



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PREPARACION DE ANTICUERPOS
CONTRA ANGIOTENSINA II Y SU USO
EN RADIOINMUNOANALISIS”**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

Ma. del Carmen Cecilia Sánchez Espinosa



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINA
I. INTRODUCCION.....	1
1. BIOQUIMICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA...2	
1.1 COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.6	
1.1.1 ANGIOTENSINOGENO.....	6
1.1.2 RENINA.....	7
1.1.3 ANGIOTENSINA I.....	8
1.1.4 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.....	11
1.1.5 ANGIOTENSINA II.....	11
1.1.6 EL PAPEL DE LA ALDOSTERONA EN EL SISTEMA.....	11
2. RECEPTORES ADRENERGICOS.....	13
3. RADIOINMUNOANALISIS.....	14
3.1 FUNDAMENTO.....	16
3.2 TECNICA.....	20
3.3 MEDICION Y CALCULO DE RESULTADOS.....	21
3.4 METODOS DE MEDICION.....	23
4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS.....	26
4.1 PREPARACION DEL INMUNOGENO.....	28
4.2 VIA DE INDCULACION.....	30
4.3 SELECCION DE LAS ESPECIES ANIMALES.....	30
4.4 DOSIS.....	31
4.5 PARAMETROS IMPORTANTES EN EL RADIOINMUNOANALISIS....	33
II. OBJETIVOS.....	35
III. MATERIALES Y METODOS.....	37
1. MATERIALES.....	38
1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
1.2 MATERIAL DE VIDIRIERIA.....	38

1.3 REACTIVOS.....	38
1.4 EQUIPO.....	39
2. METODOS.....	40
2.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO.....	40
2.1.1 SINTESIS DEL INMUNOGENO.....	40
2.1.2 INMUNIZACION DE LOS CONEJOS.....	42
2.1.3 ESQUEMA DE INMUNIZACION.....	43
2.1.4 RADIOINMUNOANALISIS DE ANGIOTENSINA II.....	43
2.1.4.1 SOLUCIONES.....	43
2.1.4.2 PROTOCOLO.....	44
2.1.4.3 PROCEDIMIENTO DE SEPARACION.....	45
2.1.4.4 CALCULO DE RESULTADOS.....	46
2.1.5 DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA ANGIOTENSINA II.....	46
2.1.6 SANGRIA DE COSECHA.....	48
2.1.7 ALMACENAMIENTO DEL SUERO OBTENIDO.....	48
2.1.8 COLECCION DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE ANGIOTENSINA II.....	48
2.1.9 DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS DEL CONEJO NUMERO TRES.....	49
2.1.10 SENSIBILIDAD.....	52
2.1.11 ESPECIFICIDAD.....	52
2.1.12 PRUEBAS DE RECUPERACION.....	52
2.1.13 PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD INTRAENSAYO....	56
2.2 CUANTIFICACION DE ANGIOTENSINA II EN EL PLASMA DE RATAS CON ALTERACIONES EN EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.....	56

2.2.1 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA ACTIVADO.	56
2.2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA INHIBIDO.	57
2.2.3 METODOS USADOS PARA MEDIR OTROS COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.....	58
2.2.3.1 ACTIVIDAD PLASMATICA DE RENINA, CONCENTRACION PLASMATICA DE RENINA, CONCENTRACION PLASMATICA DE ANGIO- TENSINOGENO, SU MEDICION POR MEDIO DE RIA.....	58
2.2.3.2 ALDOSTERONA PLASMATICA.....	59
2.2.3.3 ACTIVIDAD SERICA DE LA ECA.....	61
2.2.3.4 ANALISIS ESTADISTICO.....	61
IV. RESULTADOS.....	63
V. DISCUSION.....	82
VI. CONCLUSIONES.....	92
VII. BIBLIOGRAFIA.....	94

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
Ala	Alanina
ANS	Acido β -anilino-1-naftalén sulfónico
APR	Actividad plasmática de renina
ASB	Albúmina sérica bovina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
CAPT	Captopril
Clo	Clonidina
CPA	Concentración plasmática de angiotensinógeno
CPALDO	Concentración plasmática de aldosterona
cpm	cuentas por minuto
CPR	Concentración plasmática de renina
°C	Grados centígrados
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EDC	Cloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
h	Horas
Ile	Isoleucina
Iso	Isoproterenol
M	Molar
ul	Microlitro

mg	Miligramo (s)
ml	Mililitro
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
pg	Picogramo
PM	Peso molecular
Pro	Propranolol
RIA	Radioinmunoanálisis
Ser	Serina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
Val	Valina

RESUMEN

El presente trabajo se diseñó para obtener anticuerpos contra el octapéptido angiotensina II y para estudiar la concentración de este octapéptido durante los cambios en la actividad del sistema renina angiotensina circulante.

La preparación del anticuerpo se realizó acoplando este péptido a diferentes proteínas de elevado peso molecular, utilizando carbodiimida. Las proteínas usadas fueron: tiroglobulina, albúmina sérica bovina, hemocianina y ovoalbúmina. El conjugado entre el péptido y las proteínas se emulsionó con adyuvante de Freund y se inyectó intradérmicamente en cinco sitios distintos a cada uno de los cinco conejos usados. El conejo tres produjo un anticuerpo adecuado para usarse en radioinmunoanálisis con un título de 1:10,000, una sensibilidad de 1.9 pg de angiotensina II y una especificidad adecuada para medir angiotensina II directamente en el plasma en especies tales como rata, ratón conejo y humano.

Por otra parte, después de caracterizar el anticuerpo se usaron estímulos para modificar la actividad del sistema renina angiotensina en ratas. Estos estímulos fueron: isoproterenol, clonidina, propranolol, captopril, anestesia con éter, deshidratación, binefrección, ligación ureteral y cloruro de sodio al 1 y 2% en el agua de beber. En el plasma de estas ratas se midió además de angiotensina II, la angiotensina I, la actividad de renina, la concentración de renina, de

angiotensinógeno y de aldosterona. En la ratas con captopril se midió la actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina II.

La anestesia, la deshidratación, el isoproterenol y el captopril aumentaron la renina y la angiotensina II, pero no la concentración de aldosterona. Por el contrario la binefrectomía, el cloruro de sodio al 2%, la clonidina y el propranolol disminuyeron la renina, la clonidina disminuyó la angiotensina II y la binefrectomía la aumentó. El cloruro de sodio al 1% no cambiaron la renina ni la angiotensina II, sin embargo la ligación ureteral y la binefrectomía aumentaron la concentración de aldosterona mientras que el cloruro de sodio al 2% la disminuyó. No con todos los estímulos hubo un cambio paralelo de la angiotensina II y la actividad del sistema renina angiotensina circulante. Esto puede ser explicado por cambios en la actividad del sistema renina angiotensina tisular, de otras enzimas no relacionadas con el sistema renina angiotensina que pueden producir angiotensina II, o por cambios en el catabolismo de la angiotensina II.

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

1. BIOQUIMICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) es un sistema hormonal importante que juega un papel central en el balance de líquidos y electrolitos y de la presión arterial.

Las moléculas que componen este sistema son:

I. Péptidos:

- a) Angiotensina I (AI)
- b) Angiotensina II (AII)
- c) Angiotensina III (AIII)

II. Enzimas:

- a) Renina
- b) Convertidora de angiotensina I (ECA)
- c) Angiotensinasas

III. Globulina alfa₂:

- a) Angiotensinógeno (sustrato de renina)

IV. Hormona esteroide:

- a) Aldosterona

La interrelación bioquímica de los componentes del SRAA se muestra en la Fig. 1.

La renina es una endoproteinasa altamente específica, cuyo peso molecular (PM) es de 40,000 daltones (d). Se sintetiza principalmente en las células yuxtáglomerulares de las arteriolas aferentes de los glomérulos.

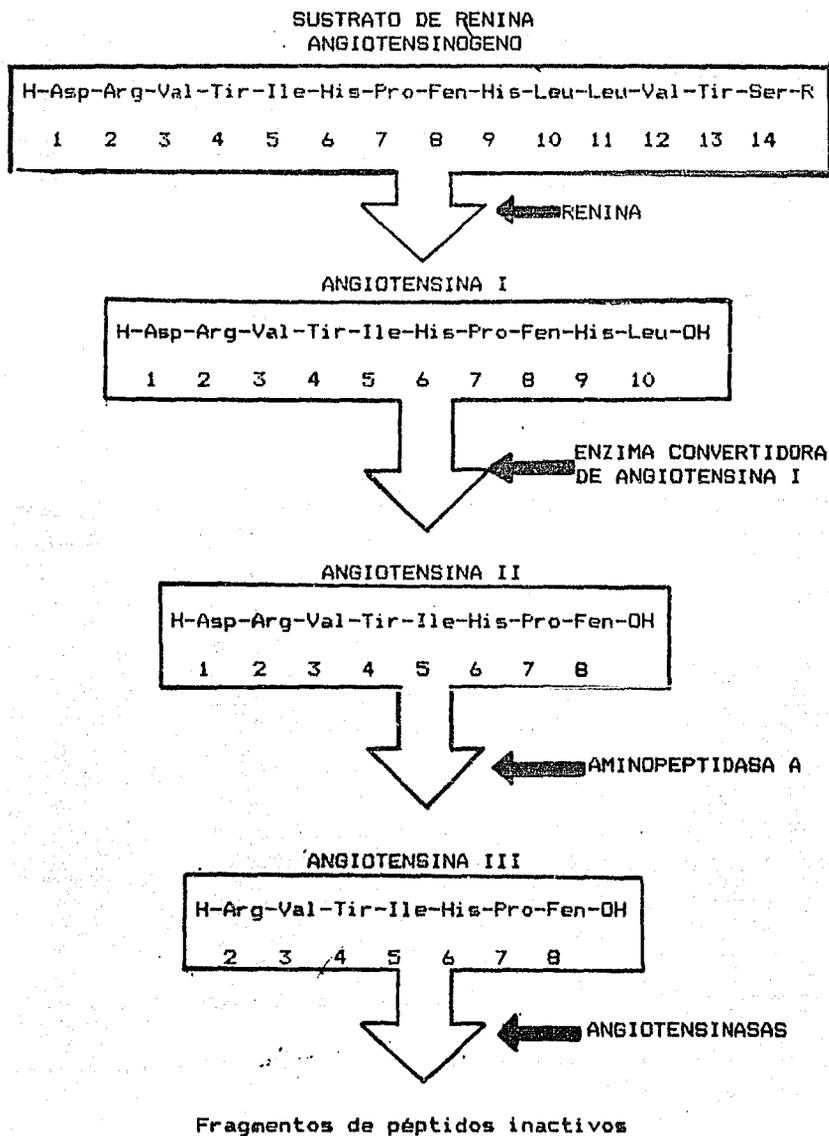


FIGURA 1. BIOQUIMICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

También se encuentra en el riñón una forma de renina inactiva (PM = 48,000 d) que puede ser activada por proteólisis limitada.

En el humano, tanto la forma activa como la inactiva de la renina, están presentes en la circulación y se han demostrado altas concentraciones de ambas formas de renina en el sistema venoso renal, ya que ambas formas son secretadas por el riñón (1).

Experimentos recientes de mapeo de péptidos han mostrado que existen extensas regiones de homología secuencial en las estructuras de renina activa e inactiva, indicando que la segunda puede ser precursora de la primera y por lo tanto análoga a los bien conocidos zimógenos, tales como el tripsinógeno y el pepsinógeno. En la circulación la renina hidroliza a su sustrato angiotensinógeno, para producir el decapeptido inactivo AI que es degradado a su vez por una peptidil dipéptido hidrolasa, la ECA para transformarse en el octapéptido vasoactivo AII.

La Fig. 2 muestra las principales acciones fisiológicas de la AII, el efector del SRAA. También muestra los lugares en donde actúan los inhibidores del SRAA. Los antagonistas de los receptores de AII, son análogos estructurales de este péptido. Estos compiten con la AII por los receptores periféricos vasculares. Un ejemplo de estos antagonistas es la saralazina, llamada así porque la sarcosina sustituye al Asp en la posición 1 y la Ala sustituye a la Fen en la posición 8. Los inhibidores de la ECA interrumpen la conversión de AI a AII. Un ejemplo de estos

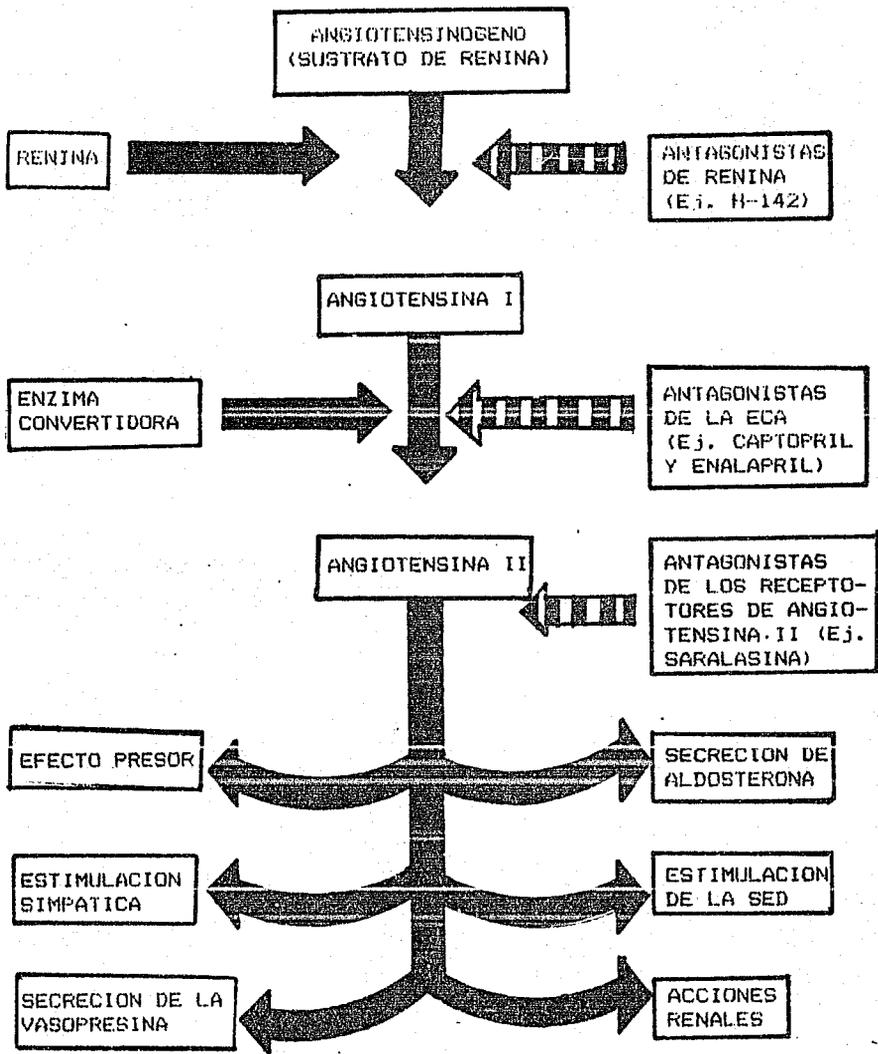


FIGURA 2. PRINCIPALES ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA ANGIOTENSINA II. LAS FLECHAS DISCONTINUAS REPRESENTAN LOS POSIBLES PUNTOS DE INHIBICIÓN DEL SISTEMA.

inhibidores es el veneno de la víbora Bothrops jararaca que contiene péptidos que inhiben la acción de la ECA. Los inhibidores de la renina previenen la formación de AI a partir del sustrato de renina. Haber y cols. (2) realizaron los primeros trabajos sobre inhibidores de la renina, ellos delinearon las cuatro clases principales de compuestos desarrollados como inhibidores de la renina (2-4):

- a) Anticuerpos específicos
- b) Inhibidores peptídicos de proteasas ácidas
- c) Péptidos relacionados a la secuencia amino terminal del precursor de la renina
- d) Análogos del sustrato de renina

Se ha demostrado que el compuesto H-142 es un inhibidor específico de la renina tanto in vivo como in vitro.

En el humano la renina rompe al sustrato angiotensinógeno entre las leucinas de las posiciones 10 y 11 para formar el decapeptido AI; la ECA libera el dipéptido His-Leu (residuos 9 y 10) de la AI para formar el octapéptido activo AII. Al liberarse el Asp de la posición 1 por acción de la aminopeptidasa A sobre la AII se forma el heptapéptido AIII.

1.1 COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

1.1.1 ANGIOTENSINOGENO

El angiotensinógeno (sustrato de renina) es una globulina alfa₂ que se sintetiza en el hígado de la rata como un precursor de 477 aminoácidos. El PM de la molécula completa, libre de

carbohidratos, es de 49,548 d. Su principal sitio de síntesis es el hígado, aunque hay evidencias que indican que también se puede sintetizar en el riñón y en el cerebro.

Se han hecho estudios donde se ha demostrado que los estrógenos, los glucocorticoides, la insulina, las prostaglandinas, la angiotensina II y la binefrectomía estimulan la secreción de angiotensinógeno. Por otro lado, también se ha demostrado que la tiroidectomía y la adrenalectomía disminuyen el nivel plasmático de angiotensinógeno (5-8).

1.1.2. RENINA

La fuente principal de renina es el riñón. La renina está localizada en gránulos en el citoplasma de la célula principalmente en la pared de las arterias glomerulares aferentes; ocasionalmente los gránulos pueden también encontrarse en la pared arteriolar aferente (Fig. 3). La renina es liberada de estos gránulos hacia la circulación y linfa renales.

El control de la secreción de renina es complejo. Hay tres grupos principales de mecanismos que influyen en la liberación de renina por el riñón:

- 1) Dos receptores intrarenales denominados receptores vasculares que se encuentran probablemente en la arteriola aferente y en la mácula densa.
- 2) Los nervios simpáticos renales
- 3) Una gran variedad de sustancias hormonales y humorales.

La renina plasmática, y por lo tanto la AII, aumentan por la

deprivación de sodio y disminuyen por la carga de sodio. La renina aumenta después de la pérdida de sangre (9-10).

Virtualmente todos los agentes antihipertensivos usados en la clínica modifican la concentración de renina y de AII en el plasma. Los diuréticos, los vasodilatadores y los antagonistas alfa adrenérgicos elevan la renina, mientras que los antagonistas beta adrenérgicos, la reserpina, la clonidina y la metil-dopa la disminuyen.

Se ha propuesto un modelo para la maduración y liberación de la renina humana. En el riñón primero se sintetiza como una molécula inactiva de alto PM (55,000 d) llamada prorenina, la cual se convierte en una forma activa con un PM de 44,000 d. La prorenina, probablemente es almacenada y procesada para convertirse en renina activa dentro de los gránulos secretores como lo muestra la Fig. 4 (11). Se ha sugerido que la renina producida por el tejido coriónico es secretada en forma de prorenina (11).

1.1.3. ANGIOTENSINA I

Skeggs y cols. (12) demostraron que la porción mínima del angiotensinógeno que puede servir como sustrato a la renina es un tetradecapéptido. La acción enzimática de la renina sobre este porción del sustrato produce la AI.

La AI es una prohormona decapeptídica que no tiene acciones biológicas conocidas y fisiológicamente es convertida al potente vasoconstrictor AII por acción de la ECA.

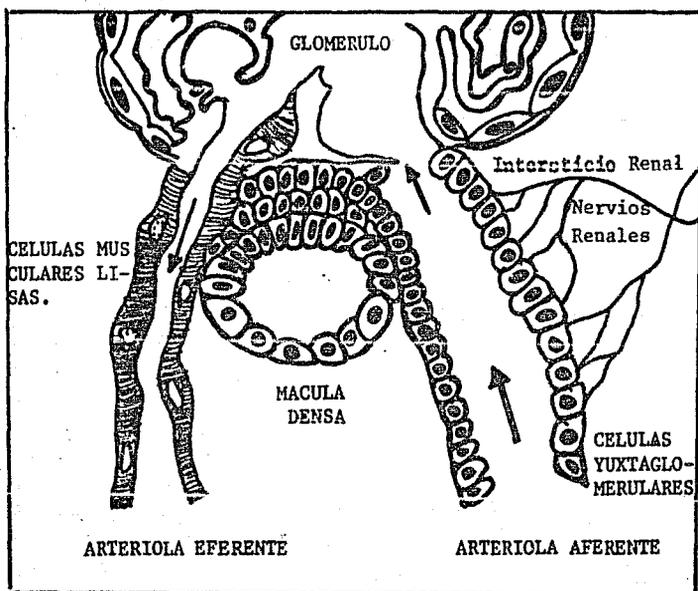


FIGURA 3 . DIAGRAMA DEL APARATO YUXTAGLOMERULAR. SE OBSERVA LA ESTRECHA RELACION EXISTENTE ENTRE LOS RECEPTORES INTRARENALES, LAS CELULAS CON TENEDORAS DE LA RENINA Y LA MACULA DENSA. LAS CELULAS YUXTAGLOMERULARES LIBERAN RENINA DENTRA DE LA LUZ DE LA ARTERIOLA AFERENTE Y EN LA LINFA RENAL (13).

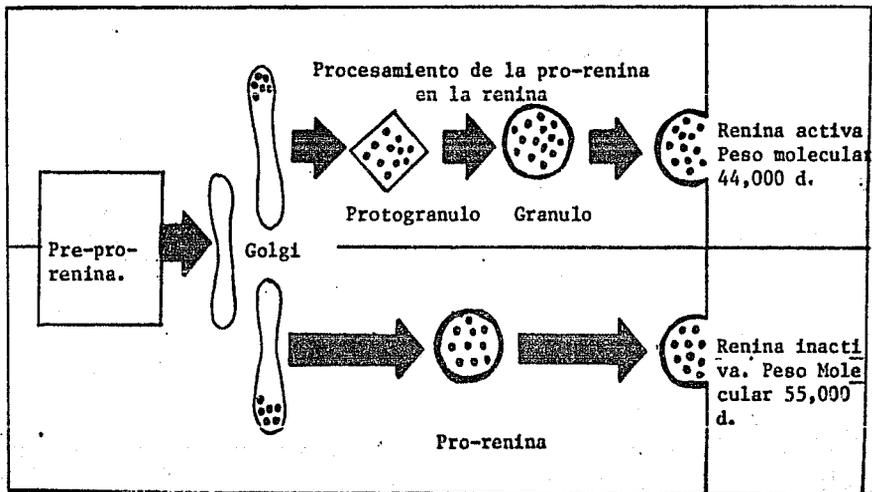


FIGURA 4. MODELO PARA LA LIBERACION Y MADURACION DE RENINA HUMANA. LA VIA 1 ES PREDOMINANTE EN LAS CELULAS DEL APARATO YUNTA GLOMERULAR EN TANTO QUE LA VIA 2 QUE IMPLICA EL PROCESAR PRO-RENINA INACTIVA PARA CONVERTIRLA A RENINA ACTIVA, Y ES PREDOMINANTE EN TEJIDO CORIONICO (13).

1.1.4. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA II

La ECA está ligada a la membrana plasmática de las células del endotelio vascular y especialmente en gran cantidad en los pulmones, pero también se encuentra en muchos otros tejidos como en las células renales epiteliales y en el cerebro. Fue descubierta en el plasma equino por Skeggs y cols. (14). su función fisiológica mejor conocida es convertir la AI en AII. También puede, de manera similar, activar la des-Asp-AI convirtiéndola en AIII.

La ECA juega un papel crítico en la circulación. Además de ser una enzima soluble en el plasma circulante, existe en los vasos como una ectoenzima, ligada a la membrana de las células endoteliales. La mayor parte de la conversión de la AI en AII ocurre sobre la superficie endotelial.

1.1.5. ANGIOTENSINA II

El octapéptido AII es el componente activo principal del SRAA. La vida media de la AII en la circulación es de 15 a 30 segundos. Las concentraciones de AII en el plasma venoso renal son alrededor de 20% más bajas que en el plasma arterial. Esto es debido a la diferencia arterio venosa de renina.

Las principales acciones fisiológicas de la AII están descritas en la Fig. 2.

1.1.6. EL PAPEL DE LA ALDOSTERONA EN EL SRAA

La aldosterona es una hormona esteroide con un PM de 360.4

d. La aldosterona es secretada por la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal y es un potente regulador de la excreción de sodio y potasio. La interacción de la aldosterona con sus receptores específicos induce la síntesis de ARNm, con la subsecuente formación de una proteína específica. El papel de esta proteína es controversial, pero puede facilitar la entrada de sodio a las células transportadoras o proveer a estas células con un aporte adicional de energía para realizar el transporte activo de sodio (reabsorción).

En el túbulo distal, la acción de la aldosterona se manifiesta por el incremento de la reabsorción de sodio y cloro desde el lumen tubular y un aumento en la secreción de potasio y iones hidrógeno hacia el lumen tubular.

La reabsorción de sodio y cloro tiende a aumentar la osmolalidad del fluido extracelular, lo cual estimula la secreción de vasopresina y esta a su vez facilita la conservación renal de agua.

El mecanismo regulatorio de la secreción de aldosterona responde a los cambios en la hidratación corporal. El SRAA es el mediador principal entre las variaciones hidricas y la respuesta adrenocortical (15).

Todas las condiciones que reducen el volumen del líquido extracelular aumentan la secreción de renina y la formación subsecuente de AII, la cual estimula la secreción de AII (Fig. 2 y referencia 15).

2. RECEPTORES ADRENERGICOS

Las hormonas adrenérgicas naturales y los agonistas sintéticos ejercen su acción a través de receptores específicos que están localizados en la membrana plasmática celular.

Estos receptores se han clasificado en dos tipos principales: los alfa y los beta. Adicionalmente hay dos subtipos para cada uno de estos: β_{1} , β_{2} , α_{1} y α_{2} (Fig. 5). Los dos primeros son isoreceptores, ya que están acoplados de una manera estimuladora a la adenilato ciclasa a través de la proteína Gs (G estimuladora). Cuando estos receptores son estimulados por hormonas adrenérgicas, se activa la adenilato ciclasa y se produce un aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc.

La subclasificación en β_{1} y β_{2} está dado por el orden de potencia de los agonistas naturales y sintéticos. Los receptores β_{1} son activados preferentemente por la norepinefrina liberada por los nervios simpáticos, mientras que los receptores β_{2} son activados preferentemente por la epinefrina liberada por la médula adrenal. El isoproterenol es un agonista beta sintético no específico, que es más potente que la epinefrina y la norepinefrina y que estimula la secreción de renina. Por el contrario el propranolol (antagonista beta adrenérgico no específico) inhibe la secreción de renina.

Los receptores α_{1} y α_{2} no son isoreceptores, ya que el mecanismo por medio del cual transducen su señal al interior de las células es diferente. La estimulación de los receptores α_{2}

inhibe a la adenilato ciclasa, con lo cual disminuyen las concentraciones intracelulares de AMPc. Este efecto es opuesto a la estimulación de los receptores beta adrenérgicos. Por otra parte la estimulación de los receptores alfa₁ produce un aumento en el recambio de un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol y un aumento en la concentración intracelular de calcio.

Los agonistas naturales y agonistas sintéticos para alfa₁ son la epinefrina y la fenilefrina, y para alfa₂ son la epinefrina y la clonidina. La clonidina inhibe la secreción de renina (16-18).

La estimulación de los receptores alfa₁ adrenérgicos aumentan la gluconeogénesis renal y regulan el tono vascular renal, mientras que la estimulación de los receptores alfa₂, además de inhibir la secreción de renina, modulan la reabsorción de sodio y agua en el túbulo proximal.

3. RADIOINMUNOANÁLISIS

El radioinmunoanálisis (RIA) es un método de alto grado de especificidad y sensibilidad. El método fué descrito por los doctores Yallow y Berson (19) en 1960, cuando reportaron los resultados sobre la determinación de insulina endógena en suero.

Antes de su desarrollo no se disponía de técnicas uniformes para determinar cuantitativamente muchas moléculas de importancia biológica en líquidos corporales y el intentar hacerlo resultaba un serio problema técnico dado que requería grandes cantidades

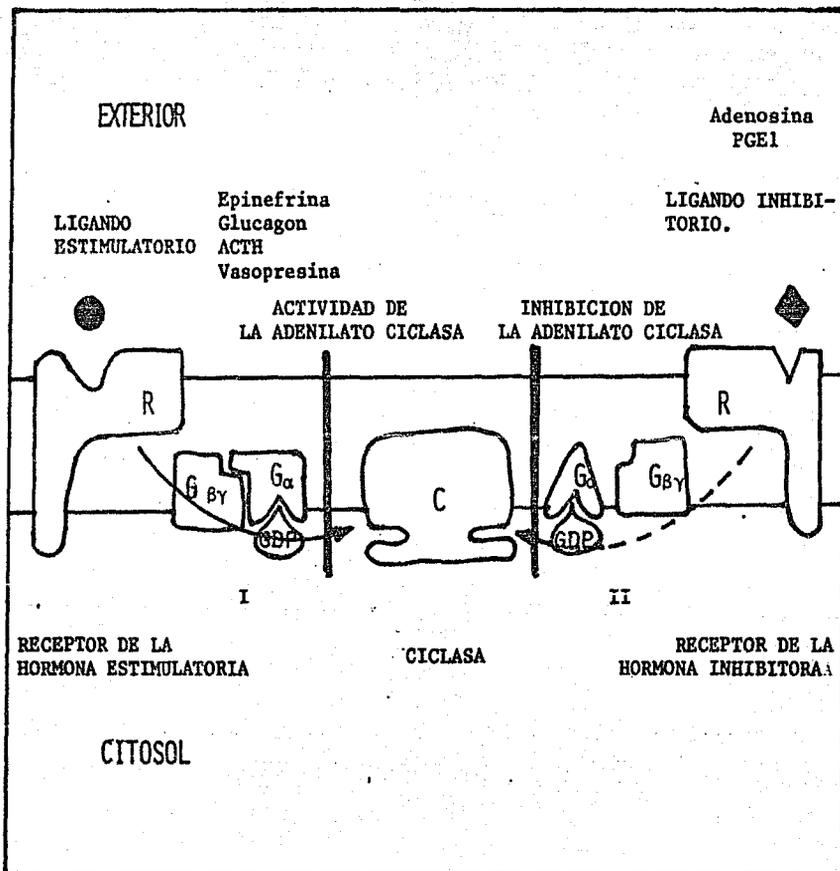


FIGURA 5. MODELO PARA LA ACTIVACION E INHIBICION DE LA ADENILATO CICLASA. I: COMPLEJO PROTEINA G ESTIMULATORIA. II: COMPLEJO PROTEINA G INHIBITORIA.

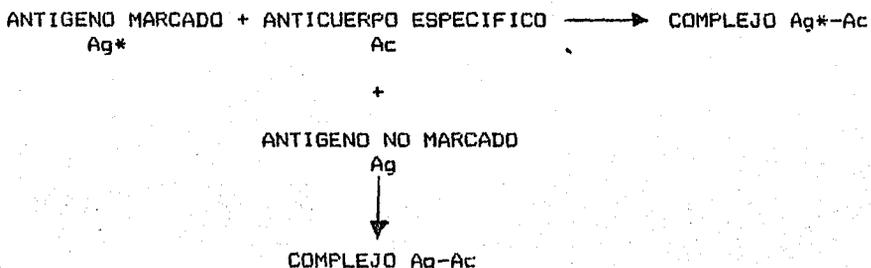
de muestra y los resultados obtenidos eran difíciles de reproducir. Generalmente se usaban métodos de bioensayo los cuales consisten en medir un efecto específico hormonal en un sistema vivo y la respuesta se compara con aquella producida por una preparación patrón de hormona.

Debido a la naturaleza del bioensayo era necesario asignar un sistema separado para cada hormona de modo que hubiese una especificidad adecuada con una sensibilidad suficientemente aguda para medir bajas concentraciones de hormona. Para llenar estos requisitos surgió el radioinmunoanálisis con el cual se pueden medir sustancias como: hormonas peptídicas, vitaminas, nucleótidos cíclicos, enzimas, proteínas séricas y drogas.

Desde el punto de vista práctico el RIA es un método que permite manejar cientos de muestras simultáneamente. De esta forma se han solucionado muchos problemas técnicos siendo considerado en la actualidad como una metodología rápida, exacta, reproducible y de manejo relativamente sencillo ya que requiere cantidades mínimas de muestra y reúne los atributos de alta sensibilidad y especificidad.

3.1 FUNDAMENTO

El RIA se define como un método analítico que combina la alta sensibilidad de los métodos radioquímicos con la sensibilidad de las reacciones inmuoquímicas basadas en la competencia de una hormona marcada (antígeno marcado, Ag*) y la hormona no marcada (antígeno no marcado, Ag) para unirse al anticuerpo específico (20).



Así, una muestra desconocida de antígeno no marcado se mezcla con una cantidad constante y conocida del mismo antígeno marcado radiactivamente. A esta mezcla se adiciona una cantidad constante de solución conteniendo anticuerpos preparados contra el antígeno que se va a medir. Es importante adicionar una cantidad limitante de anticuerpo (que una al 30-50% del Ag*) tal que el sistema esté en condiciones de exceso de antígeno. La cantidad de Ag* unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de Ag no marcado presente (Fig. 6).

En resumen, el RIA explota la habilidad de la hormona no marcada, presente en el plasma u otras soluciones, para competir con la hormona marcada por el anticuerpo. Como resultado de esta competencia, la cantidad de Ag* unido al anticuerpo disminuye conforme aumenta la cantidad de Ag no radiactivo (Fig 7).

La concentración de una muestra desconocida se obtiene por comparación de la inhibición observada en esa muestra, con aquella producida por una serie de soluciones patrón conteniendo cantidades conocidas de hormona.

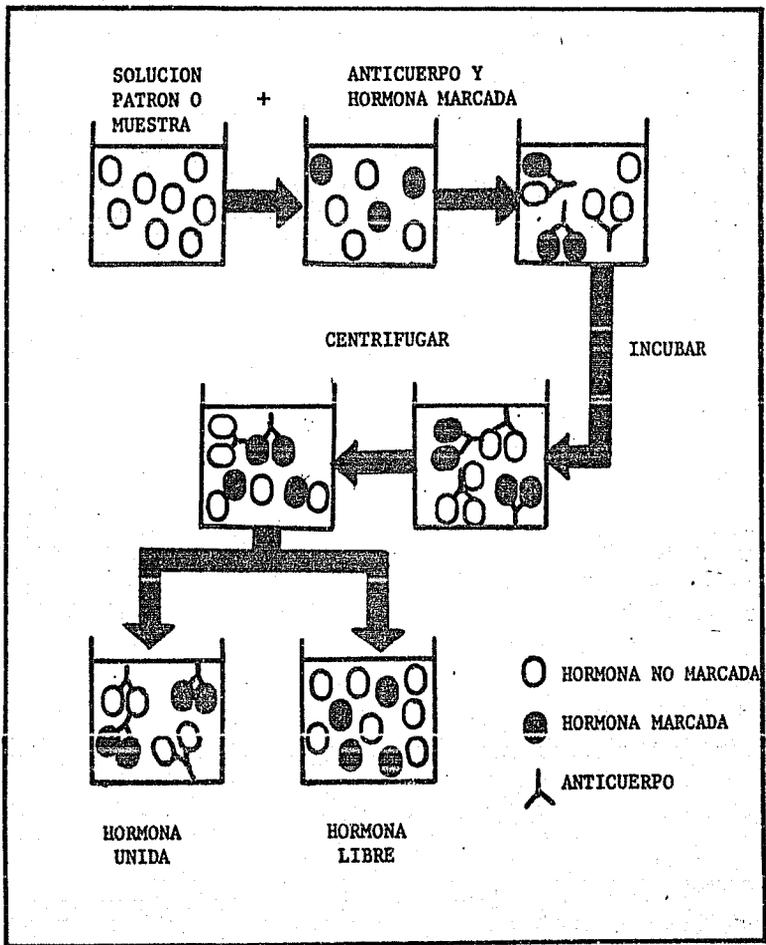


FIGURA 6. SE ILUSTRAN LOS PASOS DE RIA COMPETITIVO APLICADO A LA MEDICION DE LA HORMONA CIRCULANTE.

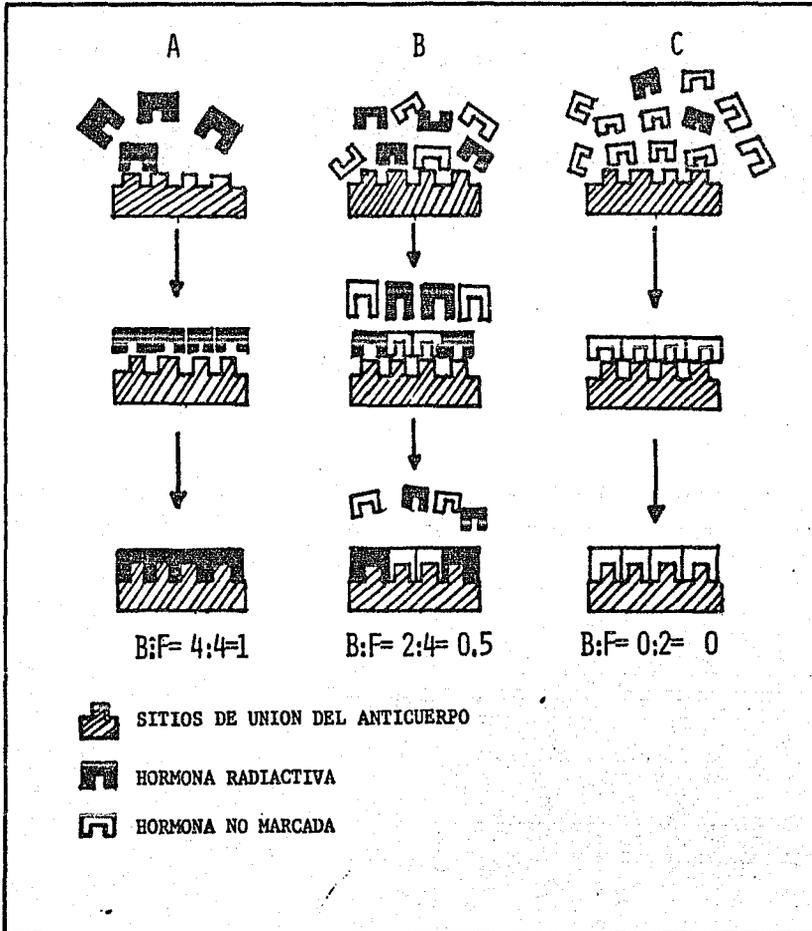


FIGURA 7. (A) UNION DE LA HORMONA RADIATIVA CON EL ANTICUERPO EN PRESENCIA DE UN NUMERO IGUAL DE MOLECULAS DE HORMONA MARCADA. (B) CUANDO SE ADICIONA SUFICIENTE ANTIGENO NO MARCADO PARA COMPETIR IGUALMENTE CON LA HORMONA MARCADA, LA RELACION B:F DISMINUYE A 0.5. SI LA MUESTRA ES RICA EN HORMONA NO MARCADA (C) TAL QUE LA CONCENTRACION DE LA HORMONA MARCADA ES DESPRECIABLE B:F SE APROXIMA A CERO.

Es posible medir cantidades de nanogramos, o menos, de una hormona específica en presencia de concentraciones millones de veces más altas de otras proteínas plasmáticas, lo que significa que este método es capaz de detectar cantidades traza de cualquier sustancia que pueda actuar como antígeno o hapteno. La resolución está limitada principalmente por la actividad específica del antígeno marcado radiactivamente y por la especificidad de la preparación del anticuerpo.

3.2 TECNICA

Una determinación de RIA comienza con la preparación de soluciones patrón que contengan cantidades conocidas del antígeno y muestras problemas en tubos de ensayo. Ya que el RIA se basa en una competencia, todos los tubos contienen cantidades constantes de anticuerpo y de antígeno radiactivo.

Para la curva patrón, se adicionan cantidades progresivamente mayores de antígeno no marcado. Esto da lugar a que en el mismo orden se presente una competencia cada vez mayor entre los antígenos para unirse al anticuerpo; así en los primeros tubos de la serie hay exceso de antígeno radiactivo por lo cual el resultado neto es la formación de complejos antígeno-anticuerpo en su mayoría radiactivos, mientras en los últimos tubos de la serie el antígeno no marcado es el que se encuentra en exceso y por lo tanto con mayor probabilidad de ganar los sitios afines del anticuerpo. Si se considera la inclusión de algunos tubos más a esta serie en los cuales la cantidad de antígeno no marcado es desconocida y se mantienen constantes

todos los demás parámetros entonces, se observa de inmediato la posibilidad de poder deducir la concentración del antígeno presente en dicha muestra por la cantidad de complejos Ag*-Ac que se forme.

Después de unas horas de incubación, las fracciones libre y unida de la hormona marcada se separan, para ello se debe contar con un método de separación de los complejos Ag-Ac, con objeto de poder medir la radiactividad contenida en ellos. Los métodos que han sido usados para tales fines incluyen electroforesis, cromatografía, intercambio iónico, precipitación química, carbón-dextrán, doble anticuerpo, anticuerpo unido a partículas de vidrio, anticuerpo unido a fase sólida y polietilenglicol (21-26).

3.3 MEDICION Y CALCULO DE RESULTADOS

Tomando en cuenta que prácticamente todos los métodos de RIA se llevan a cabo empleando curvas patrón, el cálculo de los resultados implica tan solo una adecuada interpolación de la muestra problema en la curva patrón.

Pasos a seguir en el cálculo de resultados:

1. Se cuentan los tubos.
2. Se resta la radiación del medio ambiente.
3. Se calcula el promedio de las cuentas por minuto (cpm).
4. Se calculan las cuentas netas promedio para los patrones y muestras sustrayendo el promedio de las cuentas de la unión no específica (blanco).

5. Se calcula la relación U/T
6. Se calcula la relación B/B_0
7. Se trazan las curvas patrón en papel semilogarítmico.
8. Se interpolan los datos de las muestras desconocidas.
9. Se corrigen las lecturas por el volumen total y/o la dilución empleada.

B_0 = Unión máxima. Es la cantidad de radiactividad máxima que puede unir el anticuerpo. Este dato se obtiene realizando la reacción $Ag^* - Ac$ en ausencia del Ag no radiactivo.

B_t = Cantidad total de radiactividad adicionada a cada tubo.

$U/T \times 100$ = Es la fracción de la radiactividad total que puede unir el anticuerpo, normalmente se encuentra en el rango de 30 a 50%.

$B/B_0 \times 100$. Es el cociente obtenido entre la radiactividad presente en cada tubo problema o patrón y la unión máxima. Este cociente se usa para realizar la interpolación en la curva patrón para calcular la concentración del problema.

CURVAS PATRON

Una vez obtenidos los datos de conteo radiactivo y calculado B/B_0 de las muestras patrón es posible trazar las gráficas de la curva patrón en varias formas:

Curva lineal: En este caso se traza en papel milimétrico normal con la cual se obtiene una gráfica como lo ilustra la figura 8. Una curva de este tipo, si bien es útil y muy empleada,

tiene el problema de que en sus extremos resulta muy difícil interpolar adecuadamente los datos problema. Debido a ello se han desarrollado otros métodos (27,28).

Curva semilogarítmica: Una forma de mejorar la sensibilidad de la curva patrón es trazarla semilogarítmicamente en forma similar a la que se representa en la figura 9. Esto da lugar a una curva más lineal ampliando con ello la zona de interpolación.

Curva logit-log: Este método es significativamente más complicado; consiste en trazar en una gráfica el logaritmo decimal de la concentración del antígeno no radiactivo contra el logit de los cocientes B/Bo (29-31). La fórmula para calcular el logit es:

$$\text{logit } (B/Bo) = \log \langle (B/Bo) / (1-B/Bo) \rangle$$

Con este método se logra una linealización total de la curva permitiendo una interpolación más exacta de los datos en toda la longitud, como se observa en la figura 10.

2.4 METODOS DE MEDICION

Dada la necesidad de contar radiactividad como parte del proceso de RIA, es conveniente conocer el principio funcional de los detectores de radiaciones gamma y beta.

Los contadores de centelleo sólido detectan radiaciones de tipo electromagnético que son emitidas por el núcleo de algunos isótopos inestables como resultado del acomodo posicional de los nucleones.

Los principales componentes de un detector de centelleo son:

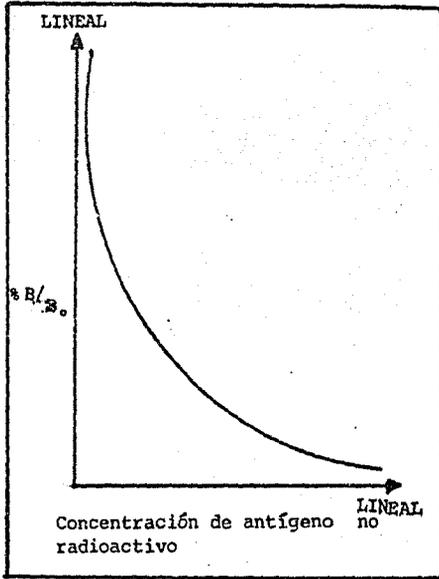


FIGURA 8 : CURVA LINEAL

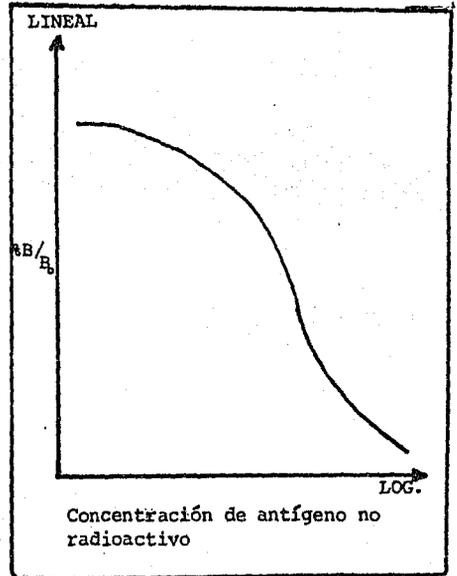


FIGURA 9: CURVA SEMILOGARITMICA

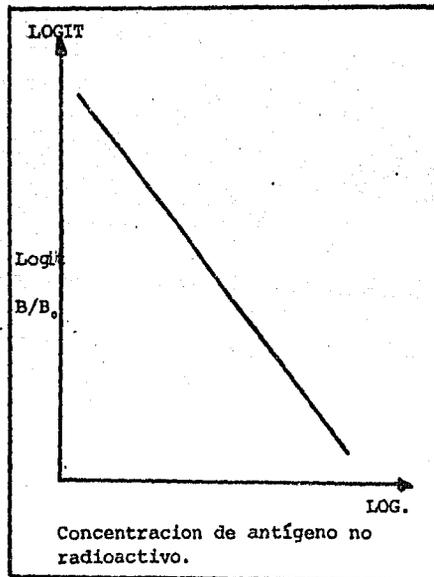


FIGURA 10 : CURVA LOGIT-LOG

el cristal de centelleo y el tubo fotomultiplicador. La muestra que va a contarse puede estar en solución o en forma de pastilla. Una vez que la muestra está bien introducida en el contador, queda colocada junto al cristal de yoduro de sodio; conteniendo cantidades muy pequeñas de cloruro de talio. Los rayos gamma emitidos pasan a través de la pared del tubo de ensayo y algunos de ellos chocan con el cristal transfiriéndole parte o toda su energía al electrón. Esta energía se transforma a su vez en un centelleo cuya intensidad es proporcional a la cantidad de energía perdida por el fotón de radiaciones gamma. La luz se desplaza a través del cristal de centelleo o al tubo fotomultiplicador adyacente donde es detectado. Los cristales de yoduro de sodio activado con talio son los mejores detectores de radiaciones gamma, sobre todo porque el número atómico del yodo es lo suficientemente elevado para facilitar una absorción fotoeléctrica eficaz y también porque la absorción de una cantidad determinada de energía produce la emisión de un centelleo más claro que otros detectores. Hay dos ventajas en el uso de un contador gamma, primero el tiempo requerido para acumular velocidades de conteo estadísticamente significativas es usualmente bastante pequeño, incrementando así el número de muestras que pueden ser procesadas por unidad de tiempo; segundo son menos complejos electrónicamente, no requieren el uso de frascos de centelleo (32-34).

Detectores beta de centelleo líquido: Una radiación beta es una partícula nuclear emitida por ciertos isótopos radiactivos y que no se puede diferenciar de un electrón en cuanto a masa y

carga eléctrica. En los contadores de centelleo líquido el principio de detección es similar al de los cristales de centelleo sólido, solo que en este caso se trata de un líquido centelleador el cual permite un contacto íntimo entre la muestra radiactiva y la solución centellante, permitiendo detectar a la radiación beta que es de menor energía, la solución normalmente está compuesta por uno o dos solventes orgánicos, acompañados de un detergente que hace que toda la solución sea miscible. La energía de las partículas beta emitidas se transfieren vía el disolvente al soluto primario y algunos al soluto secundario el cual emite entonces la energía como fotones de luz. Estos fotones se miden usando un fotomultiplicador (32-34).

4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS

El sistema inmune de muchos animales es extremadamente sensible, detectando hasta las mas, pequeñas trazas de contaminantes, por lo que es muy importante el paso inicial que consiste en la preparación del inmunógeno.

La interacción del inmunógeno con los linfocitos y macrófagos es importante en la respuesta inmune. Aunque los linfocitos están relacionados con la producción de inmunoglobulinas, el macrófago juega un papel en la regulación de la respuesta inmune, ya que aseguran la presentación a las células inmunocompetentes de antígenos parcialmente degradados. Si bien el macrófago no ejerce una función específica en el reconocimiento del antígeno que es una función de los linfocitos,

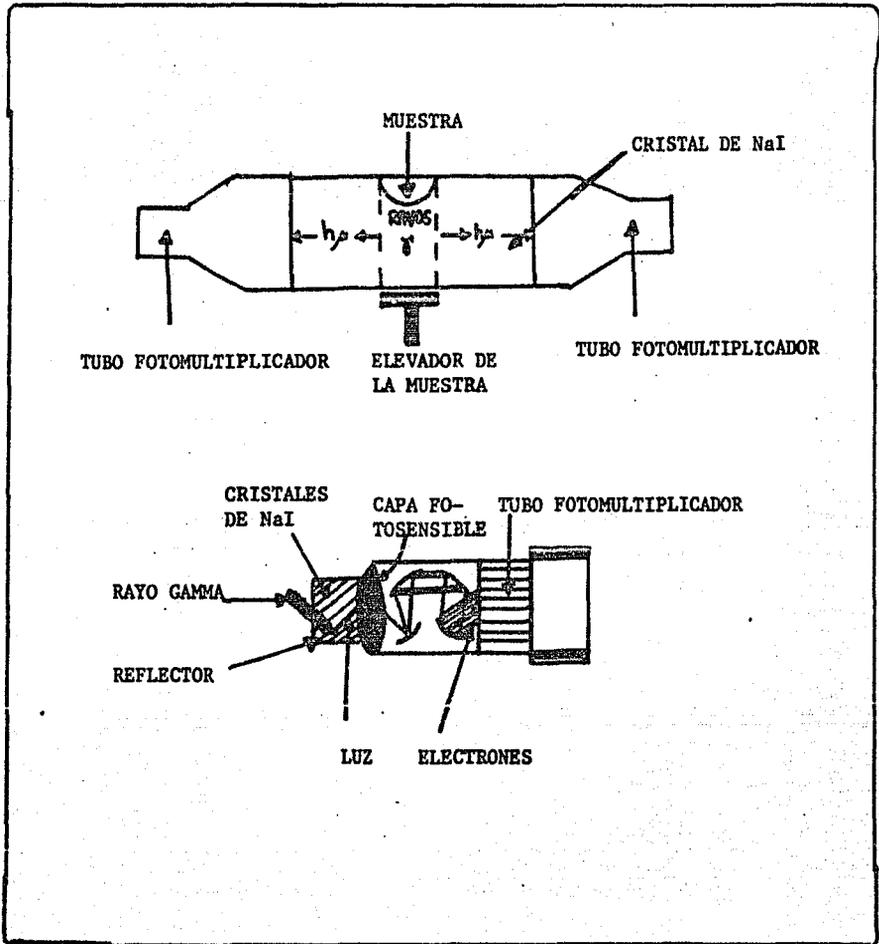


FIGURA 12. DIAGRAMAS ESQUEMATICOS QUE ILUSTRAN LA ORGANIZACION Y LA OPERACION DE LOS ELEMENTOS SENSIBLES A LAS RADIACIONES GAMMA DE UN CONTADOR DE CENTELLEO.

esta cooperación celular que realiza marca el inicio de la reacción inmunológica.

Bajo la influencia de los órganos linfoides centrales las células linfoides se hacen inmunocompetentes, es decir capaces de reaccionar con los diferentes antígenos que han sido presentados por los macrófagos. Para las células B el receptor responsable del reconocimiento del antígeno es una inmunoglobulina. Para las células T no se conoce con precisión la naturaleza de ese receptor. De esta forma los linfocitos B responsables de la reacción inmunológica de tipo humoral dan origen a las células secretoras de anticuerpos.

Los linfocitos T son los que originan las células sensibilizadas al antígeno que interviene en la reacción inmunológica de tipo celular, además de que interviene en la reacción humoral mediante fenómenos de cooperación celular entre linfocitos T y B. Los linfocitos T cooperan en la síntesis del anticuerpo frente a antígenos timo dependientes (linfocitos T auxiliares). Por otra parte, ciertos linfocitos T ejercen un control inhibiendo las respuestas inmunológicas humorales son los llamados linfocitos T supresores (36).

4.1 PREPARACION DEL INMUNOGENO

La potencia inmunológica de los antígenos solubles puede elevarse considerablemente si persisten dentro de los tejidos del animal experimental. Esto puede llevarse a cabo aplicando múltiples inyecciones del antígeno al animal durante cierto periodo de tiempo. Otro método es mediante el empleo de

adyuvantes. Este término se denota para cualquier sustancia que incrementa la respuesta inmune hacia el antígeno inyectado. Los geles inorgánicos, como el hidróxido o el fosfato de aluminio fueron los adyuvantes usados inicialmente; los inmunógenos se adsorben sobre su superficie y esta mezcla es la que se les inyecta a los animales. Posteriormente estos compuestos fueron reemplazados por los adyuvantes desarrollados por Freund, donde se forma una emulsión aceite-agua. Después de la inyección subcutánea o intramuscular de la emulsión estable se formarán pequeñas gotas las cuales se distribuyen desde el sitio de inyección. La emulsión estable produce muy baja liberación del inmunógeno, duradera en algunas ocasiones hasta varios meses.

El adyuvante completo de Freund contiene bacilos tuberculosos muertos y se usa generalmente para la primera inmunización; si se utiliza para las siguientes inyecciones puede producirse una intensa reacción granulomatosa en el sitio de inyección. Para las inyecciones posteriores se usa el adyuvante incompleto de Freund que contiene aceites, pero carece de los bacilos tuberculosos.

El uso de tales adyuvantes tiene dos propósitos fundamentales: primero, evita el rápido catabolismo del antígeno por lo que una exposición mas prolongada del antígeno incrementa la respuesta, y segundo la emulsión incrementa la exposición de los macrófagos al antígeno, ya que reaccionan al ser atraídos por el cuerpo extraño. La presencia de microorganismos muertos por el calor, en el adyuvante completo de Freund sirve generalmente para

estimular el sistema reticulo endotelial del animal, incrementando la respuesta de los macrófagos y promoviendo la actividad de las células T cooperadoras (33-36).

4.2 VIA DE INOCULACION

El objetivo principal que se persigue al inyectar el inmunógeno en un animal experimental es, de hecho, introducir el antígeno en un medio potencialmente rico en macrófagos. Las vías intramuscular, intradérmica y subcutánea satisfacen este objetivo.

La vía intravenosa minimiza su exposición a los macrófagos y tiende a incrementar la inducción de células T supresoras produciendo tolerancia inmunológica.

En muchos casos, en la primera inoculación usando adyuvante completo de Freund, la inyección intramuscular provee rápido acceso al sistema circulatorio linfático; las inyecciones secundarias en presencia de adyuvante incompleto pueden administrarse por vía intramuscular o subcutánea. Esta última es ventajosa ya que el antígeno se adsorbe lentamente minimizando la posibilidad de choque anafiláctico (33-36).

4.3 SELECCION DE LA ESPECIES ANIMALES.

Los animales generalmente usados en el laboratorio para la producción de anticuerpos son: conejos, cabras, cerdos, gallos, burros, caballos, pero los mas comunes son los conejos Nueva Zelanda jóvenes, principalmente cuando se requieren pequeñas cantidades de suero.

Si las preparaciones de anticuerpos que se van a estudiar requieren baja o mediana especificidad, se colectará el suero de un número de conejos inmunizados con la misma preparación. Es recomendable usar animales grandes dado que el estudio completo puede necesitar preparaciones de anticuerpos bien caracterizados obtenidos de preferencia de una sangría de cosecha. Así la obtención de sueros de alto título y alta afinidad para usarse en RIA puede depender, en cierto modo de la suerte en elegir una cepa animal genéticamente capaz de producir anticuerpos de alta afinidad contra la región antigénica de interés.

El título y la afinidad del anticuerpo varían ampliamente de animal a animal y generalmente solo un animal producirá un suero óptimo (33-36).

4.4 DOSIS

La dosis del antígeno tiene una influencia importante sobre la respuesta inmune en cuanto a la producción de anticuerpos. Después de aplicar la inyección inicial un gran número de linfocitos son capaces de producir inmunoglobulinas que reconocen el sitio antigénico de interés, pero solo un pequeño número de estos linfocitos está destinado a producir anticuerpos de alta afinidad. Para obtener un suero de alta afinidad, estas células deberán activarse selectivamente antes de replicarse. La replicación se inicia cuando una globulina receptora localizada sobre la superficie del linfocito se une al antígeno. Esta globulina receptora tiene el mismo sitio de reconocimiento antigénico que la globulina secretada por la clona de linfocitos.

Una pequeña dosis de antígeno proporcionará suficiente péptido para saturar las globulinas receptoras situadas en la superficie, solo de aquellos linfocitos destinados a producir globulinas de alta afinidad. Con dosis altas de antígeno, las células de alta y baja afinidad tendrán suficientes receptores de superficie ocupados para activarse. Por esto se recomienda usar una pequeña dosis de antígeno en la primera inmunización.

De la misma manera, si la primera dosis es pequeña para inducir títulos de anticuerpos detectables, puede disparar selectivamente la proliferación inicial de clones de alta afinidad las cuales responderán vigorosamente a las siguientes dosis del antígeno.

El intervalo de tiempo al cual se aplican las dosis de refuerzo puede tener efecto sobre la maduración de los anticuerpos; aunque el intervalo óptimo depende de la ruta de administración y adyuvante empleado, generalmente la práctica consiste en dar dosis de refuerzo solo después que el título ha alcanzado la cúspide de la curva y empieza a descender; usualmente son intervalos de cuatro semanas.

Dosis demasiado altas o demasiado bajas no inducen ninguna reacción inmunológica. La inyección de tales dosis más bien produce un animal refractario ante la inmunización posterior hecha con dosis normalmente inmunológica. Se ha provocado una parálisis inmunológica; es decir un estado de tolerancia frente a este antígeno (37).

4.5 PARAMETROS IMPORTANTES EN EL RADIOINMUNOANALISIS

La evaluación de un suero para usarse como reactivo en el RIA en forma óptima involucra la determinación de tres características básicas: título, sensibilidad y especificidad.

El primer paso a seguir en la evaluación del suero obtenido de animales inmunizados es examinar la presencia de anticuerpos. El título se determina incubando la hormona marcada con diferentes diluciones del suero que varían de 1:50 a 1:50,000, bajo condiciones similares a aquéllas planeadas para el RIA y se define como la dilución del suero a la cual se une el 50% de la hormona marcada. Generalmente los sueros con títulos de 1:1000 son de valor limitado. Los títulos de los sueros usados en RIA varían de 10^3 a 10^8 , como se puede ver, son mas altos que aquéllos reportados para otras técnicas inmunológicas. El título es función del número de moléculas de inmunoglobulinas presentes, de su afinidad para el antígeno y de la actividad específica del antígeno marcado.

Después de la determinación del título, la siguiente propiedad del suero a examinar es la sensibilidad. La sensibilidad es función de la afinidad y de la actividad específica del antígeno marcado. Una manera fácil de determinarlo consiste en probar concentraciones suficientemente bajas de la solución patrón, así la sensibilidad corresponde al límite de detección o sea la concentración mas baja de la solución patrón que está por encima del patrón cero (unión máxima).

El título y la sensibilidad están influenciados por las condiciones bajo las cuales se realiza el ensayo. Si suponemos que un pequeño péptido sintético se usa como antígeno y que el suero solo contiene anticuerpos dirigidos contra un solo sitio antigénico del péptido. A pesar de la aparente simplicidad de este sistema, estos anticuerpos son el producto de un gran número de clones de linfocitos, cada una con su propia afinidad para el antígeno. La afinidad y el título del suero de cierto animal, tienden a variar independientemente con el tiempo.

El primer paso en el procedimiento común para conocer la especificidad consiste en medir la capacidad de sustancias naturales relacionadas estructuralmente con la hormona, para desplazar el antígeno marcado en su unión con el anticuerpo. Si se presenta desplazamiento, el grado de reactividad cruzada se expresa generalmente como la razón entre la cantidad del antígeno a la cual el 50% de la hormona marcada está unida y la cantidad del análogo que presente reactividad cruzada a la cual se une el 50% de la hormona radiactiva.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Obtener anticuerpos contra angiotensina II.
2. Desarrollar la metodología y reactivos para medir la angiotensina II por RIA.
3. Determinar la concentración plasmática de angiotensina II durante alteraciones en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona circulante en ratas.

III. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIALES

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron 6 conejos machos (Oryctolagus cuniculus) raza Nueva Zelanda de 1.5 Kg para la producción de anticuerpos contra A II. También se usaron 90 ratas hembra de 200 a 250 g y 40 ratas macho (Rattus norvegicus) de 250 a 300 g cepa Wistar, para obtener el plasma para la determinación de A II. En estas ratas se produjeron alteraciones en el SRAA.

1.2 MATERIAL DE VIDRIERIA

Para el sangrado de los conejos y la obtención del suero, así como para la determinación de A II por RIA se usaron tubos de vidrio borosilicado "flint" (12 X 75 mm) (Fisher Scientific Co.). Esto es importante porque la A II se pega a las paredes del tubo de vidrio normal.

1.3 REACTIVOS

Los reactivos usados en el presente trabajo, obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), fueron: adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, albúmina sérica bovina fracción V, albúmina de huevo grado V (PM 40,000), albúmina sérica bovina grado RIA, acetato de angiotensina I secuencia humana (PM 1296), acetato de angiotensina II, secuencia humana (PM 1046), acetato de Des-Asp¹-angiotensina I (PM 1181.4), Val⁵-angiotensina I (PM 1282.5), Val⁵-angiotensina II (PM 1032.2), Asn¹,Val⁵-angiotensina II (PM 1031), Sar¹,Ala⁸-angiotensina II (PM 926.1), Sar¹,Gly⁸-angiotensina II (PM 1032.2), Sar¹,Ile⁸-

angiotensina II (PM 1028.2), Sar¹,Tre⁸-angiotensina II (PM 956.1), acetato de angiotensina III (Des-Asp¹-angiotensina II (PM 931.1), angiotensinógeno de plasma porcino, azida de sodio (PM 65), carbón activado, clonidina (PM 266.6), cloramina T (sal sódica de N-cloro-toluén sulfonamida), cloruro de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (PM 191.7), 2,3, dimercaptopropanol (dimercaprol, BAL) (PM 124.4), isoproterenol (PM 247.7), propranolol (PM 295.8), sulfato de de β-hidroxi-quinolina (PM 194.2), trizma base (hidroximetil amino metano) (PM 121.1), tiroglobulina tipo II porcina (PM 650,000), hemocianina de lapas monoplacóforas (PM 6 500,000), cloruro de hidroxilamina (PM 69.5), dextrans, grado clínico (PM 70,000).

El éter fue adquirido de Proquimed, la angiotensina II marcada con ¹²⁵I fue proporcionada por Amersham y el estuche para medir la aldosterona plasmática fue adquirido de International Cis (Francia).

1.4 EQUIPO

Agitador magnético Corning P-C353, balanza analítica Mettler H-15, balanza granataria Ohaus modelo 700, centrifuga refrigerada IEC PR-6000, contador de radiaciones gamma Gammacord II Ames, congelador Revco (-35°), decapitador de animales pequeños de Harvard Apparatus Co. (catálogo 55-0012), liofilizadoras Freeze Dryer B de Labconco y de Virtis Co., máquina para rasurar Oster modelo 22, micropipetas Oxford P-7000 (50, 100 y 200 ul), micropipetas Gilson (Rainin Instruments Co.) P-5000 (5 ml), P-1000 (1 ml), P-200 (0.2 ml) y P-20 (0.020 ml), jeringas

desechables de 5 y 10 ml con agujas del número 21 y de 1 ml con agujas del número 25, potenciómetro Orion Research modelo 601, Vortex de Scientific Products.

El material quirúrgico fue comprado a Hemost S.A. de C.V.

2. METODOS

2.1. OBTENCION Y CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO

2.1.1 SINTESIS DEL INMUNOGENO

Dado que la A II tiene un bajo PM y como tal no es inmunógena, fue necesario acoplarla a proteínas de elevado PM para hacerla antigénica. Las proteínas usadas para tal propósito fueron:

	PM
Albúmina de huevo	40,000
Albúmina sérica bovina	65,000
Tiroglobulina	650,000
Hemocianina	6 500,000

Para sintetizar el conjugado inmunogénico de A II y proteína, se usó carodiimida. La reacción que se llevó a cabo fue la siguiente (38):

2.1.2 INMUNIZACION DE LOS CONEJOS

Se inmunizaron 5 conejos y el conejo 6 no se inmunizó y sirvió como control. Con la finalidad de facilitar la localización del sitio de inoculación y de evitar infecciones se les rasuró el lomo. Las primeras inyecciones se aplicaron intradérmicamente en las regiones más cercanas al cuello, avanzando hacia la parte posterior del animal conforme al esquema de inmunización. Se realizó la asepsia de la zona de inoculación con etanol, antes de las inyecciones.

El inóculo o conjugado antigénico (4 ml) se emulsionó con un volumen igual de ACF o AIF según corresponda con el esquema de inmunización. Para tal fin se usó una jeringa de 10 ml con aguja del número 21 succionando el conjugado y el adyuvante, la completa emulsificación se obtuvo después de varios pasos sucesivos a través de la aguja de la jeringa. Una vez formada la emulsión lechosa y homogénea se consideró lista para inyectarse a los animales.

2.1.3 ESQUEMA DE INMUNIZACION (40)

- 1a. Inmunización: (A II + Tiroglobulina) + ACF
1 semana
- 2a. Inmunización: (A II + ASB) + AIF
1 semana
- 3a. Inmunización: (A II + Ovoalbúmina) + AIF
1 semana
- 4a. Inmunización: (A II + Tiroglobulina) + AIF
12 semanas
- 5a. Inmunización: (A II + Hemocianina) + ACF
10 días
- Sangría de prueba
7 días
- Sangría de cosecha

2.1.4 RADIOINMUNOANÁLISIS DE ANGIOTENSINA II

2.1.4.1 SOLUCIONES

A) Patrón:

Las soluciones patrón de A II, se obtuvieron por el método de Sealey (41). Se preparó una solución concentrada de A II (2 ng/ml) y se midió en alícuotas de 1 ml, las cuales se liofilizaron y se almacenaron a una temperatura de -20°C .

A partir de esta solución concentrada se hicieron diluciones seriadas para construir la curva patrón en tubos de vidrio borosilicado "flint" (12 X 75 mm) usando la solución

amortiguadora Tris-acetatos 0.1 M pH 7.4 con ASB al 5%. Las concentraciones usadas para la curva patrón fueron: 0.0157, 0.0321, 0.0625, 0.1250, 0.2500, 0.5000, 1.0000 y 2.0000 ng de A II/ ml, corriéndose cada una por cuadruplicado.

B) Anticuerpo

Se usó el anticuerpo producido por el conejo 3. Este se encuentra congelado en alícuotas de 0.9 ml y se lleva a 90 ml con el amortiguador de ensayo para tenerlo a la dilución requerida.

C) Amortiguador de ensayo

Se preparó el amortiguador de ensayo Tri-acetatos 50 mM, pH 7.4 con ASB al 0.3 %.

D) Radiactivo

El radiactivo usado fue: 3-(¹²⁵I)-iodotirosil⁴-A II (5 isoleucina). La actividad específica del radiactivo fue de 1169 Ci/mmol. La cantidad comprada (10 uCi) se diluyó a 100 ul de agua destilada y se separaron alícuotas de 12 ul. Las alícuotas se congelaron y al momento se diluyeron con 9 ml del amortiguador de ensayo para poner 50 ul en cada tubo del ensayo. El RIA se realizó en tubos de vidrio borosilicado "flint" (12 x 75 mm).

2.1.4.2 PROTOCOLO DEL RADIOINMUNOANALISIS

1. Las muestras de plasma congelado se descongelaron lentamente en un baño de agua a 4°C.
2. Todos los tubos de ensayo numerados y los reactivos se mantuvieron en un baño con hielo a 4°C durante la adición de los

reactivos.

3. Se numeró una serie de 44 tubos para cada curva patrón y 2 tubos por cada muestra, en los tubos correspondientes se adicionaron los siguientes reactivos: 500 ul de amortiguador tris-acetatos 50 mM + ASB al 0.3 % a los tubos cuentas totales, tubos unión no específica (blanco) y tubos unión máxima (100%); 100 ul de solución patrón de A II a los tubos de la curva patrón; 100 ul de la muestra a los tubos correspondientes; 50 ul de la solución de A II radiactiva a todos los tubos y 500 ul de anticuerpo en todos los tubos excepto en los tubos cuentas totales y tubos unión no específica.

4. Todos los tubos agitaron en vortex durante 2 a 5 segundos y se incubaron a 4°C durante 18 a 24 h.

2.1.4.3 PROCEDIMIENTO DE SEPARACION

1. Se preparó una suspensión de carbón-dextrán agregando 3 g de carbón y 0.3125 g de dextrán a 500 ml de amortiguador tris-acetatos 0.1 M, pH 7.4, colocándose en un baño con hielo a 4°C durante la preparación del mismo.

2. Se adicionó 1 ml del carbón-dextrán a todos los tubos, excepto a los que corresponden a las cuentas totales.

3. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min a 4°C (radio del rotor = 19.5 cm).

4. La fracción sobrenadante de cada tubo se decantó en tubos de ensayo numerados de la misma manera, solo que estos tubos son de vidrio normal de 12 X 75 mm. La A II unida al anticuerpo

permanece en el sobrenadante y la A II libre se absorbe sobre el carbón.

5. La radiactividad contenida en el sobrenadante se midió en un contador de radiaciones gamma.

2.1.4.4 CALCULO DE RESULTADOS

1. Se promediaron las cuentas por minuto (cpm) de los duplicados.
2. Se calcularon las cuentas netas promedio para los patrones y las muestras. Esto se logra restando la unión no específica (blanco) de la radiactividad contenida en cada tubo.
3. Se calculó el porcentaje de unión B/B₀ para cada muestra.
4. Se trazó la curva patrón usando papel logit-log y se determinó la concentración de A II para cada muestra interpolando en la gráfica.
5. Los resultados se expresan en pg/ml.

2.1.5 DETERMINACIÓN DEL TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA ANGIOTENSINA

II

Las determinaciones del título de los anticuerpos en el suero de los seis conejos se realizaron por el método de RIA para A II. La determinación se realizó en las siguientes diluciones del antisuero: 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ y 1:10⁶. Las diluciones del suero se hicieron con amortiguador Tris-acetatos 50 mM con ASB al 0.3% pH 7.4. Las determinaciones se hicieron por triplicado (Tabla I).

GRUPOS DE TUBOS	AMORTIGUADOR DE ENSAYO (ml)	ASB AL 5 % (ml)	ANTICUERPO (ml)	A II I ¹²⁵ (ml)	INCUBACION DE 18 A 24 HORAS A 4°C	SUSPENSION DE CARBON (ml)	MEDICION EN CONTADOR DEL TIPO GAMMACORD
CUENTAS TOTALES	1.5	-	-	0.05		1.0	
BLANCO	0.5	0.1	-	0.05		1.0	
DILUCIONES 1:10 1:10 ² 1:10 ³ 1:10 ⁴ 1:5x10 ⁴ 1:10 ⁵ 1:10 ⁶	-	0.1	0.5	0.05		1.0	

TABLA I EXHIBE EL PROTOCOLO USADO PARA DETERMINAR EL TITULO DEL ANTICUERPO DE TODOS LOS CONEJOS, PARA SELECCIONAR AQUEL DE MAYOR TITULO.

2.1.6 SANGRIA DE COSECHA

Una vez que se determinó el título de los anticuerpos para los 6 conejos, se seleccionó al conejo que presentó un mayor título y se le extrajo totalmente la sangre por punción cardíaca. el animal se colocó en una caja de contención y se anestesió al plano quirúrgico. El éter usado se retiró y el conejo se resauró. En el lado izquierdo del tórax se localizó por palpación, donde el bombeo se presentaba con mayor intensidad, el corazón. La aguja se introdujo lentamente en sentido horizontal hasta que se observó el flujo de sangre en la jeringa. Entonces se empezó a succionar suave y gradualmente con el émbolo hasta obtener toda la sangre.

2.1.7 ALMACENAMIENTO DEL SUERO OBTENIDO

El suero que se obtuvo del conejo # 3 se dividió en alícuotas de 1 y 5 ml en frascos con tapa de plástico de 10 ml y se liofilizaron. La liofilización es un método para concentrar solutos por medio de sublimación del agua que se encuentra congelada; bajo vacío, el agua se remueve de la solución congelada en forma de gas y se colecta en un condensador enfriado a -70°C .

2.1.8 COLECCION DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE ANGIOTENSINA

II.

Las muestras de sangre deben ser colectadas en tubos de vidrio borosilicado "flint" colocados en hielo y que contienen 0.1 ml de EDTA (250 mM) preparado en NaCl 0.85%, 0.050 ml de

dimercaprol (1.7%) que se preparó con benzoato de bencilo (3.3%) y disolviéndolo con aceite de cacahuete, y 0.050 ml de 8-hidroxiquinolina (6.6%). Estos reactivos son inhibidores de las angiotensinasas y protegen al péptido de estas enzimas presentes normalmente en la sangre. La sangre se centrifugó a 4°C durante 15 min a 2400 rpm (r = 20.6 cm). El plasma se separó y se congeló a -20°C hasta la determinación de A II.

2.1.9 DETERMINACION DEL TITULO DEL ANTICUERPO DEL CONEJO # 3

Realizada la sangría de cosecha del conejo seleccionado se midió por separado su título para verificar la información obtenida previamente. A partir de la solución concentrada del suero se hicieron diluciones seriadas del mismo usando el amortiguador tris-acetatos 50 mM pH 7.4 con ASB al 0.3%. Las diluciones fueron las siguientes: 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:2.5 X 10⁴, 1:5 X 10⁴, 1:7.5 X 10⁴, 1:10⁵, 1:2.5 X 10⁵ y 1:10⁶. Para esta determinación se usaron como antígenos radiactivos A I y A II. Las diluciones usadas fueron las mismas para ambos. El objeto de este experimento fue comparar la afinidad del anticuerpo por los antígenos. El protocolo se muestra en las figuras 2 y 3.

Los resultados obtenidos se procesaron de la misma manera como se ha descrito anteriormente para los demás conejos. La dilución que une el 50% de antígeno se eligió para realizar el resto de las determinaciones de A II.

GRUPOS DE TUBOS	BUFFER DE ENSAYO (ml)	ASB5% (ml)	MUESTRA DEL ANTICUERPO (ml)	A II I ¹²⁵ (ml)	INCUBACION DE 18 A 24 HORAS A 4°C	SUSPENSION DE CARBON (ml)	MEDICION EN CONTADOR DEL TIPO GAMMACORD
CT	1.5	-	-	0.05		1.0	
BK	0.5	0.1	-	0.05		1.0	
Dilución del anti cuerpo 1:10 1:100 1:1000 1:10000 1:25000 1:50000 1:75000 1:100 000 1:250 000 1:500 000 1:750 000	-	0.1	0.5	0.05		1.0	

TABLA II MUESTRA EL PROTOCOLO USADO PARA DETERMINAR EL TITULO DEL ANTICUERPO OBTENIDO DEL CONEJO NUMERO 3, USANDO COMO ANTIGENO A II Y SU RADIOACTIVO A II I¹²⁵. CT= CUENTAS TOTALES BK= BLANCO.

GRUPOS DE TUBOS	BUFFER ENSAYO ml	ASB 5% ml	ANTICUERPO	RADIOACTIVO AI I ¹²⁵	INCUBAR 18 - 24 HORAS A 4°C	CARBON ACTIVADO	MEDICION EN UN CONTADOR DEL TIPO GAMMACORD
CT	1.5	-	-	0.05		1.0	
BK	0.5	0.1	-	0.05		1.0	
MUESTRAS DILUCIONES SUERO							
1:10	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:20	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:40	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:80	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:100	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:200	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:300	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:500	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:1000	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:10 000	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:25 000	-	0.1	0.5	0.05	1.0		
1:50 000	-	0.1	0.5	0.05	1.0		

TABLA III MUESTRA EL PROTOCOLO USADO PARA LA DETERMINACION DEL TITULO DEL SUERO DEL CONEJO 3, USANDO COMO ANTIGENO AI Y SU RESPECTIVO RADIOACTIVO AI I¹²⁵. CT= CUENTAS TOTALES BK= BLANCO.

2.1.10 SENSIBILIDAD

Para determinar la sensibilidad del anticuerpo obtenido, se probaron concentraciones de A II menores de 0.1 ng/ml, la sensibilidad es el límite de detección del anticuerpo y se define como la cantidad mas pequeña que produce una disminución significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de cuentas totales unidas en ausencia de A II. Las diluciones de A II se hicieron en amortiguador Tris-acetatos 0.1 M pH 7.4 con ASB al 5%. El protocolo de las pruebas de sensibilidad se resume en la tabla IV.

2.1.11 ESPECIFICIDAD

Para examinar la especificidad del anticuerpo del conejo # 3 se probó la reactividad cruzada de A I y cinco de sus análogos y cinco análogos de la A II (figura 12).

De cada uno de los análogos se probaron las siguientes concentraciones: 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 500 y 1000 ng/ml. Estas soluciones se prepararon a partir de una solución concentrada (1 mg/10 ml). Las diluciones se prepararon con amortiguador tris-acetatos 0.1 M pH 7.4 con ASB al 5% y azida de sodio al 0.1 % (para impedir el crecimiento bacteriano). El protocolo se ilustra en la tabla V.

2.1.12 PRUEBAS DE RECUPERACION

Para verificar que efectivamente se podía medir la A II en el plasma de las ratas sin ninguna ineterferencia, se hicieron

TUBO	A II (ml)	BUFFER (ml)	ASB 5% (ml)	AII ¹²⁵ I (ml)	ANTICUERPO (ml)	INCUBAR A 4°C 18 horas	CARBON (ml)	CENTRIFUGAR Y MEDIR LA RADIOACTIVIDAD EN UN CONTADOR GAMMACORD
Cuentas totales	-	1.5	-	0.05	-		-	
Blanco	-	0.5	0.1	0.05	-		1.0	
A II (ng/ml)								
2.0000								
1.0000								
0.5000								
0.2500								
0.1250	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.6250								
0.0312								
0.0156								
0.0070								
0.0039								
0.0019								

TABLA IV PROTOCOLO USADO PARA LA DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE LOS ANTICUERPOS CONTRA A II POR RIA.

P E P T I D O |

E S T R U C T U R A P R I M A R I A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

ANGIOTENSINOGENO	ASP - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - FEN - HIS - LEU - LEU - VAL - TIR - SER - R
ANGIOTENSINA I	ASP - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - FEN - HIS - LEU
ANGIOTENSINA II	ASP - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - FEN
ANGIOTENSINA III	ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - FEN
[VAL ⁵] ANGIOTENSINA I	ASP - ARG - VAL - TIR - VAL - HIS - PRO - FEN - HIS - LEU
[Des-ASP ¹] ANGIOTENSINA I	ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - FEN - HIS - LEU
[VAL ⁵] ANGIOTENSINA II	ASP - ARG - VAL - TIR - VAL - HIS - PRO - FEN
[SAR ¹ , ALA ⁸] ANGIOTENSINA II	SAR - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - ALA
[SAR ¹ , GLI ⁸] ANGIOTENSINA II	SAR - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - GLI
[SAR ¹ , TIR ⁸] ANGIOTENSINA II	SAR - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - TIR
[SAR ¹ , ILE ⁸] ANGIOTENSINA II	SAR - ARG - VAL - TIR - ILE - HIS - PRO - ILE

FIGURA 12. ESTRUCTURA DE ANGIOTENSINA II Y DE LOS PEPTIDOS ANALOGOS DE ESTA, PARA VALORARLA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO CONTRA ANGIOTENSINA II OBTENIDO EN EL CONEJO 3.

GRUPOS DE TUBOS	BUFFER DE ENSAYO ml	ASB 5% ml	AC./AII ml	AII I ¹²⁵ ml	ESTANDARES ml	ANALOGOS ml	INCUBACION DE 18 A 24 HORAS A 4°C	SUSPENSION DE CARBON ml	MEDICION EN CONTADOR DEL TIPO GAMMACORD.
CT	1.5	-	-	0.05	-	-		1.0	
100%	-	0.1	0.5	0.05	-	-		1.0	
BK	0.5	0.1	-	0.05	-	-		1.0	
ESTANDARES 0.016, 0.031 0.062, 0.125 0.25, 0.50 1.0, y 2.0ng/ml	-	-	0.5	0.05	0.1	-		1.0	
ANALOGOS 0.15, 0.25 1.0, 2.5, 5.0 10, 50, 100 500 y 1000ng/ml	-	-	0.5	0.05	-	0.1		1.0	

TABLA V PROTOCOLO USADO PARA MEDIR LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO CON LOS ANALOGOS DE AI Y AII

pruebas de recuperación, que consistieron en adicionar una cantidad conocida de A II (se usaron soluciones de las empleadas para concntruir la curva patrón) a una mezcla de plasmas. Las cantidades usadas fueron: 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 ng de A II. A la cantidad medida se le restó el contenido endógeno de A II de la muestra, el cual se midió en el mismo ensayo, pero en tubos separados.

2.1.13 PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD INTRAENSAYO

Para conocer la variación de la determinación de A II por RIA se midió una misma muestra repetidas veces en el mismo ensayo. Después de calcular la media y la desviación patrón se obtuvo el coeficiente de variación.

2.2 CUANTIFICACION DE LA ANGIOTENSINA II EN EL PLASMA DE RATAS CON ALTERACIONES EN EL SRAA

2.2.1 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA ACTIVADO

A) RATAS TRATADAS CON ISOPROTERENOL. El isoproterenol es un agonista beta adrenérgico que aumenta la secreción de renina. A 10 ratas hembra de 200 g se les inyectó subcutáneamente una dosis de 10 ug/100 de peso; después de 30 min se obtuvo la sangre.

B) RATAS TRATADAS CON ANESTESIA. La anestesia estimula la secreción de renina, por intermedio principalmente de las catecolaminas. Se anestesiaron por inhalación con éter durante 5 min a 10 ratas hembra de 200 g.

C) RATAS DESHIDRATADAS. La deshidratación también estimula la secreción de renina. A 10 ratas hembra se les suprimió el

suministro de agua pero no de alimento durante 72 h.

D) RATAS INYECTADAS CON CAPTOPRIL.. El captopril inhibe la enzima convertidora de angiotensina I. A 10 ratas macho se les inyectó captopril a una dosis de 2 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal. Al final de una hora se sacrificaron por decapitación para coleccionar su sangre.

2.2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA INHIBIDO

A) RATAS TRATADAS CON CLONIDINA. La clonidina es un agonista alfa 2 que inhibe la secreción de renina. A 10 ratas hembra se les inyectó 100 ug/100 g de peso. Se dejaron por espacio de 30 minutos para que la droga tuviera efecto.

B) RATAS TRATADAS CON PROPRANOLOL. El propranolol es un antagonista beta adrenérgico que suprime la secreción de renina. A 10 ratas se les inyectó por vía subcutánea una dosis de 100 ug / 100 g de peso. Se permitió un tiempo de 30 minutos para la acción de la droga.

C) RATAS UREMICAS POR NEFRECTOMIA BILATERAL Y POR LIGACION URETERAL. Al grupo de 10 ratas con nefrectomía bilateral se les removió quirúrgicamente los dos riñones, mientras que el otro grupo de 10 ratas urémicas se les ligaron ambos uréteres. Las ratas de estos dos grupos se dejaron por espacio de 24 a 30 h.

D) RATAS CON SUMINISTRO DE CLORURO DE SODIO AL 1 Y AL 2%. Se colocaron a 20 ratas en sus respectivas jaulas y a un grupo (10 ratas) se les dió a beber NaCl al 1%, mientras que al otro grupo (10 ratas) se les dió a beber NaCl al 2%. Ambas soluciones se prepararon en agua destilada. El tratamiento fue de 5 a 10 días.

A las ratas de todos los modelos con el SRAA modificado, una vez pasado el tiempo de tratamiento, se decapitaron y la sangre se separó por centrifugación a 2400 rpm ($r = 20.6$ cm) por espacio de 15 min para obtener el plasma. La sangre usada para separar plasma se colectó en frío en tubos de ensayo de 12 X 75 mm de vidrio borosilicado "flint" conteniendo los inhibidores de las angiotensinasas previamente mencionados (sección 2.1.8). También se separó sangre colectada en los mismo tubos pero a temperatura ambiente. El plasma y el suero obtenidos sirvió para determinar posteriormente A II y los demás componentes del sistema.

2.2.3 METODOS USADOS PARA MEDIR OTROS COMPONENTES DEL SRAA

Para observar si en cada caso hubo o no algún efecto del tratamiento usado y ver si existe alguna correlación entre las variaciones que puedan presentar los demás componentes del SRAA y los niveles de A II, se midieron también APR, CPR, angiotensinógeno y aldosterona. La actividad de la ECA se midió solo a las ratas tratadas con captopril.

2.2.3.1 ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE RENINA, CONCENTRACION PLASMÁTICA DE RENINA, ANGIOTENSINOGENO. SU MEDICION POR MEDIO DE RIA.

La APR, la CPR y el angiotensinógeno se miden primero generando la muestra como lo ilustra la tabla VI. Estos componentes se midieron por RIA de A I. En la medición de APR se usó el sustrato endógeno y en la medición de CPR se adicionó un exceso de angiotensinógeno (plasma de ratas binefrectomizadas 24 horas antes), mientras que en la determinación de angiotensinógeno se adicionó un exceso de renina porcina. Las

muestras se incubaron a 37°C en presencia de EDTA, 8-OH-quinolina y dimercaprol (inhibidores de la ECA y de las angiotensinasas). Al final de este período la reacción enzimática se detuvo colocándo los tubos en hielo, y se procedió a realizar el RIA de A I. Una alícuota de las muestras (generalmente 0.1 ml) se incubó con cantidades constantes de anticuerpo y de A I radiactivo (aproximadamente 6000 cpm) a 4°C durante 18 a 24 h. Al final este período la radiactividad libre se separó de la radiactividad unida al anticuerpo con una solución de carbón al 0.6% con dextrán a 0.0625%. se contó el sobrenadante (radiactividad unida al anticuerpo). Se trazó una curva patrón graficando el logit de B/B_0 contra el logaritmo de la concentración del patrón usado (0.1 a 5.0 ng de A I/ml) (42).

2.2.3.2 ALDOSTERONA PLASMÁTICA

La aldosterona en el plasma de las ratas se midió por RIA directo. Se incubaron 0.1 ml de muestra con 0.7 ml del amortiguador de fosfatos y de la sal sódica del ácido 8 anilino-1 naftalén sulfónico. Se adicionó una cantidad constante de aldosterona radiactiva (aproximadamente 9000 cpm). El anticuerpo viene unido a los tubos. La incubación se realizó a 4°C de 18 a 24 h. Los tubos se decantaron, se enjuagaron y se contó la radiactividad unida al tubo. Se trazó una gráfica logi-log similar a la usada para el RIA de A II o de A I. Los patrones usados fueron de 50 a 1000 pg/ml.

	MUESTRA (ml)	6.6% 8 HIDROXI QUINOLEINA	1.7% DIMERCAPROL (ml)	BUFFER MALEATOS 0.2 M	SUSTRATO	250mM EDTA, RENINA (ml)	(ml)
ACTIVIDAD PLASMATICA DE RENINA	0.3	0.005	0.005	0.6	-	-	-
CONCENTRACION PLASMATICA DE RENINA	0.05	0.005	0.005	1.0	0.450	-	-
ANGIOTENSI GENO	0.025	0.005	0.005	0.360	-	0.005	0.005
MEDICION POR RIA DESPUES DE UNA HORA							

TABLA VI PROCEDIMIENTO USADO PARA GENERAR LAS MUESTRAS PARA APR,
CPR Y ANGIOTENSINOGENO DE ACUERDO A A.ZURIGA (42).

2.2.3.3 ACTIVIDAD SERICA DE LA ECA

La medición se realizó de acuerdo a Ibarra-Rubio (50). Es un método espectrofotométrico basado en la producción de ácido hipúrico por acción de la ECA sobre el sustrato sintético hipurato de histidil leucina. Los resultados se expresan en nanomoles de ácido hipúrico /ml de suero/min de incubación.

2.2.3.4 ANALISIS ESTADISTICO

Para la comparación de los valores de A I, A II, APR, CPR, angiotensinógeno y aldosterona obtenidos del plasma de las ratas con alteraciones del SRAA se usaron las siguientes pruebas estadísticas.

Cada una de las variables medidas se analizó por separado. Los datos de cada variable encontrados para todos los grupos se analizaron por análisis de varianza por rangos de una clasificación de Kruskal-Wallis, ya que al realizar la prueba de Bartlett (para saber si las varianzas eran homogéneas) se encontró en todos los casos que las varianzas no eran homogéneas. Si esta prueba es significativa nos indica que al menos hay un grupo diferente y se aplica una prueba de comparación simultánea. Todos los grupos experimentales se compararon contra el control. En este caso se usó la prueba descrita por Hollander & Wolfe (51) para comparaciones de tipo no paramétrico cuya fórmula es la siguiente:

$$|R_c - R_x| \geq [Z_{\alpha/2}(k-1)] [N(N+1)/12]^{1/2} [1/n_c + 1/n_x]^{1/2}$$

donde:

R_c = promedio de rangos del grupo control

R_x = promedio de rangos del grupo experimental

Z = Valor encontrado en la tabla de dos colas tomando en cuenta el grado de significancia (α) a usar, 0.05, y el número de grupos (k) involucrados en las comparaciones. Este valor aumenta cuando aumenta el número de comparaciones.

N = Número total de datos, sumando todos los grupos involucrados.

n_c = Número de datos del grupo control.

n_x = Número de datos del grupo experimental.

Si la diferencia de rangos del grupo control y experimental supera al valor obtenido de la parte derecha de la ecuación se concluye que ambos grupos son estadísticamente diferentes al nivel de significancia de 0.05.

La prueba de Bartlett y el análisis de varianza de Kruskal-Wallis se realizaron en una calculadora HP 41-CV.

IV RESULTADOS

RESULTADOS

De los conejos inmunizados solo uno respondió con un buen título. El título del anticuerpo fue determinado por medio de RIA. El título es la dilución a la cual el anticuerpo une el 50% del antígeno. El título de los anticuerpos obtenido en la sangría de prueba se muestra en la Tabla VII y en la Figura 13.

TABLA VII. TITULO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA ANGIOTENSINA II.

CONEJO	TITULO
1	1.7×10^2
2	6.0×10^3
3	1.5×10^5
4	1.5×10^3
5	5.0×10^3
6	N.D.

N.D. = NO DETECTADO

El conejo #3 es el que presentó un mayor título y que se sacrificó para obtener su suero. El antisuero se almacenó en alícuotas de 0.1 y 0.5 ml las cuales se liofilizaron y se almacenaron a -20°C .

Una vez que se sacrificó el conejo # 3 se midió nuevamente su título. La sangre se obtuvo por punción cardíaca y se encontró entonces que el título real era de 1:10,000 como lo muestra la Figura 14.

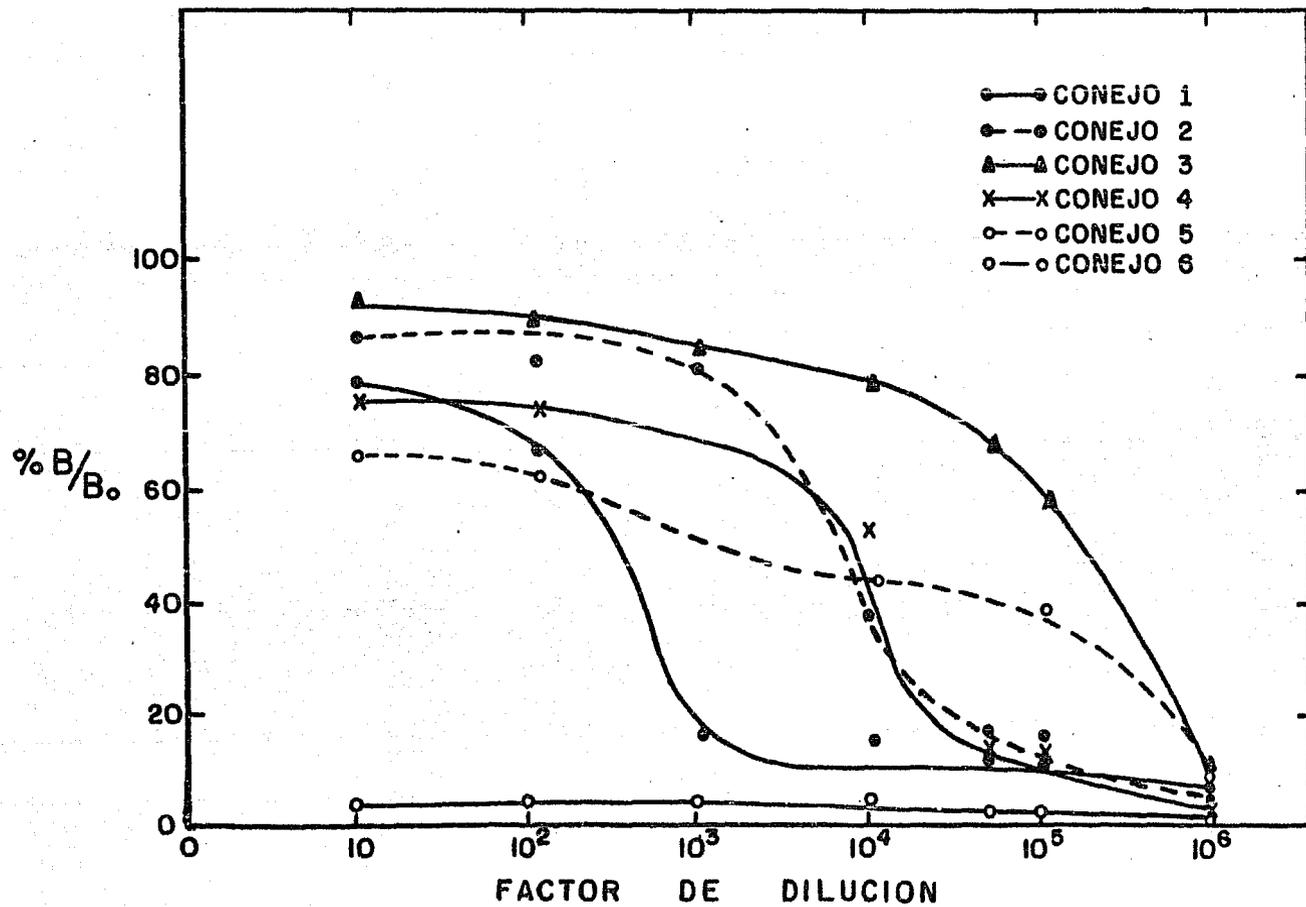


FIGURA 13 . DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA ANGIOTENSINA II OBTENIDOS EN LA SANGRIA DE PRUEBA .

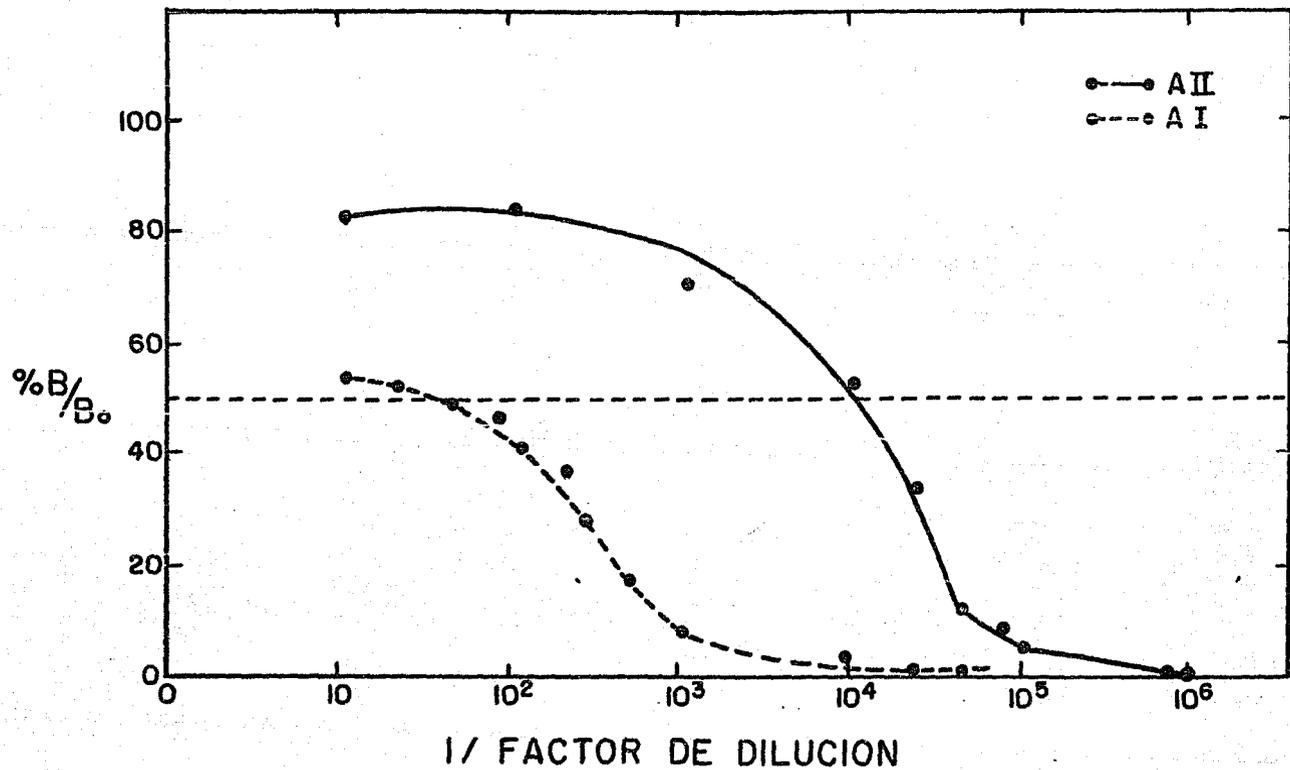


FIGURA 14. DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS DEL CONEJO #3 USANDO LA MISMA DILUCION DEL ANTICUERPO Y VARIANDO EL ANTIGENO [AI Y AII].

En este caso se hizo una variante y se usó también como antígeno A I, para observar la afinidad del anticuerpo para este decapeptido. Como se puede apreciar en la Figura 14 el título de este anticuerpo contra A I es de 1:28, el cual es casi despreciable con respecto al título que exhibe usando como antígeno A II. Esta información sugiere que el anticuerpo es 357 (10,000/28) más específico para A II que para A I.

Después de producir un suero contra A II se verificó su especificidad antes de usarlo para medir niveles de este antígeno en fluidos biológicos. La especificidad se refiere a la capacidad del anticuerpo de reaccionar con el antígeno que lo produjo y no con antígenos relacionados estructuralmente. En la práctica esto no es 100% absoluto y hay que valorar la especificidad midiendo el porcentaje de reacción cruzada con péptidos relacionados estructuralmente. En este trabajo se usaron análogos de A I y de A II. El porcentaje de reacción cruzada se definió en la sección 2.1.11. En las Figuras 15 y 16 se presentan las curvas de especificidad del suero del conejo # 3. El porcentaje de reacción cruzada, en base a las curvas de especificidad trazadas para cada análogo se resumen en la Tabla VIII.

La sensibilidad es el límite de detección o concentración más baja de la solución patrón que es capaz de producir un desplazamiento del antígeno radiactivo, significativamente diferente de la unión no específica. Los resultados se ilustran en la Figura 17. La sensibilidad fue de 1.9 pg/ml.

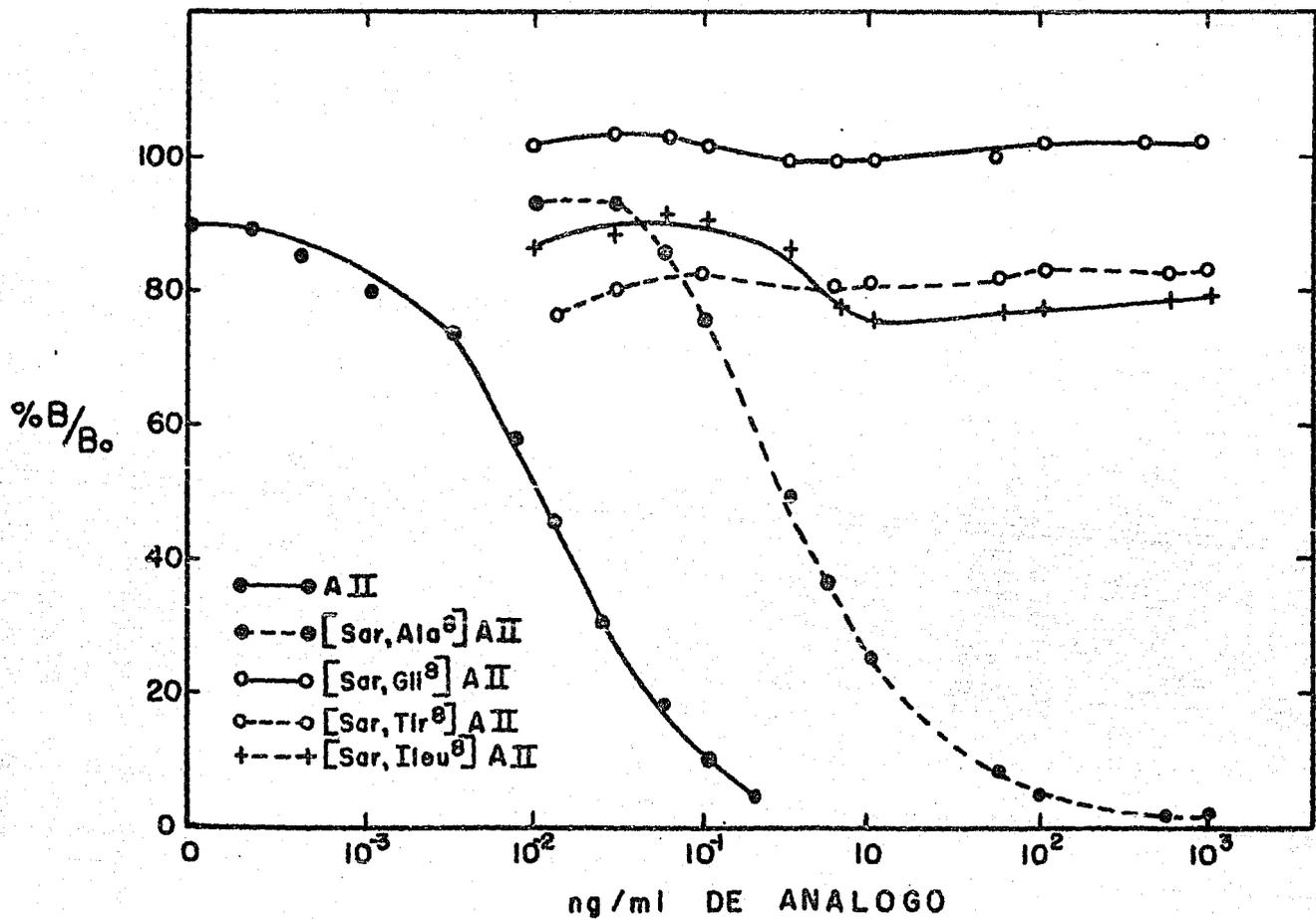


FIGURA 15. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO CONTRA AII DEL CONEJO #3 CON LOS ANALOGOS DE AII.

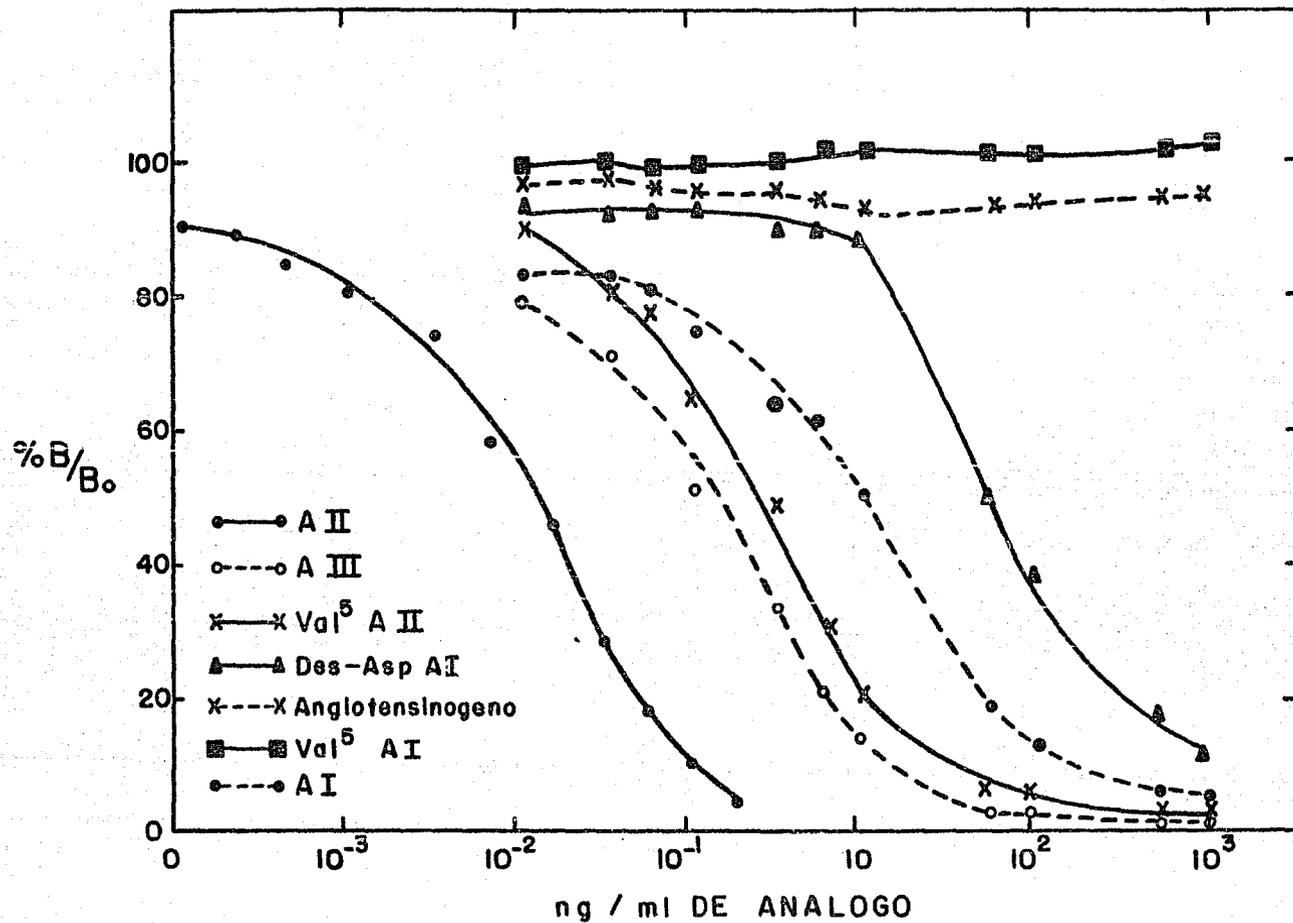


FIGURA 16. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO CONTRA AII DEL CONEJO # 3
CON LOS ANALOGOS DE AI"

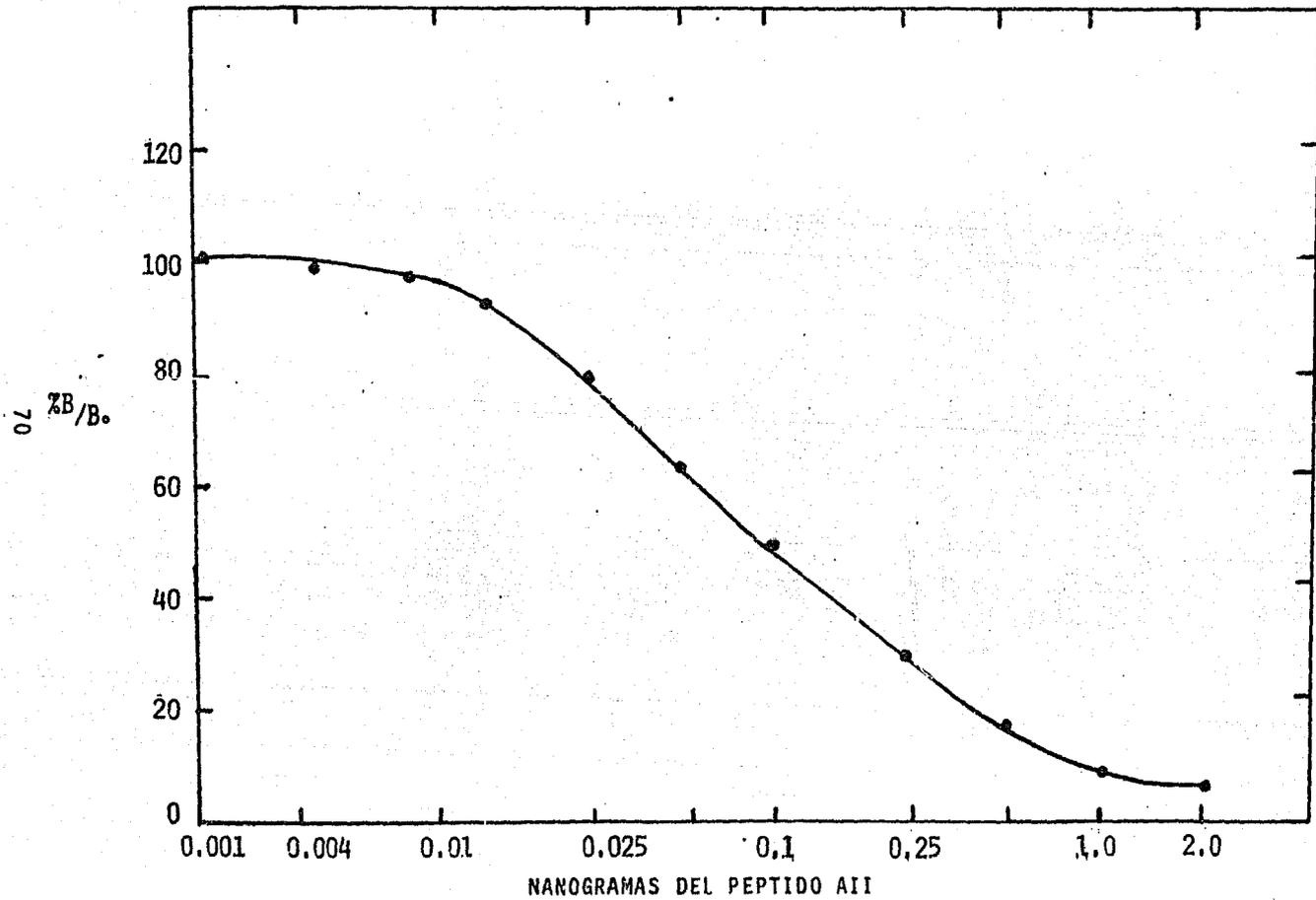


FIGURA 17. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL METODO CON EL ANTICUERPO DEL CONEJO # 3.

TABLA VIII. PORCENTAJES DE REACCION CRUZADA DEL ANTICUERPO DEL
CONEJO 3

ANALOGO	% DE REACCION CRUZADA
ANGIOTENSINA II	100
[Sar ¹ , Ala ⁸] A II	3.3
[Sar ¹ , Gln ⁸] A II	<0.005
[Sar ¹ , Tyr ⁸] A II	<0.005
[Sar ¹ , Ile ⁸] A II	<0.005
ANGIOTENSINOGENO	<0.005
ANGIOTENSINA III	8.3
Des-Asp ¹ A I	0.17
Val ⁵ A II	3.1
Val ⁵ A I	<0.005
ANGIOTENSINA I	1.0

La curva patrón para la determinación de A II se ilustra en la Figura 18.

Los resultados de los experimentos de recuperación se muestran en la tabla IX. Como se puede apreciar la cantidad recuperada es similar o mayor a la cantidad adicionada.

El coeficiente de variación intraensayo fue de 6.4%, n = 12, X = 23.3 pg de ANG II, D.E. = 1.5.

Para probar el anticuerpo obtenido se midió la concentración plasmática de A II a ratas en diferentes modelos experimentales en donde el SRAA se modifica. Los resultados están resumidos en

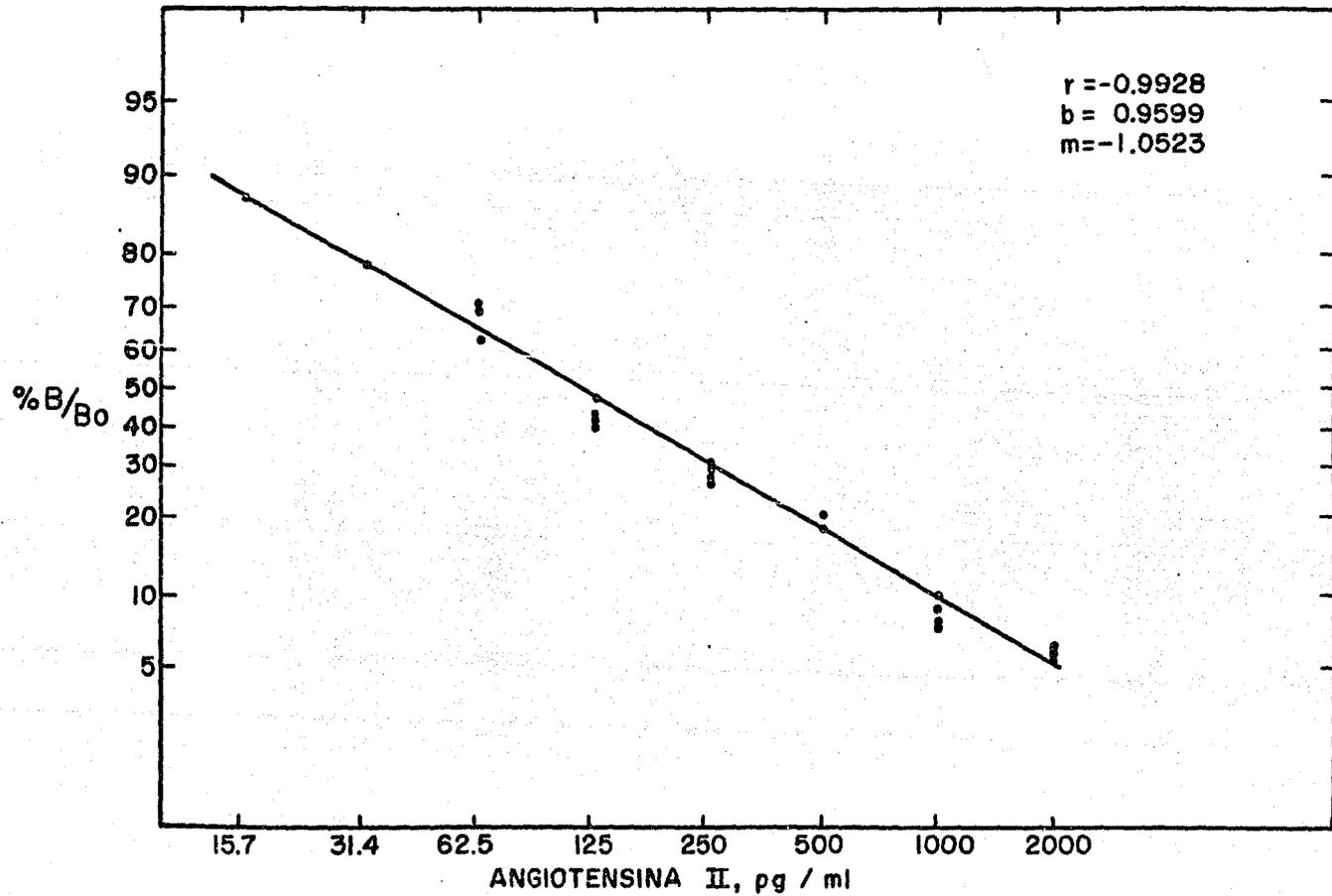


FIGURA 18. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE AII EN PLASMA.

la tabla X. El símbolo (*) indica una diferencia estadísticamente significativa del grupo control.

TABLA IX. PORCENTAJES DE RECUPERACION DE ANGIOTENSINA II ADICIONADA AL PLASMA DE RATAS

CANTIDAD DE A II ADICIONADA AL PLASMA DE RATA	CANTIDAD DE A II MEDIDA EN LAS MUESTRAS	PORCENTAJE DE DE RECUPERACION
1.000 ng	1.1800±0.14 n = 16	118.0
0.500 ng	0.5200±0.10 n = 16	104.0
0.250 ng	0.2510±0.04 n = 16	100.4
0.125 ng	0.1255±0.01 n = 16	100.4

VALORES = MEDIA+DESVIACION PATRON, n = NUMERO DE DETERMINACIONES
 En la tabla X, también se muestran los valores de AI APR, CPR, CPA (concentración plasmática de angiotensinógeno) y CPALDO (concentración plasmática de aldosterona) para valorar efectivamente los cambios producidos en los componentes del SRAA en respuesta a las diferentes maniobras experimentales.

RATAS ANESTESIADAS (ANES): La anestesia estimula la secreción de renina, como se puede apreciar en el aumento de APR, CPR y AI. La AII, en congruencia con la estimulación del SRAA, también aumenta. La CPALDO no se modificó.

RATAS BINEFRECTOMIZADAS (BINE): La APR y CPR disminuyen significativamente, pero no la AI, mientras que la AII, CPA y CPALDO aumentan significativamente.

RATAS DESHIDRATADAS (DESH): La APR, CPR, AI y AII aumentan

TABLA X. VALORES DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES

	APR (ngAI/ml/h)	CPR (ng/ml)	A I (ng/ml)	A II (pg/ml)	CPA (ngAI/ml/h)	CPALDO (pg/ml)
CONTR	3.9±2 (30)	25±9 (25)	0.40±0.2 (21)	34±14 (36)	699±103 (14)	577±147 (10)
CAPT	23.9±13* (13)	669±126* (8)	5±2.5* (6)	81±28* (17)	406±184* (15)	662±148 (10)
ANEST	21.8±5* (7)	68±24* (8)	2.10±0.8* (10)	45±12* (9)	ND	648±125 (10)
DESH	37±17* (9)	144±30* (7)	3±0.9* (7)	106±25* (8)	638±77 (7)	737±115 (4)
ISO	12.2±3* (5)	58±31 (5)	3.1±1.9* (5)	62±26* (15)	841±332 (7)	713±182 (10)
BINE	0.5±1* (8)	4±2* (10)	0.20±0.1 (7)	52±22* (5)	11270±3533* (10)	1598±246* (10)
NaCl 2%	1.9±1* (8)	8±4* (10)	0.1±0.06* (9)	26±12 (14)	1352±188* (10)	441±68* (10)
CLO	1.7±0.3* (8)	7±2* (9)	0.2±0.08 (4)	26±10* (16)	610±114 (12)	616±59 (8)
PRD	1.4±0.5* (6)	8±2* (7)	0.5±0.3 (7)	27±12 (20)	704±147 (14)	644±89 (9)
URE	4.2±2 (9)	19±4 (10)	1.1±0.5* (9)	35±11 (16)	9637±353* (10)	1462±238* (10)
NaCl 1%	4.4±2 (9)	25±4 (10)	0.5±0.1 (10)	40±14 (16)	1067±167* (10)	631±48 (9)

CONTR = CONTROL; ANEST = ANESTESIADAS; BINE = BINEFRECTOMIZADAS
 DESH = DESHIDRATADAS; URE = UREMICAS; CPA, CPALDO = CONCENTRACION
 PLASMATICA DE ANGIOTENSINOGENO Y DE ALDOSTERONA RESPECTIVAMENTE.

significativamente, mientras que CPA y CPALDO no se modifican.

RATAS CON NaCl AL 1% EN EL AGUA DE BEBER (NaCl 1%). En este modelo no se obtuvo una modificación de la secreción de renina, por lo tanto tampoco de AI, AII. La CPALDO no se modificó, sin embargo aumentó la CPA.

RATAS CON NaCl AL 2% EN EL AGUA DE BEBER (NaCl 2%). En este modelo disminuye la secreción de renina como se puede apreciar en la disminución de APR, CPR, AI. La AII disminuye pero esta diferencia no alcanza significación estadística. Por otra parte la CPA aumenta, mientras que la CPALDO disminuye.

RATAS UREMICAS POR LIGACION URETERAL (URE). En este modelo la APR, la CPR, la AII no son diferentes del control. Por el contrario aumenta la AI, la CPA y la CPALDO

RATAS INYECTADAS CON ISOPROTERENOL (ISO). En este modelo aumenta la secreción de renina como se puede observar por el aumento en la APR, y AI. La CPR aumenta aunque no significativamente. La AII también aumenta de manera congruente con el aumento en la secreción de renina. Por el contrario ni la CPA, ni la CPALDO se modifican.

RATAS INYECTADAS CON CLONIDINA (CLO). La secreción de renina disminuye en este modelo, como se puede apreciar por la disminución en APR, CPR, y también de AII. La concentración de AI disminuye sin llegar a ser significativo. Por el contrario la CPA y la CPALDO no se modifican.

RATAS INYECTADAS CON PROPRANOLOL (PRO). La secreción de renina

disminuye en este modelo, como se puede ver en la disminución de la APR, CPR. La AI no se modifica y la AII disminuye aunque no de manera significativa. La CPA y la CPALDO no se modifican.

RATAS INYECTADAS CON CAPTOPRIL (CAPT). En este modelo aumenta la secreción de renina como se puede ver por el aumento en la APR, CPR, AI y AII. La CPA disminuye, mientras que la CPALDO no se modifica. La actividad de la ECA disminuyó significativamente de 172 ± 7 a 17.6 ± 12

En las tablas XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII y XVIII se muestran los resultados de las pruebas estadísticas realizadas en las determinaciones de los componentes del SRAA en los diferentes modelos experimentales cuyos resultados aparecen en la Tabla X.

TABLA XI. PRUEBA DE CHI CUADRADA DE BARTLETT

COMPONENTE DEL SRAA	GRADOS DE LIBERTAD	CHI CUADRADA	VALOR CRITICO	PROBABILIDAD
APR	10	219.29	18.31	<0.05
CPR	10	298.94	18.31	<0.05
AI	10	130.16	18.31	<0.05
AII	10	41.03	18.31	<0.05
CPA	9	388.27	16.92	<0.05
CPALDO	10	39.94	18.31	<0.05

Los resultados presentados en la Tabla XI indican que las varianzas entre los modelos experimentales para cada determinación son heterogéneas, debido a que el valor de chi

cuadrada de la prueba es mayor que el valor crítico obtenido de las tablas a una significancia de 0.05 con los grados de libertad (número de grupos - 1) indicados. Por lo tanto la prueba es significativa al menos a un nivel de 0.05.

TABLA XII. ANALISIS DE VARIANZA DE UNA SOLA CLASIFICACION POR RANGOS DE KRUSKALL-WALLIS

COMPONENTE DEL SRAA	N	GRADOS DE LIBERTAD	H	VALOR CRITICO	PROBABILIDAD
APR	112	10	91.69	18.31	<0.05
CPR	110	10	93.92	18.31	<0.05
AI	95	10	77.73	18.31	<0.05
AII	172	10	79.45	18.31	<0.05
CPA	109	9	84.68	16.92	<0.05
CPALDO	100	10	63.10	18.31	<0.05

N = Número total de datos.

En la Tabla XII se presentan los resultados del análisis de varianza comparando para una determinación los diferentes grupos experimentales. Es necesario realizar análisis de varianza cuando se deban comparar más de dos grupos. Se usó el análisis de varianza de Kruskall-Wallis debido a que la prueba de Bartlett fue significativa. En este método se sustituyen los valores absolutos por rangos, con los cuales se realiza el análisis. Si el valor H obtenido de la prueba es superior al valor crítico encontrado con los grados de libertad y el nivel de significancia

(0.05), se concluye que al menos un grupo de los estudiados es diferente. En este caso la prueba fue significativa para todas las determinaciones. Para investigar cual o cuales son los grupos experimentales diferentes del control, se aplicó la prueba de Hollander descrita en Métodos. En las tablas siguientes se presentan los resultados obtenidos de todos los grupos experimentales para cada determinación. Cuando la diferencia de rangos de los grupos por comparar es mayor o igual que el término de la derecha de la ecuación (en donde se incluye el valor crítico) se concluye que los grupos son diferentes y se indica por un asterisco.

TABLA XIII. PRUEBA DE HOLLANDER PARA APR

MODELOS	DIFERENCIA DE RANGOS	TERMINO DERECHA DE LA ECUACION
BINE*	42.85	22.08
ANES*	44.22	23.71
DESH*	53.35	21.47
NaCl 1%	5.15	21.47
NaCl 2%*	22.85	22.08
URE	1.01	21.47
ISQ*	32.55	27.29
CLO*	27.35	23.71
PRO*	31.15	23.70
CAPT*	43.55	18.76

TABLA XIV. PRUEBA DE HOLLANDER PARA CPR

MODELOS	DIFERENCIA DE RANGOS	TERMINO DERECHA DE LA ECUACION
BINE*	48.73	20.64
ANES*	26.39	22.43
DESH*	38.27	23.62
NaCl 1%	6.27	20.64
NaCl 2%*	40.23	20.64
URE	6.83	20.64
ISO	19.07	27.09
CLO*	40.73	21.46
PRO*	31.03	23.62
CAPT*	45.77	22.43

TABLA XV. PRUEBA DE HOLLANDER PARA AI

MODELOS	DIFERENCIA DE RANGOS	TERMINO DERECHA DE LA ECUACION
BINE	17.90	20.92
ANES*	25.90	18.42
DESH*	50.10	20.92
NaCl 1%	7.60	18.42
NaCl 2%*	29.80	19.10
URE*	27.10	19.10
ISO*	28.20	23.86
CLO	22.90	26.10
PRO	5.70	20.92
CAPT*	54.20	22.19

TABLA XVI. PRUEBA DE HOLLANDER PARA AII

MODELOS	DIFERENCIA DE RANGOS	TERMINO DERECHA DE LA ECUACION
BINE*	60.60	41.35
ANES*	33.60	32.28
DESH*	90.10	33.86
NaCl 1%	6.20	26.03
NaCl 2%	21.90	27.28
URE	6.30	26.03
ISD*	53.80	26.62
CLD*	24.40	24.40
PRO	20.00	24.10
CAPT*	80.50	25.49

TABLA XVII. PRUEBA DE HOLLANDER PARA CPA

MODELOS	DIFERENCIA DE RANGOS	TERMINO DERECHA DE LA ECUACION
BINE*	53.35	22.76
DESH	13.75	25.30
NaCl 1%*	28.10	22.76
NaCl 2%*	27.35	22.76
URE*	50.15	22.76
ISD	4.85	25.30
CLD	16.15	21.50
PRO	3.25	20.66
CAPT*	33.25	20.31

TABLA XVIII. PRUEBA DE HOLLANDER PARA CPALDO

MODELOS	DIFERENCIA DE RANGOS	TERMINO DERECHA DE LA ECUACION
BINE*	57.95	22.57
ANES	12.45	22.57
DESH	27.30	29.86
NaCl 1%	9.16	23.19
NaCl 2%*	21.85	21.50
URE*	39.15	22.57
ISO	20.90	22.57
CLO	3.05	23.94
PRD	11.50	23.19
CAPT	8.85	22.57

V. DISCUSSION

DISCUSION

La AII es el componente biológicamente activo dentro del SRAA por lo que su medición en el laboratorio es muy importante. El objetivo principal del presente trabajo fue producir los anticuerpos y desarrollar la metodología necesaria para medir este péptido por RIA.

Como la angiotensina II es un péptido muy pequeño fue necesario hacerlo antigénico con proteínas de elevado peso molecular. En las referencias 38,43 y 44 se citan diversos intentos para acoplar moléculas pequeñas a proteínas. Tales reportes describen la formación de los anticuerpos contra sustancias que por si solas no son capaces de producir anticuerpos. El método elegido en este trabajo para producir los anticuerpos contra angiotensina II fue por la inmunización de un complejo proteína-angiotensina II, usando EDC de acuerdo a Goodfriend et al. (38).

Para lograr lo anteriormente mencionado se contempló la necesidad de contemplar un esquema de inmunización que permitiera la obtención de anticuerpos contra angiotensina II. Se decidió seguir el esquema descrito por Moor y cols. (40) el cual ya había sido usado exitosamente en nuestro laboratorio para obtener anticuerpos contra AI. En este esquema se alternan diferentes moléculas acarreadoras de AII, como son la albúmina de huevo, la albúmina sérica bovina, la tiroglobulina y la hemocianina. La ventaja de este método es que se obtienen títulos altos y anticuerpos específicos. Sin embargo la formación del anticuerpo

depende de la susceptibilidad individual de cada conejo por lo que se inmunizó en este trabajo a cinco conejos para elegir aquel que presentara un título más alto.

Por otra parte el RIA, que es la forma en que se midió este péptido, presenta mayores ventajas que otros métodos usados para medirla en plasma, como el propuesto por Boucher (52) el cual usa una separación del péptido por cromatografía y un bioensayo en lugar de un RIA.

Además la AII puede ser medida directamente en el plasma sin hacer una extracción preliminar del péptido como es la descrita por Boyd et al (53) y Catt et al (54) evitando la pérdida de la hormona. En este trabajo se validó el método de RIA directo, sin extracción agregando cantidades conocidas de AII al plasma y calculando la recuperación al medirlo por RIA.

Las proteínas usadas para la conjugación son diversas. Lijnen y cols. (55) administraron AII acoplada a albúmina sérica bovina. Boyd et al (53) inmunizaron a los conejos con el complejo angiotensina II-gamaglobulina porcina. Mion et al (56) usaron el mismo método e inyectaron subcutáneamente por espacio de tres días durante dos semanas y encontraron un título de 1:8,000. Nussberger et al. (57) conjugaron angiotensina II con tiroglobulina.

El método usado en este trabajo resultó eficaz porque al menos uno de los conejos tuvo un título superior a 1:1000. El título del conejo que se sacrificó fue de 1:10,000.

La sensibilidad del sistema utilizado es de 1.9 pg/ml. Esta es la cantidad mínima detectable por el anticuerpo bajo las condiciones empleadas. La sensibilidad encontrada para los anticuerpos contra AII preparados por Boyd et al (53), Mion et al (56), Catt et al. (54) y Kappelgaard et al. (58) fue de 8, 5, 50 y 3 pg respectivamente. Por otra Shimamoto et al (59) reportaron una sensibilidad de 0.1 pg. De los datos anteriores se puede observar que la sensibilidad del anticuerpo preparado en este trabajo es superior a cuatro de las cinco preparaciones mencionadas.

La especificidad del suero antiangiotensina II con análogos ha sido estudiada por diversos investigadores quienes subrayan la importancia del extremo carboxilo en la especificidad del anticuerpo.

De acuerdo a los resultados obtenidos la reactividad cruzada que presentan los análogos que tienen la misma secuencia de aminoácidos en el extremo amino del péptido tal como: angiotensina I, angiotensinógeno, Val⁵-angiotensina II no presentan reactividad cruzada importante.

Los análogos que poseen la misma secuencia del extremo carboxilo como: Val⁵-angiotensina I, des Asp¹-angiotensina I y angiotensina III mostraron una reactividad cruzada de 3.1%, 0.17% y 6.3 % respectivamente, las cuales se pueden considerar muy bajas sugiriendo que el suero es muy específico para el extremo carboxilo de angiotensina II. La reactividad cruzada contra angiotensina III del anticuerpo preparado por Shimamoto et al

(59) fue de 100%.

Como el octapéptido angiotensina II difiere de su precursor, el decapeptido angiotensina I, solo por la ausencia de dos aminoácidos, His y Leu, en el extremo carboxilo se ha puesto particular atención en esto y se observó que en la especificidad la reactividad cruzada de angiotensina I desplaza 1% y al planear el ensayo usando como antígeno angiotensina I y angiotensina II para observar la afinidad de los dos antígenos con el anticuerpo obtenido (Fig 13), se observa claramente que el porcentaje de reacción es despreciable (título 1:28) en relación al título contra angiotensina II (1:10,000). Por lo tanto la gran especificidad del suero obtenido en este trabajo, como lo demuestra el bajo porcentaje de reactividad cruzada hacia análogos de angiotensina I presentes en líquidos biológicos proporciona una seguridad de que el desplazamiento del antígeno marcado observado en muestras de plasma con el anticuerpo corresponde totalmente a angiotensina II. Los otros análogos utilizados no se encuentran normalmente en líquidos biológicos ya que son totalmente sintéticos y sus porcentajes de reacción cruzada son despreciables. Estos análogos se probaron, ya que han sido usados como drogas antihipertensivas, como bloqueadores de los receptores de angiotensina II, y pueden estar presentes en el plasma de algunos pacientes.

Düsterdieck y McElwee (60) produjeron anticuerpos contra angiotensina II y valoraron la especificidad con diferentes análogos de angiotensina II. Encontraron que la reactividad cruzada contra angiotensinógeno, angiotensina I, Val 5

angiotensina II y angiotensina III fue de 0.12%, 0.60%, 100% y 100%, respectivamente.

El siguiente paso en el trabajo fue el uso del anticuerpo en la cuantificación de angiotensina II en el plasma de ratas con alteraciones en el sistema renina angiotensina aldosterona. La anestesia con éter aumenta la secreción de renina (17,61). Gran parte de este aumento es debido a la estimulación adrenérgica. En este trabajo se encontró que aumentó la APR, la CFR, la AI y la AII. El aumento en la concentración de AII es consistente con la activación del SRAA. La CPALDO no cambió en respuesta al aumento de AII, como era de esperarse, ya que se requiere un tiempo mayor para que se manifieste el aumento en la circulación. Los valores de CFR, en condiciones normales, siempre son mayores que los de APR debido a que la renina no está saturada con su sustrato.

En las ratas binefrectomizadas la APR y la CFR disminuyen significativamente, pero no llegan a desaparecer. La AI tiende a disminuir pero la caída no es significativa. Sorprendentemente la AII aumenta significativamente. La CPA aumenta 16 veces, mientras que la CPALDO aumenta ~3 veces. El aumento de CPALDO es debido principalmente a que la aldosterona no se está excretando. El aumento de angiotensinógeno por la binefrectomía está bien documentado en la literatura (62-65) y aunque este aumento puede ser explicado en parte a la disminución del consumo causada por la caída significativa en los niveles de renina, se están investigando otros factores que ayuden a explicar el aumento tan marcado del angiotensinógeno en plasma en estas condiciones (66).

El hecho de que bajo estas condiciones la renina no desaparezca de la circulación significa que se está sintetizando en fuentes extrarenales tales como: cerebro, músculo liso arteriolar, músculo liso uterino, glándulas submandibulares, células mesangiales de glomérulos, células endoteliales vasculares, arteria mesentérica, testículo, corazón y adrenales (67-70). De igual manera es bien conocido que las angiotensinas pueden sintetizarse en diferentes tejidos de donde pueden secretarse a la circulación (69-70). La presencia vascular del sistema renina angiotensina (67-70) es la explicación de que la renina no desaparezca de la circulación y muy probablemente de que los niveles de AI no disminuyan significativamente y puede explicar en parte, sino totalmente, el hecho de que los niveles de AII no solo no disminuyan sino que aumenten. Cambios en el catabolismo de la AII o cambios en la actividad de otras enzimas independientes del sistema renina angiotensina capaces de sintetizar AII pueden explicar también el aumento de los niveles de AII en la nefrectomía.

En las ratas deshidratadas aumenta la secreción de renina, para mantener el volumen circulante. Este aumento en la secreción de renina se observa por el aumento en la APR, CPR, AI y congruentemente también de AII. Los niveles de angiotensinógeno tienden a disminuir y los de aldosterona tienden a aumentar, pero los cambios no llegan a ser estadísticamente significativos. Los estímulos que favorecerían estos cambios son el aumento en la secreción de renina que aumenta el consumo de su sustrato y el aumento en los niveles de AII que estimula la secreción de

renina. En el caso de la CPALDO no se alcanzó la significancia por el poco número de determinaciones (4) y la poca diferencia entre las medias.

Una dieta alta en cloruro de sodio inhibe la secreción de renina (71). En este trabajo se usaron dos concentraciones de cloruro de sodio en el agua de beber (1 y 2%). La concentración más baja (1%) no produjo cambios en la secreción de renina, probablemente debido a que su concentración está muy cercana a la concentración fisiológica (0.9%). No hubo cambios en APR, CPR, AI, AII, CPALDO. Sin embargo el angiotensinógeno aumentó significativamente. Ya que la renina no cambió, este aumento no puede ser explicado por una disminución del consumo, por lo que parece ser un efecto directo del tratamiento. Al buscar en la literatura no se encontraron datos con este modelo experimental. Cuando la dieta alta en sodio se dió en el alimento (65) la CPA no cambió. Esta observación hecha en este trabajo necesita estudiarse adicionalmente para encontrar una explicación. Por otra parte cuando se administró la concentración mas alta en cloruro de sodio (2%) la secreción de renina disminuyó marcadamente como se puede apreciar en los valores de APR, CPR, AI. Los niveles de AII tienden a disminuir pero la caída no es significativa. En congruencia con estos datos la CPALDO disminuye significativamente. La magnitud del aumento observado en la CPA es superior al aumento observado con la dieta más baja, probablemente a que su consumo disminuye por la caída en los niveles de renina. La ligación ureteral aumenta 14 veces la CPA y 2.5 veces la CPALDO. La secreción de renina no se modifica,

como se puede observar por los valores de APR, CPR, y AII. La elevación observada en los niveles de AI son incongruentes con los otros parámetros medidos del SRAA. Otros autores han reportado disminución de la secreción de renina y aumento en los niveles plasmáticos de angiotensinógeno en estas condiciones (8, 72). El captopril modifica profundamente la secreción de renina, como se puede observar por el aumento de APR, CPR, AI y también de AII. Disminuye la CPA, mientras que no tiene efecto sobre la CPALDO. Las concentraciones usadas de captopril no inhibieron 100% a la enzima convertidora de angiotensina I, como era el propósito original, por lo que los niveles de AII no solo no disminuyeron sino que aumentaron. Este aumento muy probablemente se explique debido a que los niveles de AI aumentaron 12.5 veces. La explicación tradicional del aumento de la secreción de renina con los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I, es que al bloquearse la producción de AII, no se cierra el circuito retroinhibitorio de ésta (AII) sobre la secreción de renina. Pero aquí podemos observar que a pesar de que la AII no disminuye, la secreción de renina aumenta impresionantemente (27 veces tomando el dato de CPR), por lo que estos datos sugieren otro(s) mecanismo(s) involucrado en este efecto. Es interesante notar que a pesar de que disminuye el angiotensinógeno, aumenta la APR. El hecho de que el angiotensinógeno disminuye con el captopril es un hecho bien documentado en la literatura (73-76) y se han sugerido, además del elevado consumo por los altos niveles de renina, otros factores, como por ejemplo un efecto directo, que expliquen la disminución de los niveles de CPA. Por otra parte, Mento y Wilkes (77) han estudiado los niveles de AII en ratas

tratadas aguda y crónicamente con otro inhibidor de la ECA (enalapril) a dosis que bloquean 100% la actividad de la ECA. Los resultados obtenidos fueron inesperados. A una dosis de 10 mg/kg de enalapril, no se detectó actividad de ECA, sin embargo, no hubo cambio en los niveles de AII; a una dosis de 30 mg/kg tampoco se detectó actividad de ECA y los niveles de AII bajaron significativamente, pero no desaparecieron. Estas determinaciones se hicieron a las tres horas de administrado el enalapril. Cuando la dosis de 30 mg/kg se administró durante 1 semana o dos meses los niveles de AII aumentaron significativamente 3 y 4 veces respectivamente. La explicación parece ser la existencia de otras enzimas (diferentes a ECA) de naturaleza tisular que pueden producir AII a partir de AI (78).

Las drogas adrenergicas modifican la secreción de renina (17). En este trabajo se usaron el isoproterenol, la clonidina y el propranolol. El isoproterenol aumenta la secreción de renina, así como los niveles de AI y AII, LA CPA y la CPALDO no se modifican. La clonidina disminuyó la secreción de renina y los niveles de AII, sin embargo los niveles de AI no se modificaron aunque tendieron a disminuir. La CPA y la CPALDO no se modificaron. El propranolol disminuyó la secreción de renina, pero no se modificaron los niveles de AI, ni de AII aunque estos últimos tendieron a disminuir. La CPA y la CPALDO no se modificaron.

V I . C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la obtención de un anticuerpo confiable para cuantificar los niveles de A II en plasma, por medio de RIA; debido a que reúne las siguientes características.

1. Un título de 1:10,000.
2. Una sensibilidad de 1.9 pg de A II / ml.
3. No presenta una reactividad cruzada importante con ninguno de los análogos probados.
4. Debido a su especificidad y a que las pruebas de recuperación fueron satisfactorias, la A II se puede medir directamente en el plasma, sin necesidad de emplear un método de extracción.

Por otra parte, se concluye que la producción de A II no depende exclusivamente del SRAA, ya que los niveles de A II no correlacionaron con la actividad del SRAA en todas las condiciones experimentales empleadas en este trabajo. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el estudio de los factores involucrados en la regulación de los niveles de este octapéptido en varias condiciones experimentales.

VIII. BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Brown, J.J., Leckie, B.J., Lever, A.F., McIntyre, G., Morton, J. J., Semple, D.F. y J.I.S. Robertson. (1983). The renin-angiotensin system and the regulation of the circulation, en: Handbook of Hypertension, Vol 1, Clinical aspects of essential hypertension. Editado por Robertson, J.I.S. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 278-323.
2. Haber, E. (1983). Inhibitors of renin: present and future. Clin. Exp. Hypertension A5: 1193-1205.
3. Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. y M.A. Ondetti. (1982). Development and design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. Am. J. Cardiol. 49: 1390-1394.
4. Sweet, C.S. y E.H. Blaine. (1984). Angiotensin converting enzyme inhibitors, en Handbook of Hypertension. Vol 3, Pharmacology of antihypertensive drugs. Editado por Van Zwiten, P.A. Elsevier, Amsterdam y Nueva York. pp. 345-363.
5. Huseh, W.A. (1983). Compounds of the renin system. Am. J. Nephrol. 2: 109-117.
6. Dzau, V.J. y H.C. Herrman. (1982). Hormonal control of angiotensinogen production. Life Sci. 30: 577-584.
7. Murakami, E., Hiwada, K. y T. Kokubu. (1980). Effects of prostaglandins on renin substrate production by the liver. Clin. Sci. 59: 137-139.
8. Hiwada, K., Tanaka, H. y T. Kokubu. (1976). The influence of nephrectomy, ureteral ligation and of estradiol on plasma renin substrate in unilateral nephrectomized rats. Pflugers Arch. 365: 177-182.
9. Davis, J.O. y R.H. Freeman. (1976). Mechanism regulating renin release. Physiol. Rev. 56: 1-56.
10. Zanchetti, A., Stella, A., Leonetti G. y G. Mancina. (1981). The control of renin release. En: Frontiers in hypertensive research. Editado por Laragh J.H., Buhler, F.R. y D.W. Seldin. Springer-Verlag, Nueva York, Heidelberg, Berlin. p. 219.
11. Galen, F.X., Corvol, M.T., Devaux, C. Gubler, M.C., Mounier, F., Camilleri, J.P., Hout, A.M., Menard, J. y P. Corvol. (1984). Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. Evidence for a renin precursor. J. Clin. Invest. 73 (4): 1144-1155.
12. Skeggs, L.I., Dorer, F.E., Kahn J.R., Lentz, K.E. y M. Levine (1981). Experimental renal hypertension: the discovery of the renin angiotensin system. En: Biochemical regulation of blood pressure. Editado por R.L. Soffer. John Wiley & Sons. pp. 3-71.

13. Robertson J.I.S. (1984). El sistema renina angiotensina: su importancia en fisiología y medicina. Merck Sharp & Dohme. pp. 13-18.
14. Skeggs, L.T., Kahn, J.R. y N.P. Shumway. (1956). The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103: 295-299.
15. Williams, G.H. y R.G. Bluehy. (1983). Control of aldosterone secretion. En: *Hypertension*. Editado por J. Genest, O. Kucher, P. Hamet y M. Cantin. McGraw-Hill. pp. 320-338.
16. Ariens, E.J., Beld, A.J., Miranda, J.F.R. y A.M. Simonis (1971). The pharmacon-receptor concept. En: *Receptors*, Vol 1. pp. 33-91.
17. Pedraza-Chaverri, J. (1985). Influencia de la toxina pertussis sobre la función renal. I. Efecto sobre la secreción de renina. Tesis Doctoral. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química, UNAM.
18. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. (1986). Pertussis toxin enhances the beta adrenergic and blocks the alpha-2 adrenergic regulation of renin secretion in renal cortical slices. *Life Sci.* 38: 1005-1011.
19. Yallow, R.S. y S.A. Berson (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in the man. *J. Clin. Invest.* 39: 1157-1175.
20. Yallow, R.S. (1978). Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biological systems. *Science* 200: 1236-1245.
21. Berson, S.A. y R.S. Yallow (1971). Radioimmunoassay: a status report. Current knowledge of basic concepts in immunology and their clinical applications. R.A. Good and D.W. Fisher editores. Senquer Associates, Stanford Con. p. 187-189.
22. Hales, C.N. y P.J. Randle (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in the man. *J. Clin Invest.* 39:1157-1160.
23. Morgan, C.R. Lazarow (1963) A immunoassay of insulin: two antibody system, plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes* 12: 115-120.
24. Rosselin, G., Assan R., Yallow, R.S. y Berson S.A. (1966). Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with iodine ¹³¹ by tellium powder and precipitated silica. *Nature* 212: 355-356.
25. Yallow, R.S. y Berson, S.A. (1966). Purification of ¹³¹I parathyroid hormone with microfine granules of precipitated silica. *Nature* 212: 357-359.
26. Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W. y S.J. Bleicher (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab. 25: 1375-1378.
27. Dogterom, J., Van Wimersma-Greidanus, T.J. y D. de Wied D. (1978) Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog and rat. *Am. J. Physiol* 234: E463-E467.
28. Pikler, G.M. (1973). El radioinmunoensayo. *Rev. Invest. Clin.* 25: 51-86.
29. Rodbard, D., Rayford, P.L., Cooper, J.A. y G.T. Ross. (1968). Statistical quality control of radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 28: 1412-1418.
30. Rodbard, D. (1974). Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 20: 1255-1270
31. Rodbard, P., Bridson, W. y P.L. Rayford, (1969) Rapid calculation of radioimmunoassay results. *J. Lab. Clin. Med.* 74: 770-776.
32. Tauxe, N. W. y A.L. Drvis. (1974). Nuclear medicine procedures in the clinical diagnosis by laboratory methods. Ed. por David Sohn y Henry. W. B. Saunders Co. Capitulo VII: 449-498.
33. Hunter, W.M. (1983) Internal Quality control and external quality assessment. En: *Radioimmunoassay, Design and quality control.* Ed. por J.I. Thorell, Pergamon Press. pp. 69-76.
34. Cooper, T.G. (1977). The tools of biochemistry. John Wiley and Sons Capitulo 8. pp 256-308.
35. Bangham, D.R. (1983) Standardization and standards. En *Radioimmunoassay design and quality control.* Editado por J.I. Thorell. Pergamon Press: 59-67.
36. Mallette, L.E. (1983). General techniques for raising antisera against parathyroid and calcitonin. En: *Assay of calcium-regulating hormones.* Editado por D.D. Bikle. Springer-Verlag. pp.167-189.
37. Lefontourier, Ph (1981) *Manual de Inmunología general* Capitulo 2. Editorial Masson. pp. 17-30.
38. Goodfriend, T.L., Levine, L. y G. Fasman (1964). Antibodies to bradikinin and angiotensins: A use of carbodiimides in immunology. *Science* 144: 1344-1346.
39. Carraway, K.L. y E.D. Koshland. (1968) Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimides reagents. *Biochem. Biophys. Acta* 160: 172-174.
40. Moore, G. Lutterodt, A., Burford, G. y Ledens, K. (1977). A highly specific antiserum for arginine vasopressin. *Endocrinology* 101: 1421-1435.

41. Sealey, J.E., Gerten-Banes, J. & J.M. Laragh. (1972). The renin system: variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay. *Kidney Int.* 1: 240-253.
42. Zúñiga-Estrada, A. (1986). Producción de reactivos para la determinación de angiotensina I humana por radioinmunoanálisis. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
43. Borek, F., Stupp, Y. y M. Sela. (1967). Formation and isolation of rabbit antibodies to a synthetic antigen of low molecular weight. *J. Immunol.* 98: 739-744.
44. Gilliland, P.F. y T. E. Prout (1965). Immunological studies of octapeptide II. Production and detection of antibodies to oxytocin. *Metabolism* 14: 918-923.
45. Garvey, J.S., Cremer, N.E. y S.H. Sussdorf. (1977). *Methods in immunology*. 3a edición. W.A. Benjamin, Inc. pp. 133-188.
46. Skowsky, W.R. y D.A. Fisher. (1972). The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules. *J. Lab. Clin. Med.* 80: 131-144.
47. Rehfeld, J.F. (1983). The influence of antiserum properties of radioimmunoassay characteristics. En: *Radioimmunoassay design and quality control*. Editado por J.I. Thorell. Pergamon Press. pp. 17-28.
48. Hackenthal, E. y R. Taugner. (1983). The specificity of angiotensin antisera. A cautionary note. *Histochemistry* 77: 201-207.
49. Biese, J., Nielsen, M.D. y M.N.W. Jorgensen. (1971). New view of cross-reactions in anti-angiotensin sera. *Nature New Biology* 229: 189-190.
50. Ibarra-Rubio, M.E. (1986) Estudio comparativo de la actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4.15.1) en varias especies de mamíferos y en ratas bajo diferentes estados fisiológicos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
51. Hollander M., Wolfe D.A. (1973) *Nonparametric statistical methods*. John Wiley & Sons, Capítulo 6.
52. Boucher, R., Veyrat, R., De Champlain, J. & J. Genest. (1964) New procedures for measurements of human plasma angiotensin and renin activity levels. *Can. Med. Assoc. J.* 90: 194-198.
53. Boyd, G.W., Landon, J. y W.S. Pearts (1967) Radioimmunoassay for determining plasma-levels of angiotensin II in man. *Lancet* II: 1002-1005.
54. Catt, K.J., Cain, M.C. & J.P. Coghlan. (1967) Measurement of angiotensin II in blood. *Lancet* II: 1005-1007.

55. Lijnen, F.J., Amery, A.K., Fagard, R.H. y F.H. Katz. (1978) Radioimmunoassay of angiotensin II in unextracted plasma. *Clin. Chim. Acta* 88: 403-412.
56. Mion, H., Dupont, M., Roche, M., De Paulet, A.C. y P. Barjon. (1974) Simplified radioimmunoassay of angiotensin II. *Biomedicine* 21: 126-131.
57. Nussberger, J., Mudgett-Hunter, M., Matsueda, G. y E. Haber. (1984) A monoclonal antibody specific for the carboxy-terminus of angiotensin II. *Hybridoma* 3: 373-376.
58. Kappelgaard, A.M., Nielsen, M. D. y J. Giese, (1976) Measurement of angiotensin II in human plasma: technical modifications and practical experience. *Clin. Chim. Acta* 67: 299-306.
59. Shimamoto, K., Ishida, H., Nakahashi, Y., Nishitani, T., Hosoda, S., Yokoyama, T., Tanaka, S. y O. Imura, (1984) A very sensitive direct radioimmunoassay system for plasma angiotensin II and its clinical application in various hypertensive disease. *Jpn. Circ. J.* 48: 1228-1235.
60. Dusterdieck, G. y G. McElwee. (1971) Estimation of angiotensin II concentration in human plasma by radioimmunoassay. Some applications to physiological and clinical states. *Eur. J. Clin. Invest.* 2: 32-38.
61. Pedraza-Chaverri, J., Ibarra-Rubio, M.E., Alatorre-Gonzalez, M.C., Peña, J.C. y J.A. García-Sainz, (1985) Pertussis toxin potentiates anesthesia-induced renin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 115-117.
62. Hilgenfeldt, U. y R. Schott. (1987) Differences in pattern of plasma angiotensinogen in native and nephrectomized rats. *Hypertension* 9: 339-344.
63. Murakami, E., Eggena, P., Barret, J.D. y M.P. Sambhi. (1984) Differential effects of steroids and nephrectomy on the release of renin susbtarte form rat liver slices. *J. Hypertension* 2 (suppl 1): 29-33.
64. Clauser, E., Bouhnik, J., Coezy, E., Corvol, P. y J. Menard. (1983). Synthesis and release of immunoreactive angiotensinogen by rat liver slices. *Endocrinology* 112: 1188-1193.
65. Herrmann, H. C. y V.J. Dzau. (1983) The feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin-angiotensin system *Circ. Res.* 52:328-334.
66. Klett, Ch., Komischke, K y E. Hackenthal. (1986) Is there an angiotensinogen-stimulating factor in plasma of nephrectomized rats? *IRCS Med. Sci.* 14: 827-828.

67. Dzau, V.J. (1986) Significance of vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension* 8: 553-559.
68. Campbell, D. J. (1987) Circulating and tissue angiotensin systems. *J. Clin. Invest.* 79: 1-6.
69. Kifer, I. y V.J. Dzau. (1987) Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ. Res.* 60: 422-428.
70. Inagami, T., Nakamura, M., Pandey, K.N., Naruse, M., Naruse, K., Misono, K., Okamura, T. y M. Kawamura. (1986) Intracellular action of renin, angiotensin production and release. *J. Hypertension* 4 (suppl. 4) S11-S16.
71. Keeton, T.K. y W.B. Campbell (1980). The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32: 81-227.
72. Tateishi, H., Nasjletti, A. y G.M.C. Masson. (1971). Role of renin in the regulation of angiotensinogen levels in plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 1424-1428.
73. Jaramillo, H. N., Sambhi, M.P., Bouhnik, J., Corvol, P. y J. Menard, (1987). Liver angiotensinogen synthesis and release during captopril treatment in sodium-depleted rats. *Endocrinology* 120: 1384-1390.
74. Rasmussen, S., Nielsen, M.D. y J. Giese. (1981) Captopril combined with thiazide lowers renin substrate concentration: implications for methodology in renin assays. *Clin. Sci.* 60: 591-593.
75. Kokubu, T., Ueda, E., Ono, M., Kawabe, T., Hayashi, Y. y T. Kan. (1980). Effects of captopril (SQ 14,225) on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal rats. *Eur. J. Pharmacol.* 62: 269-275.
76. Radziwill, R., Stuzman, M., Hilgenfeldt, U. y E. Hackenthal. (1986) Converting enzyme inhibitor-induced changes of plasma angiotensinogen concentration in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 122: 59-64.
77. Mento, P.F. y B.M. Wilkes. (1987) Plasma angiotensins and blood pressure during converting enzyme inhibition. *Hypertension* 9 (Suppl. III) III-42 - III-48.
78. Lanzillo, J.J., Dasarathy, J.S., Stevens, J. y B.L. Fanburg. (1986) Conversion of angiotensin-1 to angiotensin-2 by a latent endothelial cell peptidyl dipeptidase that is not angiotensin-converting enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 770-776.