2 y el segundo los días 4 a 9, alcanzando el máximo de actividad el día 6.

7.- Aldosterona

7.1 Aldosterona urinaria

El aumento observado en la excreción de aldosterona en el SN por ANP, se aprecia en la tabla 13 y figura 23. El resultado está expresado en ng/24 horas. El ANDEVA de mediciones repetidas se muestra en la tabla 14.

La aldosterona urinaria también aumenta desde el día 2 para estar en valores normales el día 5 y luego el día 6 sube alcanzando valores de hasta 176.8 ng/24 h el día 7 y empieza a bajar a partir del día 8.

7.2 Aldosterona plasmática

El aumento observado en la concentración de aldosterona se encuentra plasmado en la tabla 15 y figura 24. Los resultados se expresan en pg/ml.

La aldosterona plasmática presenta un patrón bifásico. La secreción aumenta inmediatamente el día 1 y se mantiene hasta el día 3, luego el día 4 es normal y aumenta nuevamente los días 5 y 6.

En nuestro modelo experimental los resultados indican que el

aumento de la secreción de renina ocurre (día 5) después que el inicio de la disminución en la excreción de sodio (día 2) pero lo que llama la atención es que hay activación de la secreción de aldosterona y de ECA antes de la activación de renina. Por lo tanto, hay una activación de aldosterona y ECA independiente de la secreción de renina y es un hallazgo no esperado pero que pudiera explicar el aumento de la retención de sodio antes de la activación de la secreción de renina, mediado por aldosterona y A I.

h₂

TABLA 2 PROTEINAS URINARIAS (mg/24 h)

DIA	CONTROL	ANP	DIA	CONTROL	ANP
-2	4.6 ± 0.8	4.9 ± 0.6	10	9.3 ± 1.2	558.0 ± 69.9+
-1	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.3	11	9.4 ± 1.1	980.1 ± 129.9+
0	2.8 ± 0.3	3.1 ± 0.5	12	9.6 ± 0.6	524.9 ± 98.7+
1	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.3	13	9.8 ± 0.5	480.8 ± 143.9+
2	2.5 ± 0.4	3.2 ± 0.5	14	12.3 ± 0.6	966.6 ± 147.4+
3	3.0 ± 0.3	4.3 ± 0.4*	15	11.4 ± 1.1	541.1 ± 124.0+
4	4.8 ± 1.4	17.0 ± 1.8*	16	12.4 ± 0.5	369.4 ± 62.7+
5	5.1 ± 1.1	293.5 ± 59.4+	17	13.3 ± 1.5	410.5 ± 46.1+
6	5.7 ± 0.8	658.5 ± 109.0+	18	13.8 ± 1.3	337.7 ± 32.8+
7	8.0 ± 2.4	898.8 ± 91.2+	19	19.1 ± 2.2	391.6 ± 108.3+
8	7.3 ± 2.0	628.6 ± 84.6+	20	13.9 ± 1.7	234.0 ± 40.1+
9	6.7 ± 0.8	1057.7 ± 102.6+	21	15.3 ± 0.7	353.8 ± 86.6+

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Dimarginal)

+ p < 0.05 (U-Mann Whitney corregida para empates)

TABLA 3.- ANDEVA DE MEDICIONES
REPETIDAS DE PROTEINAS URINARIAS

75

FUENTE DE VARIACION	SC	gl	CM	F	PROBABILIDAD
ENTRE GRUPOS	1376081.72	23	59829.64	32.990	0.00001.
DENTRO DE LOS GRUPOS	3273575.73	24	136398.98		
ENTRE MEDICIONES	1928850.14	1	1928850.14		
RESIDUAL	1344725.59	23	58466.33		
TOTAL	4649657.41	47	98928.88		

SC=SUMA DE CUADRADOS

gl=GRADOS DE LIBERTAD

CM=CUADRADOS MINIMOS

FIGURA 15.- PROTEINAS URINARIAS

76

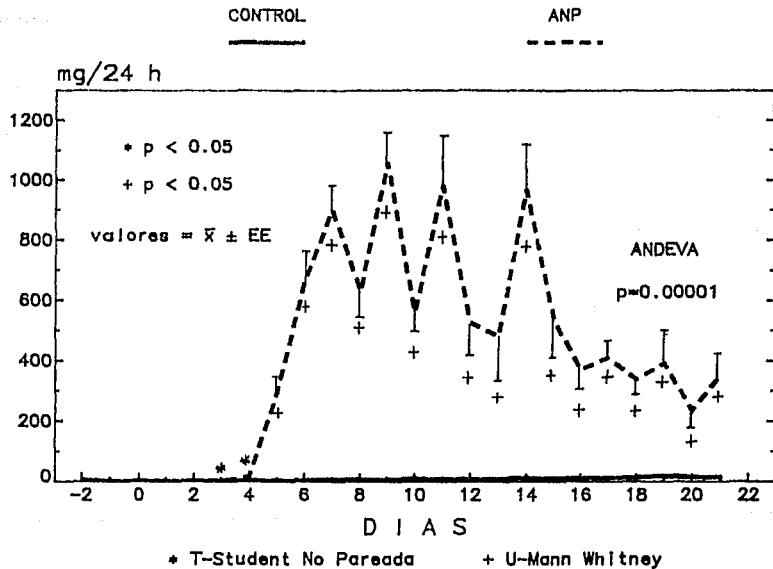


TABLA 4 PROTEINAS SERICAS

DIA DE ESTUDIO	g/100 ml	DIA DE ESTUDIO	g/100 ml
0 (CONTROL)	7.5 ± 0.4	8	5.1 ± 0.3*
1	6.9 ± 0.2	9	4.0 ± 0.6*
2	8.1 ± 0.2	10	4.7 ± 0.4*
3	7.4 ± 0.2	12	7.2 ± 0.2
4	7.0 ± 0.5	14	6.8 ± 0.1
5	5.2 ± 0.5*	16	7.2 ± 0.2
6	4.8 ± 0.1*	18	7.5 ± 0.5
7	4.8 ± 0.3*	20	7.6 ± 0.3
		22	7.7 ± 0.6

±±

p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

FIGURA 16.- PROTEINAS SERICAS

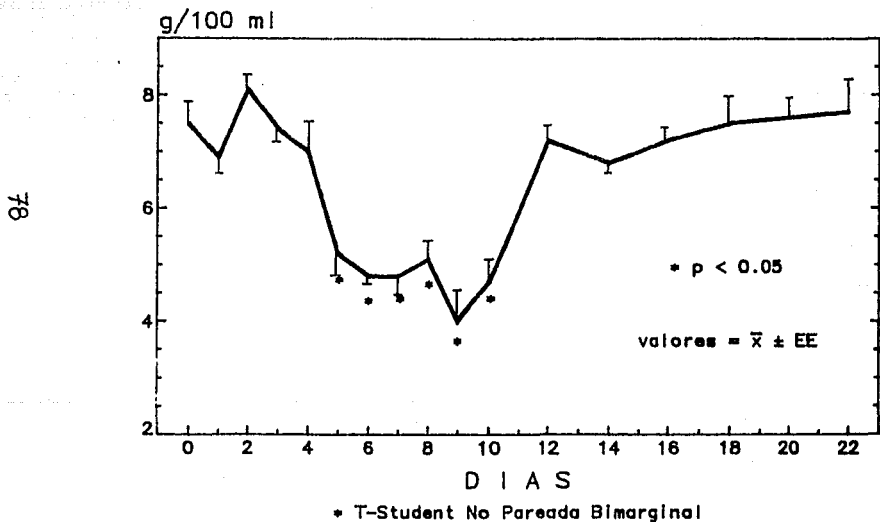


TABLA 5 VOLUMEN URINARIO (ml/24 h)

DIA	CONTROL	ANP	DIA	CONTROL	ANP
-2	4.9 ± 1.1	5.3 ± 0.8	10	6.7 ± 1.3	13.7 ± 2.0*
-1	3.9 ± 0.5	3.5 ± 0.6	11	11.2 ± 4.0	10.7 ± 1.4
0	4.3 ± 0.6	4.0 ± 0.6	12	7.7 ± 3.2	7.5 ± 1.3
1	5.9 ± 0.9	6.9 ± 1.2	13	8.8 ± 2.8	8.3 ± 0.9
2	4.5 ± 0.5	6.5 ± 0.8	14	7.9 ± 1.9	7.7 ± 2.0
3	4.9 ± 0.9	3.1 ± 0.7	15	7.3 ± 1.7	11.6 ± 3.5
4	3.4 ± 0.8	5.7 ± 1.1	16	8.2 ± 1.4	8.4 ± 1.6
5	4.7 ± 0.6	4.7 ± 0.7	17	8.5 ± 1.2	8.6 ± 0.8
6	5.5 ± 1.4	7.5 ± 1.6	18	7.5 ± 1.3	8.1 ± 0.8
7	6.1 ± 1.6	13.5 ± 2.7*	19	10.9 ± 2.9	8.6 ± 1.1
8	4.9 ± 1.1	18.5 ± 3.4+	20	6.2 ± 1.2	8.0 ± 1.3
9	6.3 ± 1.2	19.3 ± 2.9*	21	9.0 ± 1.3	8.0 ± 0.7

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

+ p < 0.05 (U-Mann Whitney corregida para empates)

TABLA 6.-ANDEVA DE MEDICIONES
REPETIDAS DE VOLUMEN URINARIO

88

FUENTE DE VARIACION	SC	gl	CM	F	PROBABILIDAD
ENTRE GRUPOS	299.2798	23	13.0121	5.5887	0.0269
DENTRO DE LOS GRUPOS	252.7549	24	10.5314		
ENTRE MEDICIONES	49.4102	1	49.4102		
RESIDUAL	203.3447	23	8.8410		
TOTAL	552.0348	47	11.7445		

SC=SUMA DE CUADRADOS

gl=GRADOS DE LIBERTAD

CM=CUADRADOS MINIMOS

FIGURA 17.- VOLUMEN URINARIO

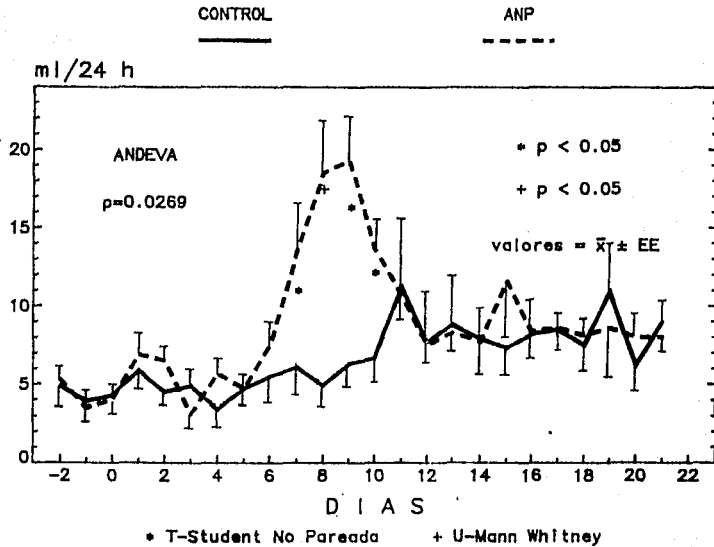


TABLA 7 SODIO URINARIO (meq/24 h)

DIA	CONTROL	ANP	DIA	CONTROL	ANP
-2	0.63 ± 0.10	0.72 ± 0.06	10	1.30 ± 0.27	1.87 ± 0.14
-1	0.64 ± 0.07	0.66 ± 0.05	11	1.50 ± 0.28	1.25 ± 0.23
0	0.65 ± 0.05	0.59 ± 0.11	12	1.30 ± 0.20	1.20 ± 0.06
1	0.90 ± 0.07	1.10 ± 0.10	13	1.50 ± 0.20	1.27 ± 0.07
2	0.78 ± 0.10	0.22 ± 0.01+	14	1.64 ± 0.27	0.90 ± 0.26
3	1.03 ± 0.12	0.05 ± 0.03+	15	1.76 ± 0.19	1.30 ± 0.20
4	0.92 ± 0.12	0.22 ± 0.09*	16	1.56 ± 0.29	1.25 ± 0.27
5	0.94 ± 0.13	0.13 ± 0.04*	17	0.91 ± 0.28	1.47 ± 0.10
6	0.86 ± 0.22	0.04 ± 0.01+	18	1.08 ± 0.19	1.10 ± 0.26
7	0.84 ± 0.16	0.20 ± 0.04+	19	1.15 ± 0.09	1.00 ± 0.10
8	1.10 ± 0.22	0.96 ± 0.30	20	1.34 ± 0.10	1.24 ± 0.20
9	1.30 ± 0.15	1.40 ± 0.30	21	1.20 ± 0.25	1.10 ± 0.10

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

+ p < 0.05 (Mann-Whitney corregida para empates)

TABLA 8.- ANDEVA DE MEDICIONES
REPETIDAS DE SODIO URINARIO

88

FUENTE DE VARIACION	SC	gl	CM	F	PROBABILIDAD
ENTRE GRUPOS	6.5186	23	0.2834	7.5930	0.01126
DENTRO DE LOS GRUPOS	2.6229	24	0.1092		
ENTRE MEDICIONES	0.6510	1	0.6510		
RESIDUAL	1.9719	23	0.0857		
TOTAL	9.1416	47	0.1945		

SC=SUMA DE CUADRADOS

gl=GRADOS DE LIBERTAD

CM=CUADRADOS MINIMOS

FIGURA 18.- SODIO URINARIO

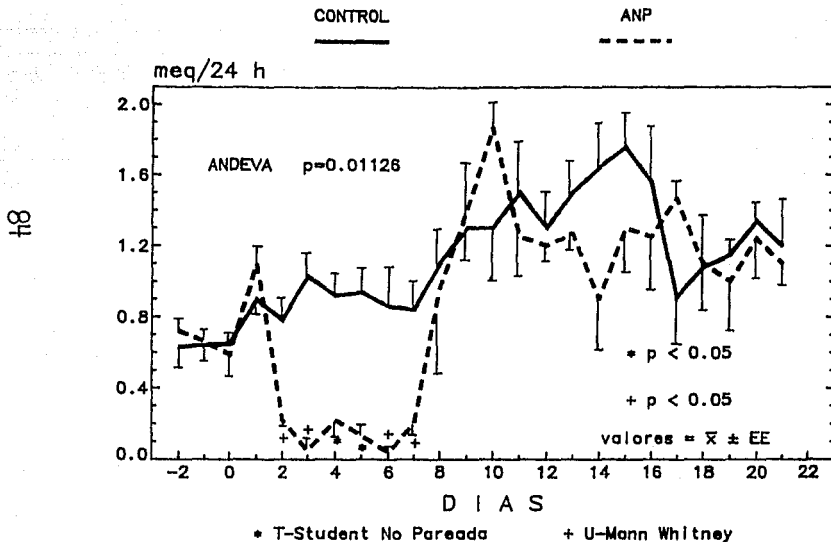


TABLA 9 SODIO SERICO

DIA DE ESTUDIO	meq Na+/l	DIA DE ESTUDIO	meq Na+/l
0 (CONTROL)	147.0 ± 0.8	9	151.2 ± 1.2*
1	147.3 ± 1.1	10	149.6 ± 1.6
2	143.9 ± 2.4	12	143.2 ± 1.9
3	149.2 ± 1.0	13	141.8 ± 1.5*
4	151.8 ± 2.5	14	144.7 ± 1.0
5	149.5 ± 1.3	16	143.4 ± 0.3+
6	149.4 ± 2.4	18	145.2 ± 0.7
7	150.5 ± 1.1*	20	143.0 ± 0.8*
8	150.4 ± 1.0*	21	148.0 ± 1.0

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

+ p < 0.05 (U-Mann Whitney corregida para empates)

FIGURA 19.- SODIO SERICO

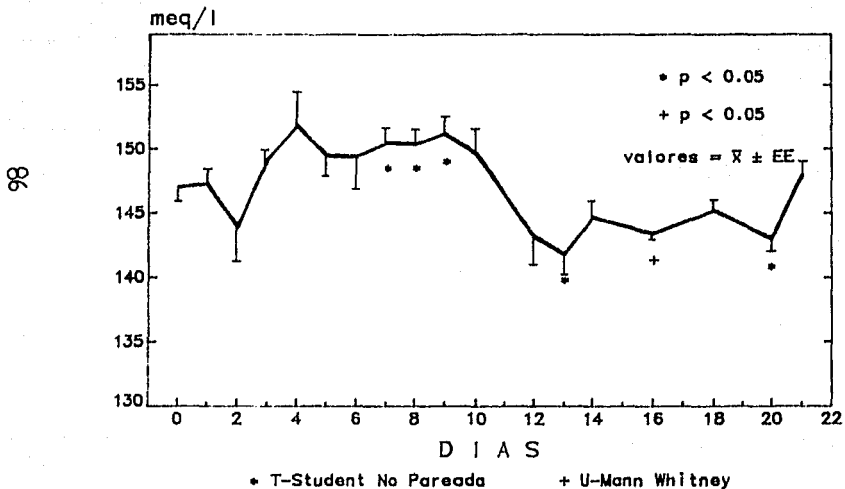


TABLA 10 ANGIOTENSINOGENO

DIA DE ESTUDIO	ng A l/ml	DIA DE ESTUDIO	ng A l/ml
0 (CONTROL)	1118.2 ± 181.3	8	409.0 ± 8.9+
1	1155.6 ± 93.6	9	530.6 ± 68.1*
2	1381.0 ± 111.0	10	282.5 ± 27.7+
3	1571.2 ± 299.0	12	1021.5 ± 165.5
4	733.4 ± 95.6	16	876.7 ± 64.0
5	310.6 ± 33.6+	18	985.8 ± 94.2
6	374.6 ± 74.4*	20	1350.2 ± 110.5
7	441.4 ± 45.1+		

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)
 + p < 0.05 (U-Mann Whitney corregida para empates)

FIGURA 20.- ANGIOTENSINOGENO

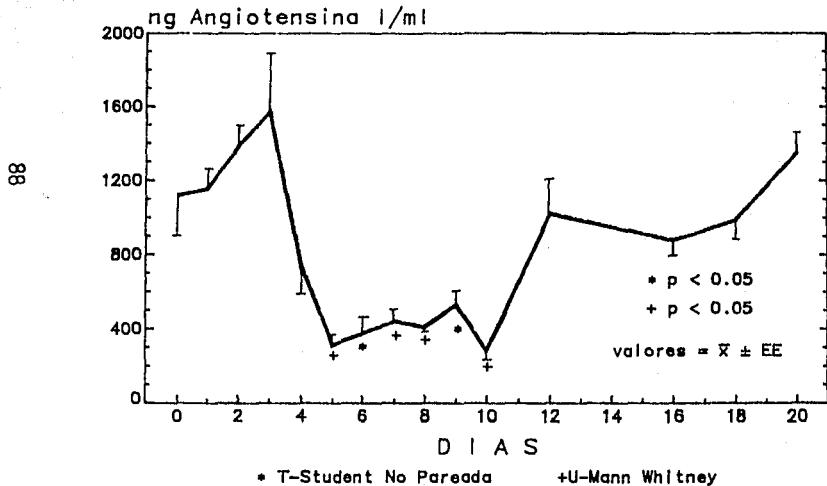


TABLA 11 CONCENTRACION PLASMATICA DE RENINA

DIA DE ESTUDIO	ng de A l/ml/h	DIA DE ESTUDIO	ng de A l/ml/h
0 (CONTROL)	29.5 ± 8.4	6	170.8 ± 14.8*
1	34.8 ± 1.8	7	71.0 ± 10.7*
2	37.0 ± 4.0	8	52.4 ± 9.2
3	30.2 ± 4.9	9	33.2 ± 7.2
4	33.6 ± 5.1	10	25.2 ± 4.5
5	102.5 ± 7.0*	22	21.2 ± 6.7

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

FIGURA 21.- CONCENTRACION PLASMATICA DE RENINA

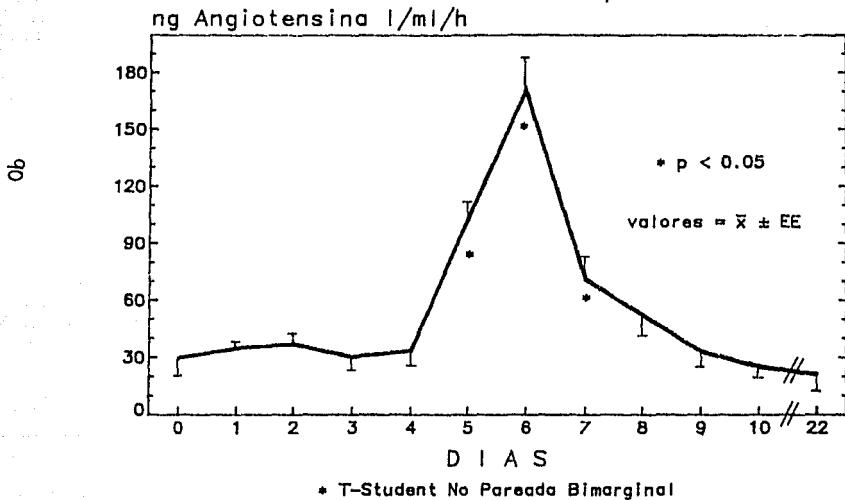


TABLA 12 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I

lb

DIA	nmoles de AH/ml/min	DIA	nmoles de AH/ml/min
0 (CONTROL)	152.6 ± 3.2	6	309.5 ± 36.9+
1	171.8 ± 8.6+	7	213.3 ± 11.8+
2	207.5 ± 6.7*	8	200.1 ± 10.1*
3	162.3 ± 8.7	9	231.9 ± 13.0+
4	236.3 ± 10.1*	10	163.9 ± 6.9
5	207.3 ± 25.5+	22	158.0 ± 11.5

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

+ p < 0.05 (U-Mann Whitney corregida para empates)

FIGURA 22
 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I

92

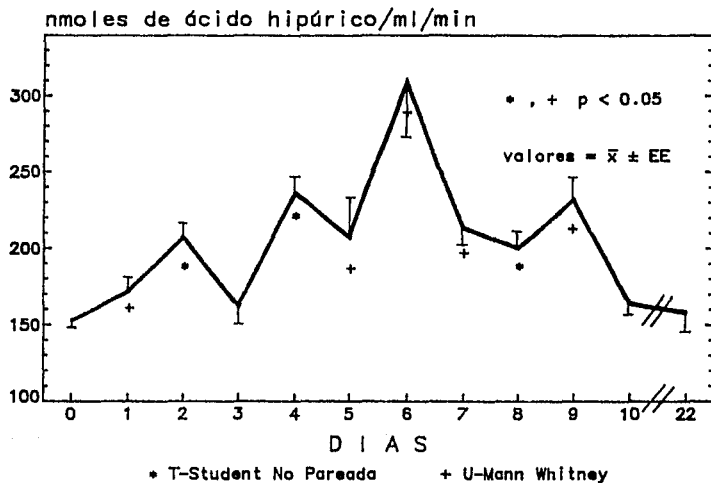


TABLA 13 ALDOSTERONA URINARIA (ng/24 h)

DIA	CONTROL	ANP	DIA	CONTROL	ANP
-2	18.3 ± 1.3	20.0 ± 8.5	10	22.9 ± 2.9	32.1 ± 4.9
-1	11.5 ± 1.5	18.3 ± 5.6	11	28.6 ± 4.1	26.1 ± 5.3
0	14.9 ± 1.5	19.3 ± 5.4	12	12.1 ± 1.5	16.6 ± 3.1
1	14.7 ± 1.7	15.3 ± 2.2	13	16.6 ± 3.9	20.7 ± 4.6
2	21.5 ± 2.3	47.8 ± 8.0+	14	25.5 ± 2.7	20.9 ± 4.2
3	13.8 ± 1.5	51.3 ± 14.8+	15	20.7 ± 2.5	20.8 ± 1.8
4	11.6 ± 1.8	43.7 ± 0.6*	16	29.9 ± 6.5	17.0 ± 5.2
5	50.0 ± 8.6	59.4 ± 15.8	17	22.5 ± 4.5	26.1 ± 10.5
6	32.6 ± 4.8	110.2 ± 27.2+	18	18.0 ± 3.0	19.2 ± 5.1
7	29.5 ± 1.1	176.8 ± 53.3+	19	24.0 ± 3.9	19.3 ± 3.9
8	8.7 ± 2.0	50.2 ± 24.6+	20	21.9 ± 3.3	23.5 ± 5.4
9	38.5 ± 7.4	34.2 ± 5.1	21	29.4 ± 2.7	26.5 ± 4.2

* p < 0.05 (T-Student No Pareada Bimarginal)

+ p < 0.05 (U-Mann Whitney corregida para empates)

TABLA 14.- ANDEVA DE MEDICIONES
REPETIDAS DE ALDOSTERONA URINARIA

hb

FUENTE DE VARIACION	SC	gl	CM	F	PROBABILIDAD
ENTRE GRUPOS	18771.597	23	816.156	5.11463	0.03349
DENTRO DE LOS GRUPOS	16614.952	24	692.289		
ENTRE MEDICIONES	3022.599	1	3022.599		
RESIDUAL	13592.353	23	590.971		
TOTAL	35386.550	47	752.905		

SC=SUMA DE CUADRADOS

gl=GRADOS DE LIBERTAD

CM=CUADRADOS MINIMOS

FIGURA 23.- ALDOSTERONA URINARIA

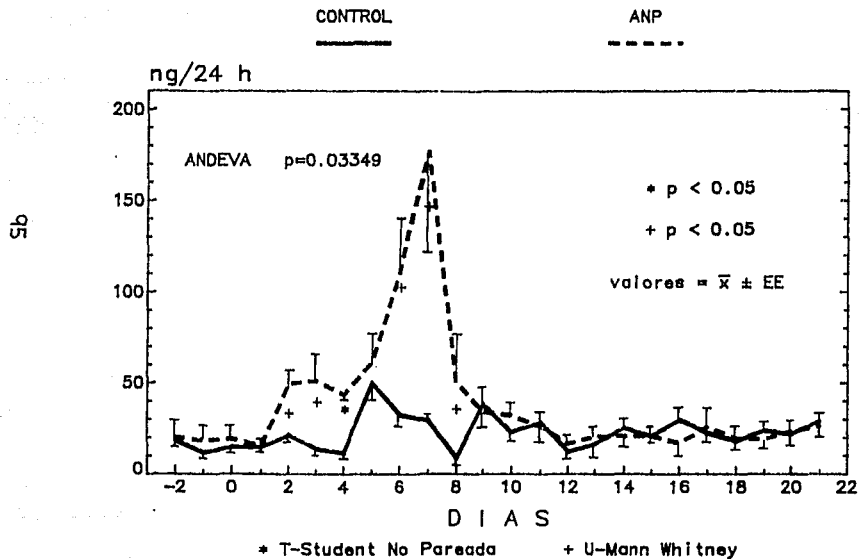


TABLA 15 ALDOSTERONA PLASMATICA

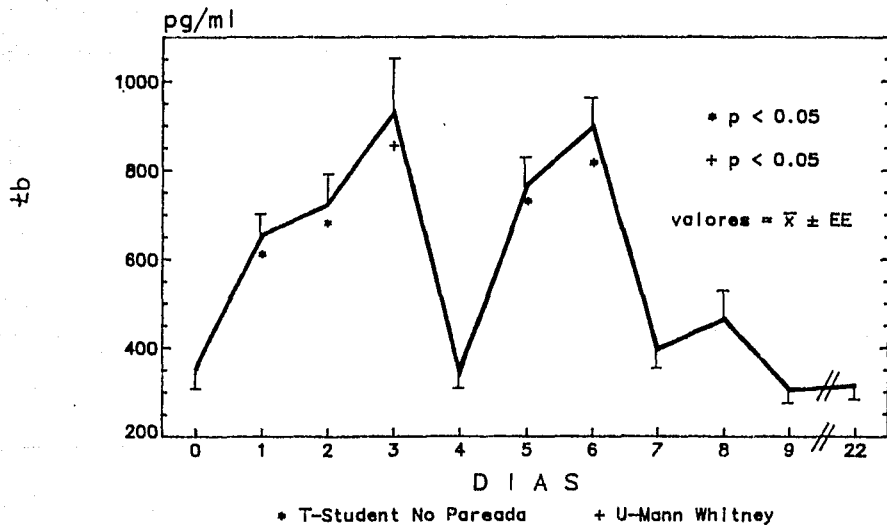
9b

DIA DE ESTUDIO	pg/ml	DIA DE ESTUDIO	pg/ml
0 (CONTROL)	352 ± 38	6	898 ± 58*
1	654 ± 43*	7	396 ± 34
2	723 ± 71*	8	465 ± 64
3	929 ± 117+	9	305 ± 29
4	346 ± 29	22	315 ± 27
5	767 ± 61*		

* $p < 0.05$ (T-Student No Pareada Bimarginal)

+ $p < 0.05$ (U-Mann Whitney corregida para empates)

FIGURA 24.- ALDOSTERONA PLASMÁTICA



V.- DISCUSSION

V.- DISCUSION

Partiendo de la base de que el modelo experimental de síndrome nefrótico inducido por el aminonucleósido de la puromicina ha sido usado ampliamente como un buen modelo de la contraparte humana de la enfermedad, se observa que la información obtenida en este modelo correlaciona con los hallazgos en pacientes (42,43). Este modelo nos permite seguir la evolución de la enfermedad pudiendo analizar el perfil de los parámetros en estudio. Lo anterior difícilmente se puede controlar en los pacientes nefróticos.

Se ha especulado mucho sobre el mecanismo por medio del cual el aminonucleósido de la puromicina produce el daño renal. Se han propuesto diversas teorías entre las que se encuentra la de Ryan y Karnovsky (77) que dicen que la proteinuria masiva se debe a una lesión de las células epiteliales glomerulares que da por resultado la pérdida de podocitos y aparición de defectos focales de la cubierta epitelial de la membrana basal glomerular. La lesión que observaron dichos autores era reversible, al igual que la observada por nosotros en el laboratorio (las proteínas tienden a desaparecer en la orina el día último del estudio).

Otros autores (78, 79) han observado defectos selectivos, tanto de carga como de tamaño en la barrera glomerular después de la administración del ANP. Hay discrepancias en cuanto a si hay

pérdida de sitios aniónicos de la membrana basal glomerular (80), sin embargo, Caulfield et. al. (47) demostraron que hay una reducción en la carga de la superficie de las células del epitelio glomerular de ratas tratadas con ANP y otros estudios (81) también demuestran una glucosilación defectuosa de la sialoproteína glomerular podocalixina que puede explicar el defecto selectivo de carga.

Diamond, Bonventre y Karnovsky (56) han estudiado recientemente la participación de los radicales libres del oxígeno en este modelo ya que la hipoxantina (intermediario del metabolismo del aminonucleósido de la puromicina al ser metabolizado por la xantina oxidasa genera radicales libres de oxígeno (iones superóxido) que pueden ser mediadores del daño renal. Dichos autores usaron un inhibidor de la xantina oxidasa, el alopurinol, y la enzima superóxido dismutasa que metaboliza los iones superóxido a peróxido de hidrógeno y observaron que protegían del daño renal. Estos hechos apoyan la participación de los radicales libres del oxígeno en el daño renal producido por el aminonucleósido de la puromicina.

El modelo experimental de síndrome nefrótico utilizado, fué valorado en estudios previos en nuestro laboratorio por la proteinuria, ascitis, edema, hipoproteinemia, hypoalbuminemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia observadas así como el aumento en la retención y disminución en la excreción de sodio.

La variación de peso de las ratas control fué prácticamente lineal no así en la ratas nefróticas que empezaron a perder peso inmediatamente (66). Estas últimas ratas mostraron un aumento de peso a partir del día 4 debido al incremento en la retención de líquidos (principio de ascitis) consecuencia de la disminución de proteínas séricas, y por lo tanto, de la presión oncótica. Cuando el volumen urinario aumentó mucho, la rata empezó a disminuir de peso. Una ganancia real de peso se tuvo cuando la proteinuria empezó a disminuir. La electroforesis de proteínas urinarias sobre acetato de celulosa, reveló que la albúmina era la proteína excretada en mayor proporción (38). La marcada hiperlipemia está asociada estrechamente con la disminución de proteínas séricas (66).

Con los datos antes mencionados se puede decir que el daño es reversible ya que la proteinuria desapareció en protocolos anteriores el día 21 de estudio y además la concentración de proteínas séricas también se normalizó. Lo mismo sucede con el sodio en orina y en suero.

Se observó que los componentes del SRAA que se alteraron volvieron a valores basales al final del estudio, y podría pensarse por ello que el daño es reversible.

En la actualidad no se ha podido atribuir a la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona el aumento de la retención de sodio en humanos bajo condiciones controladas (38, 59, 61). Por otro lado, los datos de la literatura sobre renina

en el síndrome nefrótico son muy contradictorios, ya que hay muchos trabajos que reportan valores altos, pero también un buen número encuentra valores bajos o normales. Es por eso que el papel del SRAA en la patogénesis del edema en el SN no está aún muy claro (60, 62, 82, 83).

En nuestro modelo experimental los resultados indican que el aumento temprano en la secreción de aldosterona y de enzima convertidora de A I pudiera ser el resultado de un efecto directo del ANP o alguno de sus metabolitos sobre las células que las sintetizan y almacenan, pero aún no se ha comprobado. No se sabe tampoco si el aumento de la secreción de enzima convertidora de A I y aldosterona son fenómenos simultáneos o si son consecuencia uno del otro. Lo más probable es que el aumento en la actividad de la enzima convertidora de A I que produce más A II cause un aumento de la secreción de aldosterona.

El aumento en la secreción de renina está asociado a una caída de las proteínas séricas y al principio de la proteinuria, lo cual produce una caída de la presión coloidosmótica y presumiblemente una disminución del volumen circulante que puede activar la secreción de renina a través del barorreceptor renal. Esto conducirá a la activación general del sistema y por lo tanto, a la retención de sodio y agua. El principio de la ascitis también está fuertemente asociado con la caída de proteínas séricas y la proteinuria.

El aumento de la secreción de renina se asocia a una intensa retención de sodio, lo que indica que la renina también está participando en dicha retención en nuestro modelo de SN, pero en una segunda etapa. Se puede también observar que cuando aumenta la excreción de sodio (día 8) se asocia a una disminución de la secreción de renina, aldosterona plasmática y urinaria y a un aumento del volumen urinario. La enzima convertidora de A I se normaliza hasta el día 10.

Otros factores, tales como los intrarrenales (84, 85) se han postulado como mediadores de la retención de sodio en este modelo. Ichihawa, et. al., usando ratas a las cuales habían perfundido solamente un riñón con ANP, demostraron que dicho riñón excretaba proteínas y tenía una reabsorción de sodio aumentada mientras que el riñón no perfundido excretaba sodio normalmente (86).

Actualmente se está valorando la participación de:

a) el sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome nefrótico usando un inhibidor específico de la enzima convertidora de A I, el captopril, para ver si teniendo inhibido el sistema a nivel de A II sigue habiendo retención de sodio, sobre todo en la fase temprana del estudio (día 2) (87),

b) los factores intrarrenales por medio de estudios de micropunción en ratas con SN producido por aminonucleósido de la puromicina (88),

c) los cambios de biosíntesis y niveles plasmáticos de

vasopresina en dicho modelo,

d) los cambios de los receptores adrenérgicos renales en la patogénesis de la retención de sodio y agua en el síndrome nefrótico y

e) el aminonucleósido de la puromicina y sus metabolitos en el daño renal utilizando el alopurinol que es un inhibidor de la xantina oxidasa (ver principio de la discusión).

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

La retención de sodio, la proteinuria, la hipoproteïnemia y la ascitis demuestran que el modelo experimental del cual se partió, es comparable al patrón clásico del síndrome nefrótico humano. El aumento del volumen urinario, como consecuencia de la disminución del líquido de ascitis, coincide con una alta proteinuria y un descenso en las proteínas séricas.

En lo que respecta a los componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona estudiados se puede concluir que:

a) En el síndrome nefrótico experimental inducido por el aminonucleósido de la puromicina hay alteraciones de dichos componentes.

b) La observación de la disminución de la concentración de angiotensinógeno reportada en este trabajo es congruente con las observaciones hechas en la mayoría de los pacientes nefróticos, aunque también hay reportes de pacientes con concentraciones normales o altas.

c) El aumento de la secreción de renina ocurre después del inicio de la retención de sodio.

d) Hay activación de la secreción de aldosterona y de la enzima convertidora de A I antes del aumento en la retención de

sodio y, por lo tanto, es independiente de la secreción de renina. Esta activación se asocia con la primera fase de retención de sodio, mientras que la activación general del sistema producido por el aumento de la secreción de renina puede mediar la segunda fase.

e) Se podría pensar que el aminonucleósido de la puromicina o sus metabolitos actúan directamente a nivel de las células que sintetizan y almacenan aldosterona y enzima convertidora de A I y que por eso se activan tempranamente.

f) Actualmente se está empleando un inhibidor específico de la enzima convertidora de A I para evitar así la producción del componente efector del sistema renina-angiotensina-aldosterona, A II, y probar o descartar así su participación en la retención de sodio.

g) Finalmente, se puede concluir que aunque hay cambios muy importantes en la secreción de renina (activación del SRAA), ésta no correlaciona con el aumento en la retención de sodio, por lo que seguramente están involucrados otros factores intrarrenales en dicho aumento.

VII.- BIBLIOGRAFIA

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- 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. Editado por R.L. Soffer. John Wiley and Sons, pp. 3-71, 1981.
- 2.- Hsueh, W.A. Compounds of the renin system. Am. J. Nephrol. 3: 109-117, 1983.
- 3.- Kageyama, R., Ohkubo, H. y Nakanishi, S. Primary structure of human proangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. Biochemistry 23: 3603-3609, 1984.
- 4.- Ohkubo, H., Kageyama, R., Ujihara, M., Hirose, T., Inayama, S. y Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2196-2200, 1983.
- 5.- Tewksbury, D.A. Angiotensinogen. En: Biochemical regulation of blood pressure. Editado por Richard L. Soffer. John Wiley and Sons, pp. 95-120, 1981.
- 6.- Muralami, E., Hiwada, K. y Kokubu, T. Effects of insulin and glucagon on production of renin substrate by the isolated rat liver. J. Endocrinol. 85: 151-153, 1980.
- 7.- Glauser, E., Bounnik, J., Cozy, E., Corvol, P. y Menard, J. Synthesis and release of immunoreactive angiotensinogen by rat liver slices. Endocrinology 112: 1188-1193, 1983.
- 8.- Murahami, E., Eggena, P., Barret, J. D. y Sambhi, M.P. Heterogeneity of renin substrate released from hepatocytes and in brain extracts. Life Sci. 34: 385-392, 1984.
- 9.- Campbell, D.J., Bounnik, J., Menard, J. y Corvol P. Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. Nature 308: 206-208, 1984.

- 10.- Nasjletti, A. y Masson, G.M.C. Stimulation of angiotensinogen formation by renin and angiotensins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 307-310, 1973.
- 11.- Dzau, V.J. y Herrmann, H.C. Hormonal regulation of angiotensinogen production. *Life Sci.* 30: 577-584, 1982.
- 12.- Campbell, D.J. y Boubnik, J. El angiotensinógeno. En: El sistema renina angiotensina. Editado por J.I.S. Robertson. Merck Sharp & Dohme Inc. pp 17-20, 1984.
- 13.- Pedraza-Chaverri, J. Influencia de la toxina pertussis sobre la función renal. I.- Efecto sobre la secreción de renina. Tesis doctoral. Facultad de Química. División de Estudios de Posgrado, UNAM. 1985.
- 14.- Feeton, T.K. y Campbell. The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32: 81-227, 1980.
- 15.- Murakami, K., Kogenyama, R., Hirose, S., Miyazaki, H., Imai, T., Hori, H., Hayashi, T., Ohkubo, N. y Nakamichi, S. Complementary DNA sequences of renin. State of the art review. *Hypertension* 6 (suppl 1): 1-95-1-100, 1984.
- 16.- Sealey, J. E. Biochemical aspects of plasma prorenin. En: Biochemical regulation of blood pressure. Editado por R. L. Soffer. John Wiley & Sons, pp 73-94, 1981.
- 17.- Diamond, D. H., Ross, L. J., Sciff, K.D. Increased renin activity after cold storage of human plasma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51: 705-708, 1973.
- 18.- Sealey, J. E., Atlas, S. A., Laragh, G. H. J. Plasma prorenin-physiological and biochemical characteristics. *Clin. Sci.* 63 (suppl 8): 133-145, 1982.
- 19.- Lever, S. F., Robertson, J. I. S., Tree, M. The assay of renin in rabbit plasma. En: Hormones and the Kidney. Memoirs of the Society for Endocrinology. Editado por Williams P. C. London & New York. Academic Press. Vol. 13 pp. 285-292, 1963.

- 20.- Lever, A. F., Robertson, J. I. S., Tree, M. The estimation of renin in plasma by an enzyme kinetic technique. *Biochem. J.* 91: 346-352, 1964.
- 21.- Boucher, R., Veyrat, R., de Champlain, J., Genest, J. New procedures for measurement of human plasma angiotensin and renin activity levels. *Can. Med. Assoc. J.*, 90: 194-201, 1964.
- 22.- Brown, J. J., Davies, D. L., Lever, A. F., Robertson, J. I. S., Tree, M., The estimation of renin in human plasma. *Biochem. J.* 93: 594-600, 1964.
- 23.- Brown, J. J., Lever, A. F., Robertson, J. I. S., Hodge, R. L., Lowe, R. D., Vane, J. R. Concurrent measurement of renin and angiotensin in the circulation of the dog. *Nature* 215: 853-855, 1967.
- 24.- Boyd, G. W., Adamson, A. R., Fitz, A. E., Peart, W. S. Radioimmunoassay determination of plasma-renin activity. *Lancet* i: 215-218, 1969.
- 25.- Haber, E., Koerner, T., Page, L. B., Kliman, B., Purnode, A. Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 1349-1355, 1969.
- 26.- Drau, V. J., Devine, D., Mudgett-Hunter, M., Kopelman, R. I., Barger, A. C., Haber, E. Antibodies as specific renin inhibitors: studies with polyclonal and monoclonal antibodies and Fab fragments. *Clin. Exp. Hypertension A* 5 (7 y 8): 1207-1220, 1983.
- 27.- Burton, J., Cody, R. J. Jr., Herd, J. A., Haber, E. Specific inhibition of renin by an angiotensinogen analog: studies in sodium depletion and renin-dependent hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5476-5479, 1980.
- 28.- Sleggs, L. T. Jr., Marsk, W. H., Kahn, J. R. y Shumay, N. P. The purification of hypertensin. *J. Exp. Med.* 100: 363-370, 1954.

- 29.- Peart, W. J. The isolation of a hypertensin. *Biochem. J.* 62: 520-527, 1956.
- 30.- Enzyme Nomenclature. International Union of Biochemistry. Academic Press. Inc. USA. p. 606, 1978.
- 31.- Soffer, R. L. Angiotensin-converting enzyme. En: *Biochemical regulation of blood pressure*. Editado por Richard L. Soffer. John Wiley & Sons; pp 123-164, 1981.
- 32.- Alhenc-Gelas, F., Weare, J. A., Johnson, R. L. Jr., Erdős, E. G. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J. Lab. Clin. Med.* 101: 83-96, 1983.
- 33.- Page, I. H. y Helmer, O. M. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* 71: 29-42, 1940.
- 34.- Braun-Menéndez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F. y Muñoz, J. M. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98: 283-298, 1940.
- 35.- Celio, M. R., Inagami, T. Angiotensin II immunoreactivity coexists with renin in the juxtaglomerular granular cells of the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3897-3900, 1981.
- 36.- Williams, G. H. y Dluhy, R. G. Control of aldosterone secretion. En: *Hypertension*. Editado por J. Genest, G. Kuchel, P. Hamet, M. Cantin. Mc. Graw-Hill, pp. 320-330, 1984.
- 37.- Best, J. B. Circulating angiotensin II and aldosterone levels during dietary sodium restriction. *Lancet* 18: 1353, 1971.
- 38.- Pedraza-Chaverri, J. Efecto de la disminución de la presión coloidosmótica sobre la biosíntesis de albúmina de rata. Tesis de Maestría, Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, UNAM, 1982.

39.- Brown, E. A., Markandu, N. D., Sasgnella, G.A., Jones, B.E., MacGregor, G.A. Lack of effect of captopril on the sodium retention of the nephrotic syndrome. *Nephron* 37: 43-48, 1984.

40.- Heyman, W. y Lund, H.Z. Nephrotic syndrome in rats. *Pediatrics* 7: 691-706, 1951.

41.- Drabkin, D.L., March, J.B. Metabolic channeling in experimental nephrosis. I.- Protein and carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.* 212: 623-631, 1955.

42.- Marsh, J.B., Drabkin, D.L. Metabolic channeling in experimental nephrosis. II.- Lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 212: 633-639, 1955.

43.- Frank, S., Antonowics, I., Craig, J.M. y Metcoff, J. Experimental nephrotic syndrome. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89: 424-427, 1955.

44.- Fiegelson, E.B., Drake, J.W. y Recant, L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 50: 437-446, 1957.

45.- Bertani, T., Foggi, A., Pozzoni, R., Delaini, F., Sacchi, G., Thoua, Y., Mecca, G., Remuzzi, G. y Donati, M.B. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab. Invest.* 46: 16-23, 1982.

46.- Morisaki, N., Matsuoka, N., Saito, Y. y Kumagai, A. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism* 33: 405-410, 1984.

47.- Caulfield, J.P., Farquahr, M.G. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 39: 505-512, 1978.

48.- Grund, J., Weening, J.J., Elema, J.D. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. *Lab. Invest.* 51: 277-285, 1984.

49.- Bertani, T., Cutillo, F., Zoja, C., Brogkini, M., Remuzzi, G. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int.* 30: 488-496, 1986.

50.- Bertani, T., Poggi, A., Pozzoni, R., Delaini, F., Sacchi, G., Thoua, Y., Mecca, G., Remuzzi, G., Donati, M.B. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Lab. Invest.* 46: 16-23, 1982.

51.- Fujiwara, Y. An ultrastructural study of the effect of the steroid in puromycin aminonucleoside nephrotic rats. *Virchows Arch (Pathol. Anat.)*, 405: 11-24, 1984.

52.- Mc. Vicar, M., Chandra, M. Pathogenic mechanism in the nephrotic syndrome of childhood. *Adv. Pediatr.* 32: 269-286, 1985.

53.- Misra, R.P. y Berman, L.B. Studies on glomerular basement membrane III.- Effects of steroid in membrane chemistry and its protein permeability. *Lab. Invest.* 26: 666-670, 1972.

54.- Bertani, T., Remuzzi, G., Rocchi, G., Delaini, F., Sacchi, G., Falchetti, M., Donati, M.B. Steroid and adriamycin nephrosis. *Appl. Pathol.* 2: 32-38, 1984.

55.- Caulfield, J.P., Reid, J.J. Farquhar, M.G. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 34: 43-59, 1976.

56.- Diamond, J.R., Bonventre, J.V., Karnovsky, M.J. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 29: 478-483, 1986.

57.- Marsh, J.B. Lipoprotein metabolism in experimental nephrosis. *J. Lipid Res.* 25: 1619-1623, 1984.

58.- Muls, E., Rossenew, M., Daneels, R., Schurgers, M., Boelaert, J. Lipoprotein distribution and composition in the human nephrotic syndrome. *Atherosclerosis* 54: 225-237, 1985.

59.- Brown, E.A., Markandu, N.D., Roulston, J.E., Jones, B.E., Squires, M., Mac Gregor, G.A. Is the renin-angiotensin-aldosterone system involved in the sodium retention of the nephrotic syndrome? *Nephron* 32: 102-107, 1982.

60.- Kumagai, H., Onoyama, K., Iseki, K., Omae, T. Role of renin-angiotensin-aldosterone on minimal change nephrotic syndrome. *Clin. Nephrol.* 23: 229-235, 1985.

61.- Dusing, R., Vetter, H., Kramer, H.J. The renin-angiotensin-aldosterone system in patients with nephrotic syndrome: effects of 1-Sar-8-Ala-Angiotensin II. *Nephron.* 25: 187-192, 1980.

62.- Boer, P., Ross, J.C., Geyskes, G.G., Dorhout Mees, E.J. Observations on plasma renin substrate in the nephrotic syndrome. *Nephron* 26: 121-125, 1980.

63.- Brown, E.A. The nephrotic syndrome. *Post. Med. J.* 61: 1057-1062, 1985.

64.- Bohlin, A. B., Berg, U. Renal water handling in minimal change nephrotic syndrome. *Int. J. Pediatr. Nephrol.* 5: 93-98, 1984.

65.- Chandra, M., Hoyer, J.R., Lowy, J.E. Renal function in rats with unilateral proteinuria produced by renal perfusion with aminonucleoside. *Pediatr. Res.* 15: 340-344, 1981.

66.- Uribe-Guapo, M. C. Estudio secuencial del síndrome nefrótico experimental inducido por el aminonucleosido de la puromicina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1988.

67.- Lúñiga-Estrada, A. Producción de reactivos para la determinación de angiotensina I humana por radioinmunoanálisis. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, 1986.

68.- Matsunaga, M., Suzuki, Y., Nakagawa, K., Wada, M. y Nishihata, S. Reexamination of the conditions for processing and storing of blood for plasma renin assay. *Clin. Chim. Acta* 154: 213-218, 1986.

69.- 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.

70.- Skelley, D. S., Brown, L.F., Besch, P.K. Radioimmunoassay. Clin. Chem. 2: 146-186, 1973.

71.- Skeggs, L.T. Jr., Kahn, J.R., Shumway, N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting-enzyme. J. Exp. Med. 103: 295-299, 1956.

72.- Sánchez-Espinoza. M.C. Preparación de anticuerpos contra A II y su uso en radioinmunoanálisis. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1988.

73.- Lieberman, J. Elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. Am. J. Med. 59: 365-372, 1975.

74.- Cushman, D.W. y Cheung, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting-enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20: 1637-1640, 1971.

75.- Ibarra-Rubio, M.E. Estudio comparativo de la actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4.15.1.) en diferentes especies de mamíferos y en ratas bajo diferentes estados fisiológicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1986.

76.- Nie, N.H., Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), 2nd. edition, Mc. Graw-Hill Book Company, USA, pp 675, 1975.

77.- Ryan, G.B. y Karnovsky, M.J. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. Kidney Int. 8: 219-232, 1975.

78.- Brenner, B.M., Hostetter, T.H., Humes, D. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. N. Eng. J. Med. 298: 826-833, 1978.

79.- Olson, J.L., Rennke, H.G. y Venkatchalam, M.A. Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. Lab. Invest. 44: 271-279, 1981.

80.- Fanwar, Y.S. y Jakubowski, J.L. Unaltered anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. Kidney Int. 25: 613-618, 1984.

81.- Merjaschi, D., Vernillo, A. y Farquhar, M.G. Reduced sialylation of podocalyxin, the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus in aminonucleoside nephrosis. Am. J. Pathol. 118: 343-349, 1985.

82.- Medina, A., Davies, D.L., Brown, J.J., Fraser, R., Lever, A.F., Mallick, N.P., Morton, J.J., Robertson, J.I.S. y Tree, M. A study of the renin-angiotensin system in the nephrotic syndrome. Nephron 12: 333-340, 1974.

83.- Hammond, T.G., Whitworth, J.A., Sasines, D., Thatcher, R., Andrews J. y Kincaid Smith, P. Renin-angiotensin-aldosterone system in nephrotic syndrome. Am. J. Kidney Dis. 4: 18-23, 1984.

84.- Kuroda, S., Aynedjian y Bank, N.A. Micropuncture study of renal sodium retention in nephrotic syndrome in rats: evidence for increased resistance to tubular fluid flow. Kidney Int. 16: 561-571, 1979.

85.- Brown, E. A., Marlandi, N., Sagnella, G.A., Jones, B.E., Mac Gregor, G.A. Sodium retention in nephrotic syndrome is due to an intrarenal defect: evidence for steroid-induced remission. Nephron. 39: 290-295, 1985.

86.- Ichikawa, I., Rennke, H.G., Hoyer, J.R., Badr, K.F., Schor, N., Froy, J. C., Lechene, C. P. y Brenner, B.M. Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. J. Clin. Invest. 71: 91-103, 1983.

87.- Cruz-Rivera, C. Efecto del captopril (SQ 14,225) sobre el desarrollo del síndrome nefrótico experimental en ratas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1983.

88.- Bobadilla, N., Tapia, E., Romero, L., Cermento, J. L., Pedraza, J., Gabbai-Laval, F. y Herrera-Acosta, J. Hemodinámica glomerular en ratas con síndrome nefrótico (SN) por aminonucleósido de la puromicina (ANP). Med. Int. de Mex. 2 (4): 76, 1986.