



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I
(E.C. 3.4.15.1) EN RATAS CON SINDROME
NEFROTICO EXPERIMENTAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ANA ELENA AREVALO VAZQUEZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4.15.1) (ECA), forma parte del sistema renina angiotensina aldosterona en donde cataliza la conversión del decapeptido angiotensina I al octapéptido angiotensina II, el cual tiene un intenso efecto vasoconstrictor. Además la ECA inactiva a la bradicinina, el cual tiene un efecto vasodilatador. La ECA está presente en casi todos los tejidos y fluidos biológicos.

En estudios previos en nuestro laboratorio se ha encontrado que la actividad sérica de la ECA aumenta en ratas con síndrome nefrótico experimental (SN) inducido con aminonucleósido de la puromicina (ANP), sin embargo, los mecanismos involucrados en este aumento no están esclarecidos. Tampoco se sabe si la actividad tisular de la ECA cambia en estas ratas y/o si la ECA se pierde en la orina en este modelo experimental. En este estudio se usaron ratas macho de 90 a 110 g de peso a las cuales se les indujo SN con una sola inyección de ANP (15 mg/100g); el grupo control recibió el mismo volumen de vehículo.

Las ratas se sacrificaron por decapitación los días 2, 6, 11 y 16 después de la inyección; la orina y la sangre se recolectaron, y se tomó una porción de los siguientes tejidos: aorta, cerebro, intestino delgado, testículo, corazón, riñón y glándulas suprarrenales. En suero, orina y tejidos se midieron proteínas

totales y actividad de la ECA, también se midió la creatinina urinaria. La ECA se extrajo de los tejidos con un amortiguador que contenía detergente (Nonidet P-40), el cual liberó a la ECA unida a la membrana; después se midió la actividad de la ECA por un método radioquímico usando como sustrato hipurato de histidil leucina marcado con 14-C.

La hipoproteinemia fué evidente en los días 6 y 11, y la proteinuria en los días 6, 11 y 16. La actividad de la ECA en suero aumentó los días 2, 6 y 11; en orina se elevó los días 6 y 11. La proteinuria y la actividad de ECA en orina, mostraron una correlación positiva, lo que sugiere que la ECA proviene del suero. La actividad de ECA en testículo aumentó los días 2 y 6, en pulmón y aorta los días 6 y 11, en glándulas suprarrenales e intestino delgado el día 11 y en riñón los días 11 y 16. La actividad de ECA en corazón disminuyó los días 2 y 6, y aumentó en los días 11 y 16; en cerebro, disminuyó el día 6 y se elevó en el día 11. Estos resultados sugieren que los cambios en el contenido de ECA pueden contribuir a elevar los niveles circulantes de esta enzima en suero en éste modelo experimental.

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.....	1
I. INTRODUCCION.....	1
1.EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.....	1
2.SINDROME NEFROTICO.....	6
3.ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.....	11
3a.Estructura.....	12
3b.Localización y distribución.....	16
3c.Propiedades fisico-químicas.....	18
3d.Sustratos específicos.....	18
3e.Inhibidores.....	20
4.ECA Y ENFERMEDAD.....	21
II. ANTECEDENTES.....	23
III.HIPOTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS.....	26
V. MATERIALES Y METODOS.....	27
1.REACTIVOS.....	27
2.DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
3.DETERMINACION DE PROTEINAS.....	28
4.EXTRACCION DE ECA DE LOS TEJIDOS.....	29
5.DETERMINACION DE ECA.....	31

6. PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD.....	34
7. CURVAS DE LINEARIDAD.....	34
8. PRUEBAS DE INHIBICION.....	35
9. ANALISIS DEL PRECIPITADO DEL HOMOGENADO DE TEJIDOS.....	36
10. ANALISIS ESTADISTICOS.....	36
10.1 Coeficiente de variación (CV).....	36
10.2 Correlaciones.....	37
VI. RESULTADOS.....	38
VII. DISCUSION.....	51
VIII. CONCLUSIONES.....	57
IX. REFERENCIAS.....	58

ABREVIATURAS EMPLEADAS
EN ESTE TRABAJO

ADNc	Acido desoxiribonucleico complementario
AE	Actividad Especifica
AH	Acido hipúrico
ANDEVA	Análisis de varianza
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
ANP	Aminonucleósido de puromicina
ASB	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
Ci	Curies
cols.	Colaboradores
C-terminal	Carboxilo terminal
D.O.	Densidad Optica
dpm	Desintegraciones por minuto
EC	Enzyme Commission
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EDTA	Acido etilendiamino-tetra-acético
et al.	Y colaboradores

FIG.	Figura
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
HHL	Hipurato de histidil leucina
HGG	Hipurato de glicil glicina
kDa	kilodaltones
l	Litro (s)
M	Molar
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
μ l	Micro litro (s)
mU	Miliunidades
N	Normal (Normalidad)
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanómetro (s)
nmoles	Nanomoles
N-terminal	Amino-terminal
PM	Peso molecular
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Síndrome nefrótico
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona

AMINOACIDOS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
Cis	Cisteína
Gli	Glicina
Glu	Glutamina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Fen	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tir	Tirosina
Val	Valina

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

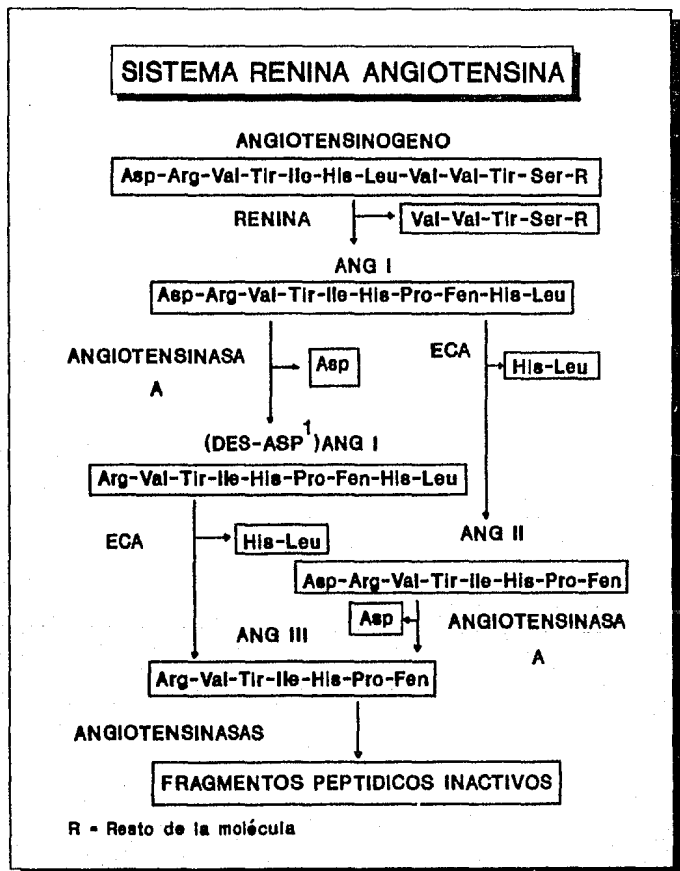
1. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), es un sistema hormonal que juega un papel central en el balance de líquidos y electrolitos y de la presión sanguínea de vertebrados (1,2), además, participa de manera importante en la génesis de la hipertensión, lo cual ha estimulado el interés por conocer la estructura, localización, regulación de síntesis y secreción, así como el mecanismo de acción de cada uno de sus componentes (Fig. A).

Las moléculas que componen éste sistema son las enzimas renina, convertidora de angiotensina I (ECA) y angiotensinasas; los péptidos angiotensina I (Ang I), angiotensina II (Ang II) y angiotensina III (Ang III); la globulina alfa 2 (Angiotensinógeno) y la hormona esteroide aldosterona. De manera resumida, el SRAA funciona de la siguiente manera:

1. La fuente principal de renina circulante es el riñón, específicamente las células del aparato yuxtaglomerular de cada nefrona.
2. En el plasma, la renina, actúa sobre el sustrato angiotensinógeno, el cual es sintetizado en hígado, y mediante una reacción hidrolítica, produce el decapeptido Ang I.
3. El decapeptido Ang I, que es biológicamente inactivo, es hidrolizado por ECA, que remueve el extremo carboxilo histidil-leucina, para así producir al octapeptido Ang II que tiene intensa actividad biológica.

FIG. A PRINCIPALES COMPONENTES DEL SRAA



4. La Ang II, es transformada, mediante la acción de la angiotensinasa A, a Ang III, la cual remueve el aminoácido del extremo amino (ácido aspártico) de la Ang II para formar el heptapéptido correspondiente. La Ang II tiene múltiples acciones biológicas entre las que se encuentran: la estimulación de la liberación de aldosterona de las glándulas suprarrenales, la inducción de la sensación de sed en el hipotálamo, la estimulación de la secreción de angiotensinógeno en el hígado; e inhibe la secreción de renina en las células yuxtglomerulares.

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

La renina es la enzima que desencadena la actividad y es limitante de la velocidad del SRAA, es sintetizada, almacenada y secretada por las células granulares del aparato yuxtglomerular de los riñones (Fig. B). Su estudio se inició desde su descubrimiento en 1898 por Tigersted y Bergman (citado en 3), quienes demostraron que se producían elevaciones repentinas y prolongadas de la presión sanguínea cuando se administraba a conejos extractos de riñón de la misma especie.

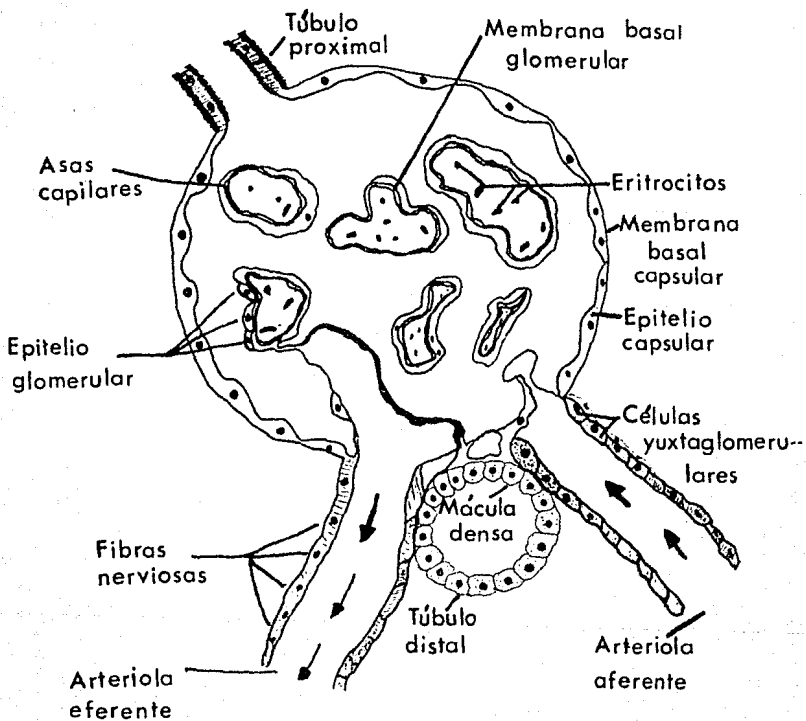


FIG.B DIAGRAMA DE UN GLOMERULO MOSTRANDO EL APARATO YUXTAGLOMERULAR

Debido a que en el tejido renal había gran cantidad de renina, se pensó que éste era el agente causal de la hipertensión, sin embargo, la importancia de la renina no fue valorada, sino hasta después de varios experimentos realizados por Goldblatt y cols. en 1934 (4), los cuales demostraron que la hipertensión tenía bases humorales y era de origen renal. Demostraron que una reducción moderada del flujo sanguíneo, producida al colocar una pinza en cada arteria renal, o bien, solo en una arteria, producía una forma de hipertensión arterial persistente parecida a la forma humana de la hipertensión. Posteriormente demostró que el sistema nervioso no participaba en la hipertensión experimental producida de esta forma y que si las venas renales se ligaban, la presión sanguínea del animal regresaba a valores normales y éste moría por uremia.

En la actualidad se han descrito al menos 5 mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina en riñón (5):

a) Un barorreceptor intrarrenal que responde a cambios en la presión sanguínea.

b) La cantidad del ión sodio (o posiblemente cloruro) que pasa por el segmento de la mácula densa del túbulo distal renal.

c) El sistema nervioso simpático y las catecolaminas circulantes.

d) Factores hormonales tales como Ang II, prostaglandinas, adenosina, esteroides, factor auricular natriurético y endotelina.

e) La concentración de los electrolitos plasmáticos (Ca⁺, K⁺, etc.).

Los mensajeros intracelulares que regulan la secreción de renina son AMPc, Ca²⁺, inositol trifosfato, y proteína cinasa C (6,7).

2. SÍNDROME NEFRÓTICO

El síndrome nefrótico (SN), es un padecimiento que se presenta en humanos de todas las edades, sin embargo en los niños el origen se desconoce, pero en los adultos puede ser secundario a una glomerulonefritis o a una intoxicación; además se puede inducir experimentalmente. Se caracteriza por proteinuria, hipoproteinemia, albuminuria, disminución de la presión coloidosmótica, ascitis, edema, lipiduria, retención de sodio, hipercolesterolemia e hiperlipoproteinemia (8-14).

El aumento en la permeabilidad glomerular a las proteínas plasmáticas inicia las alteraciones sistémicas metabólicas que caracterizan al SN. La hipoalbuminemia en SN es secundaria a un aumento en el catabolismo, y a la pérdida de albúmina por orina. Las consecuencias de la hipoalbuminemia son muchas (8), entre ellas destacan:

a) Hiperlipidemia: La hipoalbuminemia produce una disminución en la presión oncótica, lo que a su vez estimula la producción de lipoproteínas a nivel hepático. Este aumento, junto con una disminución en el catabolismo de las lipoproteínas, produce hiperlipoproteinemia.

b) Edema: La disminución en la presión oncótica, favorece el movimiento de fluidos del compartimiento vascular al intersticial causando edema y ascitis.

El aumento en la filtración de proteínas trae como consecuencia:

a) Disminución en la inmunidad humoral. Esto es secundario a la disminución en el nivel de inmunoglobulinas producida por pérdida de ellas en la orina y a una disminución en su síntesis, y a que el factor B del complemento disminuye. Al alterarse la inmunidad humoral, se modifica la inmunidad celular debido a la interacción de ambos procesos lo cual lleva a un aumento en la susceptibilidad a infecciones por organismos oportunistas (p.e. neumococos) que son causa de muerte en SN.

b) Deficiencia en elementos traza (Cu, Fe, Zn) que se pierden por la orina.

c) Alteraciones en el metabolismo hormonal, pues se pierden por orina proteínas acarreadoras tales como la globulina transportadora de tirosina.

d) Deficiencia de calcio y vitamina D.

e) Un estado hipercoagulable, secundario a alteraciones en casi todos los factores de la coagulación.

Los modelos experimentales usados para estudiar el SN son los producidos por inyección de:

- a) suero antirifón
- b) aminonucleósido de puromicina (ANP)
- c) adriamicina
- d) daunomicina

Debido a que el SN inducido en ratas con ANP se parece mucho al síndrome con lesiones mínimas encontrado en humanos, se ha utilizado como uno de los modelos para estudiar SN; los cambios en el SRAA han sido previamente caracterizados en este modelo (9,10,12-14). Se han descrito dos variantes de la nefrosis inducida por ANP, el modelo agudo y el modelo crónico (15). El modelo agudo, se induce por una o por varias inyecciones subcutáneas o intra-peritoneales que van de 50 a 150 mg/kg de peso corporal total, éstas inyecciones desencadenan una proteinuria masiva y SN al término de 7 a 14 días después de su aplicación; alrededor de 3 semanas, la proteinuria disminuye y desaparece a las 6 semanas; éste modelo es reversible.

El modelo crónico se induce por una o varias inyecciones intravenosas a bajas dosis (5 mg / 100 g) y se encuentra asociado a proteinuria crónica y daño irreversible.

Se piensa que los radicales libres, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido e hidroxilo, producidos durante el metabolismo del ANP son los responsables del daño celular.

El ANP es producido por la hidrólisis del residuo p-metoxitiro-sil que se encuentra unido al grupo amino del residuo aminorribosa del antibiótico puromicina; el aminonucleósido está relacionado estructuralmente a la adenosina; cuando se acetila el grupo amino del residuo aminorribosa no es nefrotóxico y se excreta sin cambio en la orina. No se metaboliza in vivo ni in vitro. Esto sugiere que el grupo amino es muy importante para producir el efecto nefrotóxico (ver Fig. C) (15).

Hasta ahora, el mecanismo por el cual el ANP produce daño renal se desconoce, sin embargo, hay evidencias que el metabolismo del ANP es indispensable para producir el daño renal. El ANP produce una reducción en la densidad de carga de las células epiteliales debido a que se pierden sialoproteínas y heparán sulfato proteoglucanos, que como se sabe, participan de manera importante en la función de la filtración de proteínas plasmáticas aniónicas (15).

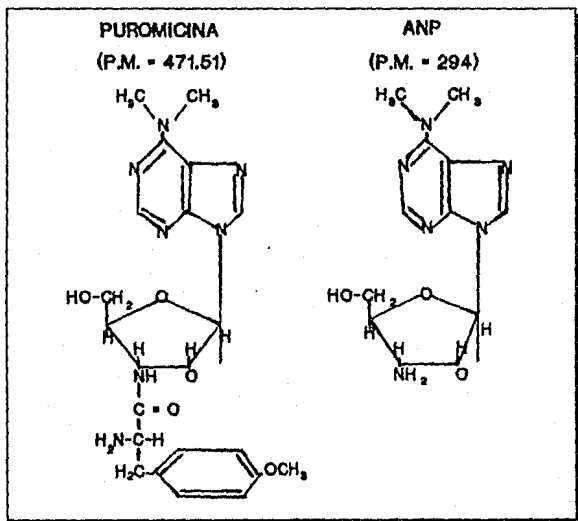


FIG. C ESTRUCTURA DE LA PUROMICINA Y DEL ANP

Fishman y Karnovsky (citado en 15), describieron recientemente los efectos del ANP en células epiteliales del riñón in vitro, y encontraron efectos directos sobre la membrana celular, presumiblemente, una desorganización proteico-lipídica asociada a desarreglos metabólicos, tales como un aumento de heparán sulfato proteoglucanos y una disminución en la glucosamina y sulfato en la superficie celular, esto lleva a la hipótesis de que el ANP produce un desarreglo en la barrera de carga (por las pérdidas de sialoproteínas y heparán sulfato proteoglucanos) y de tamaño que existen en la barrera de filtración glomerular. Observaciones por microscopía electrónica han revelado que las células epiteliales renales (podocitos) se encuentran fusionadas, indicando un serio daño estructural en todo el epitelio glomerular (dentro de la cápsula de Bowman) (15).

El efecto nefrotóxico del ANP es especie-específico, es decir, solo produce daño renal en rata y en humano pero no en conejos y en cobayos. En los perros produce proteinuria transitoria, sin llegar a causar todas las características del SN (15).

3. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA), fue descrita por primera vez del plasma de caballo por Skeggs y cols. en 1954 (16), ellos observaron que esta enzima convertía el decapeptido

angiotensina I, a un octapéptido: la angiotensina II; más tarde, Ng y Vane demostraron que ésta enzima era primordialmente responsable de la conversión in vivo de la angiotensina I circulante a angiotensina II en pulmón (citado en 16), poco después Erdős y cols. (citado en 17), encontraron en una fracción de homogenado de riñón de cerdo y también en una fracción de globulina de plasma humano, una enzima que inactivaba a la bradiginina al liberar el péptido Fen-Arg del extremo carboxilo; en un principio, ésta enzima fué llamada cininasa II, después se demostró que se trataba de la misma enzima descrita por Skeggs y cols. (18). Para demostrar esto, se usaron métodos de cromatografía y bioensayo con una enzima parcialmente pura e inhibidores específicos, posteriormente se obtuvieron las enzimas puras, lo cual permitió corroborar lo anterior (18).

También se ha visto que la ECA hidroliza a encefalinas y otros numerosos polipéptidos y tri-péptidos N-acilados (19).

3a. ESTRUCTURA

La enzima convertidora es una molécula proteica monomérica con un punto isoelectrico alrededor de 4.5, consiste de una cadena simple de aminoácidos y el centro activo de la enzima contiene zinc (20).

El peso molecular depende del tejido de origen y del método de determinación, para pulmón varía de 126 a 185 kDa por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes. Con técnicas de filtración en gel son valores mucho más altos (21).

Según la Enzyme Commission, su clasificación es E.C. 3.4.15.1., pertenece al grupo de las hidrolasas, ya que cataliza la ruptura hidrolítica de un enlace, "3"; es una péptido hidrolasa pues actúa sobre un enlace peptídico "4", libera un péptido de un polipéptido, por lo cual se le clasifica como una peptidil-dipéptido-hidrolasa "15", y debido a que corta el extremo C-terminal de sus sustratos se le considera una dipeptidil carboxipeptidasa; y su número progresivo es el "1" (22).

Cabe mencionar, que la estructura y comportamiento físico-químico de esta importante enzima, varía de acuerdo a la especie, por ejemplo, en el humano la enzima parece ser más hidrofóbica que en un extracto de pulmón o riñón de otra especie (23).

La enzima humana es una glucoproteína de una sola cadena que pesa alrededor de 140 kDa y que contiene aproximadamente un 25% de carbohidratos (16).

La ECA es una peptidasa transmembranal, con un ancla peptídica hidrofóbica insertada dentro de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (16). La ECA en testículo de conejo pesa alrededor de 100 kDa (21).

Se ha determinado el contenido metálico de la ECA por espectrofotometría de absorción atómica y se demostró la presencia de Zn, pero no de Mg, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Cd, y Mo ; contiene 1 átomo de zinc por mol de enzima el cual se requiere para su actividad catalítica, la función del átomo de Zn en la ECA es muy similar a la función del átomo de Zn en la carboxipeptidasa A y en la termolisina, de hecho, es una buena razón para sospechar que el mismo mecanismo catalítico funciona igualmente para las tres enzimas. Se ha sugerido que el residuo glutamilo del sitio activo tiene un papel catalítico análogo a la función del Glu-270 en la carboxipeptidasa A y el Glu-143 en la termolisina; el sitio de unión de la ECA contiene un residuo de arginina que interactúa con el grupo carboxilo del sustrato, tal como lo hace Arg-145 en la carboxipeptidasa A; la termolisina, siendo una endoproteasa, no requiere tal residuo (Fig. D). La ECA contiene un residuo de lisina que media el efecto de activación del cloro (24).

3b. LOCALIZACION Y DISTRIBUCION

La enzima se encuentra ampliamente localizada en la superficie de vasos sanguíneos y es abundante en pulmón, aunque también se encuentra en otros tejidos tales como sangre, riñón, testículos, corazón, e intestino (25-39). Se localiza también en vasos sanguíneos del iris de la rata (30), en ovarios, cerebro (31) y, recientemente se descubrió que también se encuentra en los fibroblastos de la piel en humano (32), así como en la corteza y la médula de riñón de rata (33), en el túbulo proximal (34), en la pared aórtica (35), y en el suero (36).

El origen de la enzima circulante no está esclarecido, sin embargo se ha sugerido que es liberada a la sangre durante el recambio normal de las membranas celulares que la contienen.

La enzima no solamente se considera como una parte esencial dentro del SRAA (37), sino que se le ha asociado, debido a su amplia localización, a otros sistemas hormonales que no están asociados con el SRAA, como en la hidrólisis de análogos de colecistocinina y gastrina liberando el dipéptido de carbono terminal amidado (38); además se le ha considerado esencial en la movilidad de espermatozoides, así como en los mecanismos de inmunidad (39).

Las enzimas que se encuentran en testículo y en pulmón difieren en estructura, y por tanto, son consideradas isoenzimas, cabe mencionar que la primera es catalíticamente similar a la segunda, sin embargo, la ECA de testículo aparece después de la pubertad y, a diferencia de la de pulmón, su tamaño es menor (40); las 2 proteínas difieren en sus grupos NH_2 - y COOH -terminal, esto se ha demostrado clonando la secuencia correspondiente de su ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) (41).

La distribución a nivel tisular de la ECA varía según la especie, por ejemplo en riñones de conejos, humanos y monos, se encuentra en mayor concentración en corteza comparada con la médula o papila; en cambio, en rata, parece ser que la concentración es mayor en la médula que en la corteza, en riñón de perro, la distribución de la ECA en la corteza no es homogénea, aumentando a medida que se acerca a la médula (42). En humano la ECA se distribuye en mayor cantidad en el aparato digestivo, principalmente en los intestinos, después en pulmón, ovarios, hígado, músculo, piel y suero (25).

La actividad de la ECA en el suero también varía según la especie siendo la actividad más alta en cobayo y la más baja en perro (43,44).

3c. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

La actividad de la ECA es dependiente de iones cloruro. Los grupos funcionales esenciales en el sitio activo de la ECA incluyen los aminoácidos arginina, tirosina, lisina, y ácido glutámico, y el complejo iónico de zinc (24,45). La lisina está involucrada en el mecanismo de activación por el ión cloro, que junto con otros aniones monovalentes aumentan la actividad hasta un grado límite que varía de acuerdo a la estructura del sustrato y al pH (24,45). La ECA es una proteína poco ácida, y es susceptible a desnaturalizarse por calentamiento (45). El pH fisiológico al que la ECA tiene su máxima actividad es alrededor de 8.0.

3d. SUSTRATOS ESPECIFICOS

Los requisitos que debe tener un sustrato para ser hidrolizado por la ECA son:

- 1) Ser un polipéptido que posea un C-terminal (45).
- 2) Tener un aminoácido cargado positivamente en la penúltima posición (46).

Los péptidos que contienen aminoácidos ácidos son pobres sustratos para la ECA, los péptidos con aminoácidos aromáticos son usualmente buenos sustratos (45).

En algunos casos, se ha visto que puede hidrolizar sustratos peptídicos amidados, como en el caso de la sustancia P, un neuropéptido que se encuentra en cerebro y que se ha identificado como neurotransmisor y modulador del sistema nervioso central y periférico (31), algunos análogos de la colecistocinina y la gastrina (38), a la luliberina (enzima liberadora de la hormona luteinizante), y a otras encefalinas amidadas (38).

Se han encontrado sustratos con importancia biológica potencial además de las cininas, Ang I o encefalinas, como por ejemplo, la neurotensina, un tridecapéptido, que es mas largo que los otros sustratos de ECA, sin embargo, este es hidrolizado in vitro mediante la ruptura del dipéptido C-terminal Ile-Leu (23).

Se han fabricado numerosos sustratos sintéticos tales como hipurato de histidil leucina (HHL) e hipurato de glicil glicina (HGG); los ensayos para medir la actividad de la ECA se basan en la medición de la cantidad de dipéptido liberado del sustrato, o bien, en la porción N terminal protegida por la molécula hidrolizada del sustrato (44,47). El dipéptido puede medirse por un método de flujo continuo automatizado, en un analizador de aminoácidos o en un contador de radiaciones (si el dipéptido fue marcado con un isótopo radiactivo), o bien a un fluorómetro (después de unir el residuo histidil a un compuesto fluorescente) (44).

El ácido hipúrico (AH) liberado de sustratos tales como HHL o HGG, se puede medir después de la extracción en la mezcla de incubación con un solvente orgánico o registrando directamente su liberación en el espectrofotómetro (44).

3e. INHIBIDORES

La ECA es inhibida por numerosos compuestos, entre ellos están los dipéptidos liberados de la Ang I o de la bradicinina (His-Leu y Fen-Arg respectivamente); agentes quelantes como EDTA, o-fenantrolina y 8-hidroxiquinolina; compuestos sulfhidrilo (SH); análogos estructurales de la Ang I modificados en algunas posiciones de la cadena polipeptídica; insulina; glutatión; los 9 péptidos derivados del veneno de Bothrops jararaca (una especie de serpiente) algunos de los cuales ya se han obtenido sintéticamente; captopril (SQ 14,225) y otros análogos que han sido usados como drogas antihipertensivas, y han mostrado ser inhibidores efectivos (45).

El desarrollo de inhibidores específicos de la ECA, ha puesto de manifiesto la importancia del SRAA en el desarrollo de la hipertensión; los primeros estudios con péptidos en venenos de serpientes demostraron que la inhibición de la ECA podía proporcionar una vía para el manejo de la hipertensión (45).

estos estudios culminaron con la síntesis del captopril, que es el inhibidor específico más efectivo de la ECA ya que la inhibe a concentraciones nanomolares y es altamente competitivo y reversible. Este inhibidor se ha empleado para establecer la identidad de la ECA en estudios *in vitro*, y para bloquear la conversión de Ang I o la inactivación de una cinina *in vitro* (44).

En 1989, Ikemoto y cols. (48), identificaron una sustancia en el corazón de rata que inhibe a la ECA, este inhibidor tiene una localización endógena y puede modular la actividad de ECA en respuesta a las alteraciones en el balance de oxidación-reducción en el tejido, y parece ser una proteína con grupo sulfhidrilo.

Los inhibidores con un grupo sulfhidrilo son también muy efectivos ya que se unen iónicamente al sitio activo de la ECA cargado positivamente y el segundo carboxilo del inhibidor interacciona fuertemente con el ión Zn catalíticamente funcional de la ECA, por lo tanto, estos inhibidores actúan ligando fuertemente al Zn (45).

4. ECA Y ENFERMEDAD

Se ha observado que la ECA está reducida en suero en pacientes con cáncer pulmonar, tuberculosis, y fibrosis quística; por el

contrario, los individuos que tienen sarcoidosis e histoplasmosis, muestran niveles séricos elevados de la ECA, esto parece estar asociado al proceso activo de la enfermedad; en otras enfermedades también se han observado niveles elevados de ECA como en la lepra y en la enfermedad de Gaucher; en la sarcoidosis se ha propuesto como herramienta auxiliar de diagnóstico (citado en 44).

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

En estudios previos (9,12,44,49) se encontró que la actividad sérica de la ECA aumenta en ratas con SN experimental inducido con ANP. Sin embargo, los mecanismos involucrados en este aumento no están esclarecidos. Tampoco se sabe si la actividad tisular de la ECA cambia en éstas ratas y si la ECA se pierde por la orina en este modelo experimental reversible.

En otros experimentos con este mismo modelo (12,13,14) se ha seguido secuencialmente el desarrollo de la enfermedad enfocada al comportamiento de los componentes del SRAA, lo que permitió caracterizarlo y estudiarlo con facilidad logrando así separar varias etapas durante su desarrollo después de la inyección:

- a) La etapa prenefrótica que va desde los días 0 a 2.
- b) La etapa nefrótica que inicia el día 6 y continúa hasta el día 14.
- c) La etapa de remisión que se inicia el día 15 y que continúa hasta que desaparece la proteinuria.

Conociendo lo anterior, el empleo de éste modelo en el presente trabajo facilita de manera importante el estudio de la actividad de la ECA durante el transcurso de estas etapas en suero, orina y en tejidos, por lo cual se eligieron los días 2, 6, 11 y 16.

Debido a que se demostró la presencia de la ECA en varios tejidos (28-36) tales como pulmón, corazón, riñón, intestino, aorta, cerebro, glándulas suprarrenales y testículos así como en suero, resulta interesante conocer la actividad de la ECA que presentan durante el curso del SN, para tratar de esclarecer si estos tejidos contribuyen o no a elevar la actividad de la ECA en suero, si hay algún mecanismo que dispare este aumento, o si existe alguna relación con la proteinuria.

III. HIPOTESIS

III. HIPOTESIS

- El aumento en la actividad de la ECA en el suero de ratas con SN experimental puede deberse a cambios en la actividad tisular de la enzima.
- Ya que hay una pérdida urinaria abundante de proteínas plasmáticas en estas ratas, es posible que la ECA circulante se pierda también por orina.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Medir la actividad urinaria y sérica de ECA y estudiar su relación con la proteinuria en ratas con SN experimental los días 2, 6, 11 y 16, después de la inyección del ANP.
- Investigar si la actividad de ECA se altera en pulmón, corazón, riñón, intestino delgado, cerebro, aorta, glándulas suprarrenales, y testículos, los días 2, 6, 11 y 16, después de la inyección de ANP.

V. MATERIALES Y METODOS

V. MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

Los siguientes reactivos se compraron de Sigma Chemical Co.: reactivo de Folin & Ciocalteu, ANP, albúmina sérica bovina (ASB), HHL no radiactivo, Nonidet P-40 y Tris-HCl; el HHL radiactivo se compró de DuPont, New England (Boston, Mass.); los demás reactivos fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se usaron ratas machos (Rattus norvegicus; cepa Wistar) con un peso inicial de 90-110 g de peso.

El síndrome nefrótico se indujo con una inyección subcutánea única de una solución de ANP al 2% en solución salina (15 mg/100 g, refs. 9-10, 12-14, 49). Los animales control recibieron el mismo volumen de vehículo (solución salina). Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas durante el estudio; las ratas fueron sacrificadas por decapitación los días 2, 6, 11, y 16 después de la inyección del vehículo ó del ANP. En éstos días se obtuvieron sangre y los siguientes tejidos: glándulas suprarrenales y una porción de cerebro, pulmón, intestino delgado, testículo, aorta, corazón, y riñón. El suero, la orina y los tejidos se congelaron a -70°C , hasta que se determinó la actividad de ECA y la cantidad de proteínas.

Los datos obtenidos de las ratas control los días 2, 6, 11 y 16 después de la inyección del vehículo fueron idénticos, y por lo tanto se reunieron en el mismo grupo (grupo control).

3.DETERMINACION DE PROTEINAS: Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry (50), para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

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

Solución B. Sulfato de cobre al 0.5%.

Solución C. 50 ml de solución A más 1 ml de solución B (se prepara al momento de usarse).

Solución D. Reactivo de Folin & Ciocalteu 1 N. Se prepara a partir de la solución concentrada 2 N.

Solución E. Albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 mg/ml. Se prepara una curva patrón con esta solución de 5 hasta 50 μg .

La solución de albúmina o la muestra se colocan en un volumen final de 0.2 ml, a todos los tubos se les agrega 1 ml de solución C, se agitan y se dejan reposar 10 minutos, después se les agrega 0.1 ml de solución D mientras se están agitando vigorosamente, después de 30 minutos se lee la densidad óptica a 660 nm.

Antes de cuantificar las proteínas urinarias, estas recibieron el siguiente tratamiento: se precipitaron y se lavaron con ácido

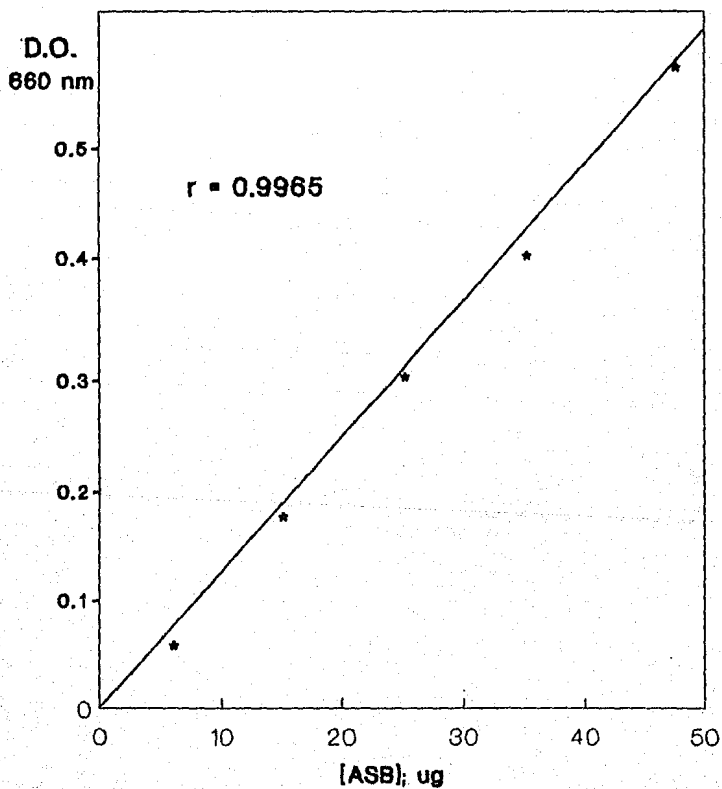
tricloroacético (ATA) al 10%, mezclando 0.1 ml de orina y 1.9 ml de ATA, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos, se decantó y se volvió a repetir esta misma operación 2 o 3 veces, hasta que el sobrenadante quede transparente, finalmente se decantó y el precipitado se resuspendió en 2 ml de NaOH 0.1 M.

A los sueros se les hizo una dilución 1:400, de ésta dilución se tomaron 0.2 ml para cuantificar proteínas. Para los tejidos (sobrenadante) se les hizo una dilución previa, según el tejido, y después se tomó 0.2 ml para cuantificar proteínas. La curva patrón se muestra en la Fig. E. Los resultados de proteínas en orina se expresan en mg/24 h, en suero se expresan en mg/dL y en los tejidos en mg/ml.

4. EXTRACCION DE ECA EN LOS TEJIDOS

Los tejidos (aproximadamente 1 g excepto glándulas suprarrenales y aorta, que por su tamaño se extrajeron totalmente) se descongelaron y se homegenizaron (en 5 ml excepto glándulas suprarrenales y aorta que se homogenizaron en 1 ml) durante 30 segundos con un homogenizador de tejidos (marca politrón) en una solución amortiguadora de la siguiente composición: Tris-HCl 0.1 M pH 7.8, KCl 30 mM, MgCl 5 mM, sacarosa 0.25 M y nonidet P-40 al 0.1% (51.52), se dejó reposar toda la noche a 4°C y se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 minutos a 4°C; el sobrenadante se separó en tres alícuotas, para determinar proteínas y ECA.

Fig. E CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.



5. DETERMINACION DE ECA: La actividad de ECA, se midió usando como sustrato hipurato de histidil leucina (HHL) (43,44), y se utilizó un método radioquímico (53), porque tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad y rapidez del método, en este ensayo se emplea una mezcla de HHL radiactivo y HHL no radiactivo; el HHL radiactivo esta marcado con $^{14}\text{-C}$. La ECA hidroliza al HHL en histidil-leucina y en ácido hipúrico (AH) (Ver Fig. F). El AH radiactivo liberado se extrae con acetato de etilo y se cuenta en un contador de radiaciones beta.

- Inmediatamente antes del ensayo se mezclaron 3.5 μl de HHL $^{14}\text{-C}$ (3 mCi/mmol; 0.0177 nmoles, 77,000 desintegraciones por minuto (dpm)) y 3.5 μl de HHL no radiactivo 68.1 mM (preparado en etanol:agua 6:4) por cada tubo del ensayo. La concentración final de HHL fué 5 mM.

- La mezcla se secó bajo una corriente de nitrógeno y se resuspendió en 40 μl (por tubo) de amortiguador Tris-HCl 0.125 M, NaCl 0.6 M pH 8.3.

- Para cada muestra se usaron 4 tubos, 2 para el blanco y 2 para el problema (de preferencia tubos cónicos)

- A todos los tubos se les agregó 10 μl de la muestra como máximo.

- En los tubos blanco se agregaron 50 μl de HCl 1 M.

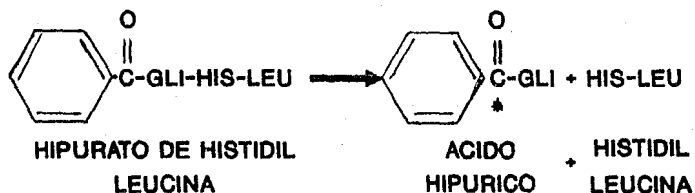


FIG. F REACCION EN LA QUE SE BASA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA

- A todos los tubos se les agregó 40 μ l del sustrato-amortiguador.
- Se incubó a 37°C en un baño de incubación.
- Al final de la incubación se adicionaron 50 μ l de HCl 1 M a los tubos problema.
- Se agregaron 300 μ l de acetato de etilo con un repipeteador a todos los tubos, empezando por los que contienen el blanco.
- Se agitaron vigorosamente en un vórtex por 15 segundos.
- Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente por 15 minutos a 2,500 rpm.
- Se separaron 200 μ l de la fase orgánica (superior) y se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo en un frasco para contar radiaciones beta.
- Los frascos se contaron en un contador de radiaciones beta y la actividad de ECA se calculó restando las dpm del blanco a las dpm del problema, usando la siguiente fórmula:

$$\text{mU/ml} = \frac{\text{dpm problema} - \text{dpm blanco}}{\text{AE} \times 0.91 \times 0.67 \times t \times v} = \text{nmoles de AH/ml/min}$$

donde:

AH = Acido hipúrico

AE = Actividad específica (308 dpm/nmol)

0.91 = Recuperación de AH

0.67 = Fracción contada de AH

t = Tiempo de incubación (en minutos)

v = Volumen de incubación (en ml)

Una unidad de ECA es la cantidad de enzima que produce un nanomol de AH/ml/min de incubación a 37°C. Los resultados están expresados en miliunidades/mg de proteína en 1 ml.

6. PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD

a) Interanálisis: Se realizó la determinación de la actividad de la ECA de una misma mezcla de sueros de ratas normales en diferentes ensayos y se calculó el coeficiente de variación (CV).

b) Intraanálisis: Se realizó la determinación de la actividad de la ECA de una misma mezcla de ratas normales 10 veces dentro de un mismo ensayo y se calculó su CV.

7. CURVAS DE LINEARIDAD

Antes de estudiar la actividad de la ECA en orina, suero y los

diferentes tejidos, se seleccionó la cantidad de muestra y el tiempo de incubación a usar; debido a que el volumen en el ensayo radioquímico usado es de 10 μ l como máximo, las curvas que se construyeron fueron a diferentes volúmenes de muestra; es decir eran de 2.5, 5, 7.5, y 10 μ l, completando a 10 μ l, con solución salina al 0.9%, con un tiempo de incubación que variaba según el tipo de muestra; estas curvas se repitieron 5 veces (n=5) y se calculó el índice de correlación (r). Se seleccionó el punto medio de cada recta, para medir la actividad de ECA en todas las muestras de los grupos experimentales. El análisis de correlación entre la actividad de la muestra y el volumen fué calculado por el método de mínimos cuadrados en una calculadora Hewlett Packard modelo 32E.

B. PRUEBAS DE INHIBICION

Con el fin de asegurarse que en el ensayo radioquímico se estuviera midiendo la actividad de la ECA, a las muestras se les agregó un inhibidor específico de esta enzima (captopril, 10 μ M) 10 minutos antes de correr el ensayo.

9. ANALISIS DEL PRECIPITADO DEL HOMOGENADO DE TEJIDOS

Para cuantificar la cantidad de ECA que pudiera haberse quedado después de extraerse el sobrenadante de los tejidos, se midió la actividad de ECA al precipitado, para ver que tan efectiva había resultado la aplicación del detergente nonidet-P40, que sirve para liberar a la ECA unida a la membrana.

10. ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar. Se hicieron análisis de varianza de una vía (ANDEVA) con el propósito de investigar si había grupos diferentes del control. El ANDEVA se realizó usando una calculadora Hewlett Packard modelo 41CV. Debido a que el ANDEVA solo indica si existe o no diferencia significativa entre los grupos, pero no señala los grupos diferentes al grupo control es necesario realizar otro análisis, por lo tanto se escogió el método de Bonferroni (citado en 54), el cual se basa en el uso de valores de t modificados; mediante estos valores se puede observar que grupo experimental difiere del grupo control. Una $P < 0.05$ se consideró significativo.

10.1 Coeficiente de Variación (CV). El CV se calcula de la siguiente manera:

desviación estandar

----- X 100

promedio

y se expresa en %

10.2 CORRELACIONES. Se realizó una correlación entre la excreción total de ECA y la proteinuria por el método de mínimos cuadrados.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD

El CV de las pruebas intra e interanálisis de la determinación de ECA fueron menores al 5% (n=50) y menores al 8% (n=20), respectivamente. (n = número de ratas)

2. CURVAS DE LINEARIDAD

Se probó la linealidad ($r = 0.99$) de la actividad de la ECA en suero y tejidos de ratas normales y en orina de ratas nefróticas (Fig. 1), estas curvas se hicieron 5 veces y de acuerdo a esto se eligieron las condiciones de ensayo óptimas como se muestran en las tablas I y II.

FIG. 1 CURVAS DE LINEARIDAD DE ACTIVIDAD DE ECA EN SUERO,
ORINA Y VARIOS TEJIDOS DE RATA

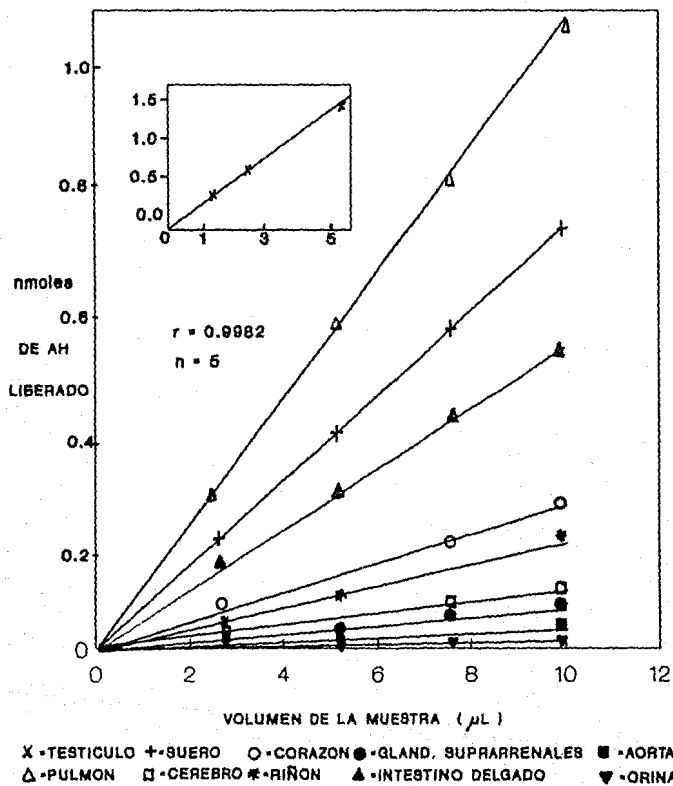


TABLA I.- CONDICIONES OPTIMAS DE ENSAYO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ECA EN SUERO Y ORINA DE RATA.

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD (μ L)	TIEMPO DE INCUBACION (minutos)
SUERO	5	5
ORINA	10	60

TABLA II.- CONDICIONES OPTIMAS DE ENSAYO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ECA EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATA.

TEJIDO	CANTIDAD (μ L)	TIEMPO DE INCUBACION (minutos)
PULMON	10	5
TESTICULOS	5	10
RINON	10	20
INTESTINO DELGADO	10	20
CEREBRO	10	20
CORAZON	10	20
GLANDULAS		
SUPRARRENALES	10	30
AORTA	10	30

3. PRUEBAS DE INHIBICION

Al realizar el ensayo radioquímico en los tejidos en presencia de captopril, se obtuvo una inhibición del 98%.

4. ANALISIS DEL PRECIPITADO DEL TEJIDO DESPUES DE AGREGAR NONIDET

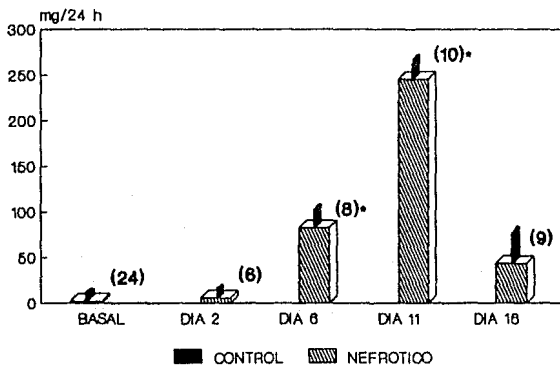
P-40

El ensayo mostró que se había extraído más del 95% del total de la enzima en todos los tejidos, lo que indica, que este detergente ayudo a extraer casi en su totalidad a la ECA que se encontraba unida a la membrana y que los resultados de la actividad de la ECA son representativos.

5. GRAFICAS

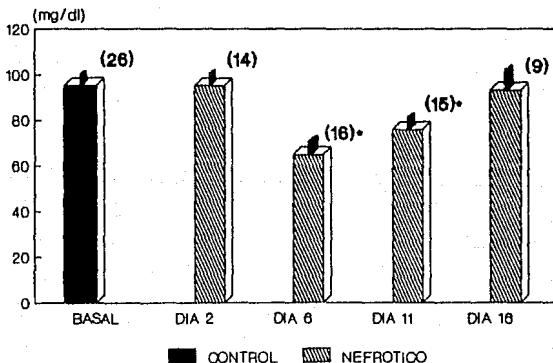
5.1 PROTEINAS. En las Figs. 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de proteínas en orina y en suero. Se observó proteinuria e hipoproteinemia en los días 6 y 11. La proteinuria disminuyó significativamente el día 16, aunque no desapareció totalmente. En el día 2 las ratas no proteinuria o hipoproteinemia (etapa prenefrótica).

Fig. 2 PROTEINAS EN ORINA DE RATA



(*)-n (*)-P < 0.05

Fig.3 PROTEINAS EN SUERO DE RATA



(*)-n (*)-P < 0.05

5.2 ACTIVIDAD DE ECA EN ORINA Y SUERO

En las Figuras 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos de actividad de ECA en orina y en suero respectivamente.

La actividad de ECA en suero aumentó los días 2, 6, y 11 (fig.5) y en orina los días 6, 11 y 16 (fig. 4). Los valores máximos de la actividad de ECA en suero y en orina se obtuvieron el día 6.

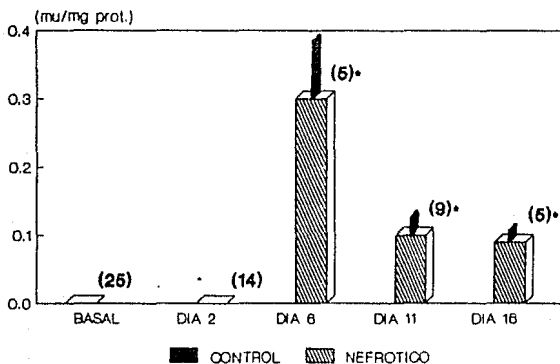
No se detectó actividad de ECA en la orina de las ratas control y en las inyectadas con ANP el día 2.

5.3 CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE ECA EN ORINA Y PROTEINURIA

En la figura 6 se muestra la correlación que se obtuvo de 25 ratas de los grupos nefróticos, que son las que mostraron tener actividad de ECA.

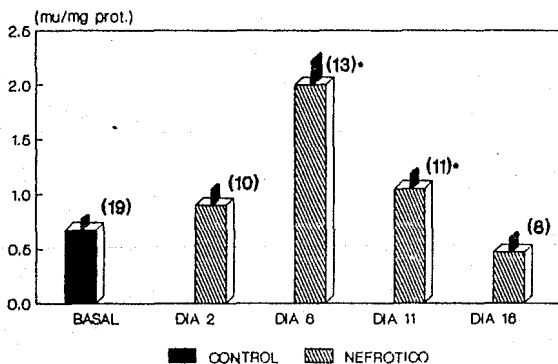
Se obtuvo un índice de correlación (r) = 0.6856, y una $P < 0.05$.

**Fig. 4 ACTIVIDAD DE ECA
EN ORINA DE RATA**



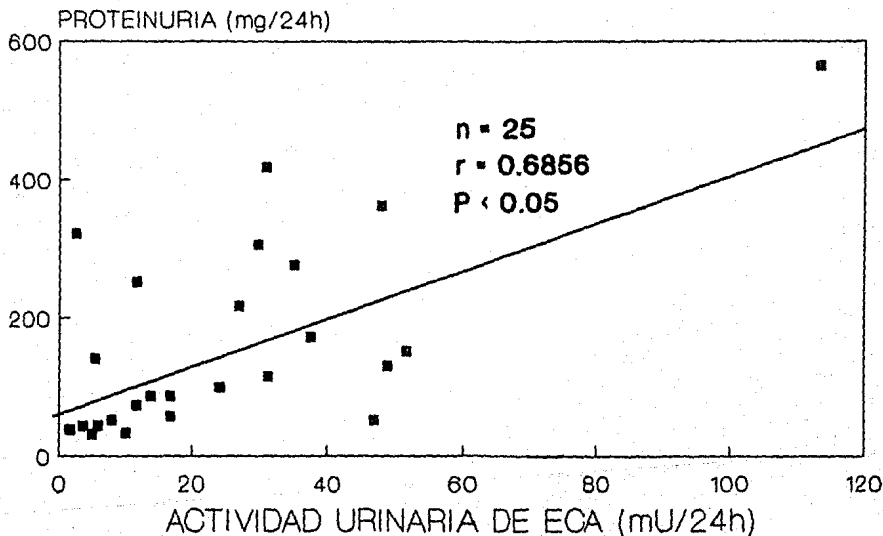
(*)-n-P<0.05

**Fig. 5 ACTIVIDAD DE ECA
EN SUERO DE RATA**



(*)-n-P<0.05

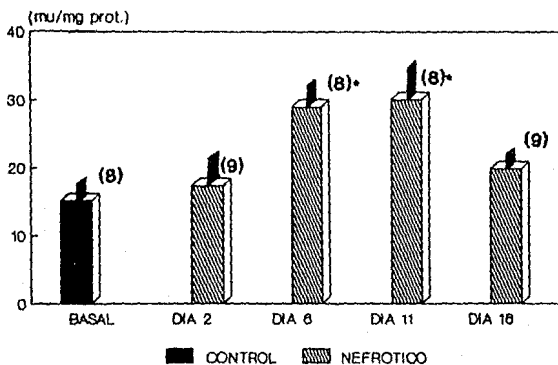
FIG. 6 CORRELACION ENTRE ACT. URINARIA DE ECA Y PROTEINURIA



5.4 ACTIVIDAD DE ECA EN TEJIDOS

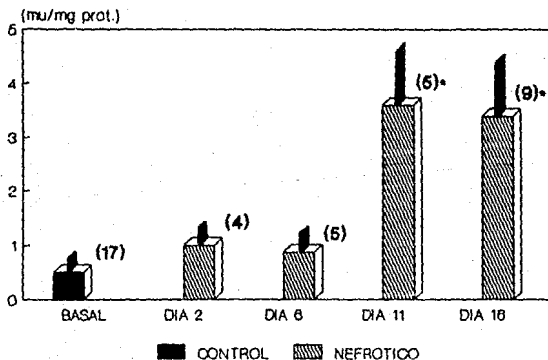
En las figuras 7 - 14 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de ECA en tejidos. La actividad de ECA en pulmón, riñón, intestino delgado, testículo, aorta y glándulas suprarrenales aumentó después de la inyección del ANP (Figs. 7, 8, 9, 10, 11 y 12, respectivamente). Sólo en testículo la actividad de la ECA (Fig. 10), aumentó antes de la proteinuria, en los otros tejidos el aumento fue durante la proteinuria (días 6, 11 o 16). La actividad de ECA en cerebro y corazón (Figs. 13 y 14 respectivamente) mostró un patrón bifásico; primero se observó una disminución (corazón en el día 2, y cerebro en el día 6) y segundo un aumento (cerebro en el día 11 y corazón el día 16).

Fig. 7 ACTIVIDAD DE ECA EN PULMON



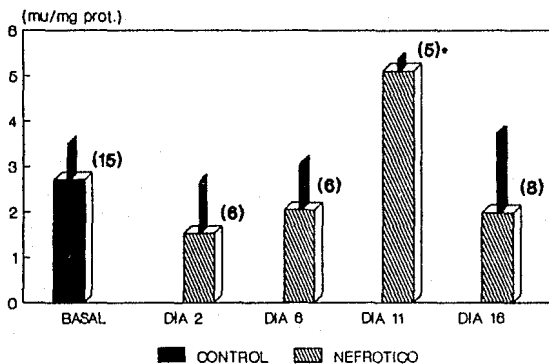
(-) n (-) P < 0.05

Fig. 8 ACTIVIDAD DE ECA EN RIÑON



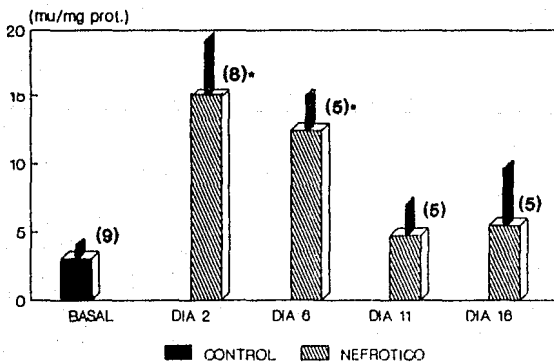
(-) n (+) P < 0.05

Fig. 9 ACTIVIDAD DE ECA EN INTESTINO



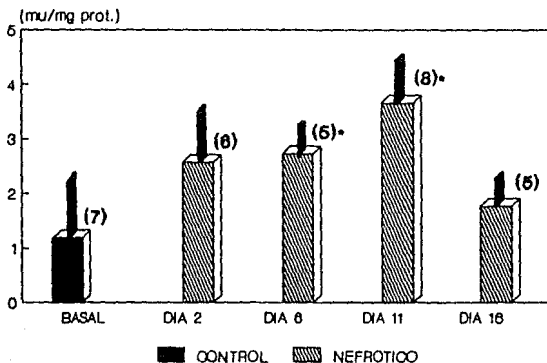
(*)-n (*)-P<0.05

Fig.10 ACTIVIDAD DE ECA EN TESTICULO



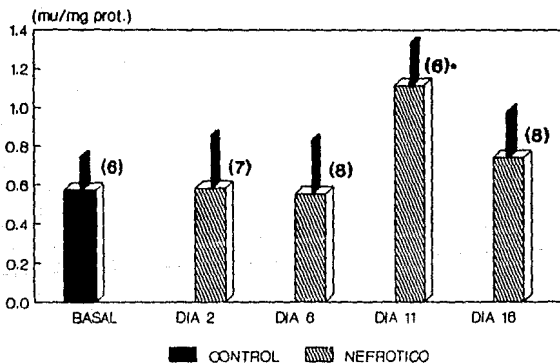
(*)-n (*)-P<0.05

Fig. 11 ACTIVIDAD DE ECA EN AORTA



(*)-n (*)-P<0.05

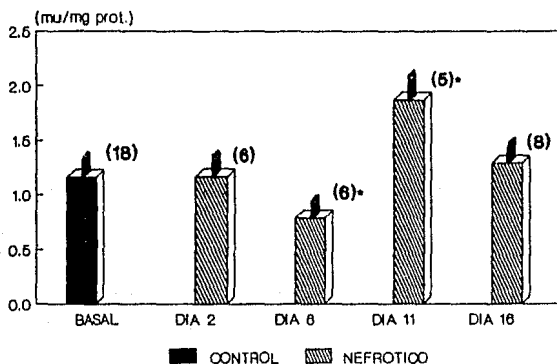
Fig. 12 ACTIVIDAD DE ECA EN GLANDULAS SUPRARRENALES



(*)-n (*)-P<0.05

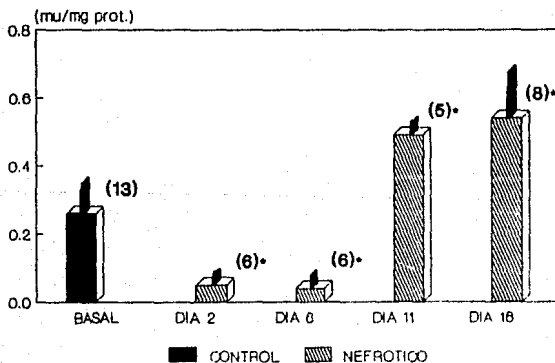
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 13 ACTIVIDAD DE ECA EN CEREBRO



(*)-n (*)-P<0.05

Fig. 14 ACTIVIDAD DE ECA EN CORAZON



(*)-n (*)-P<0.05

VII. DISCUSSION

VII. DISCUSION

En los últimos años se ha demostrado que la ECA no solo juega un papel importante dentro del SRAA, sino en otros sistemas de regulación hormonal y metabólica (39).

La actividad de la ECA en diversas enfermedades tales como SN experimental inducido con ANP resulta importante pues no se tiene información si los tejidos presentan algún cambio en la actividad de esta enzima y si esta actividad contribuye a elevar la actividad en suero y en orina de ratas con éste modelo, aunque se conoce que en el suero la actividad de la ECA se encuentra elevada (14,44-49); en el presente trabajo se aportan datos acerca de la actividad de la ECA en orina, suero y diversos tejidos de ratas con SN inducido con ANP.

Los resultados obtenidos confirman datos previos en el sentido de que el aumento de la actividad de la ECA es reversible en ratas con SN inducido con ANP (9-12). Además se encontró que existen cambios en la actividad de la ECA en tejidos y en orina de éstas ratas. El estudio secuencial muestra que los cambios en la actividad de la ECA son tiempo-dependientes y tejido-específicos. En éstas ratas la actividad de la ECA durante la etapa prenefrótica (día 2), solamente aumentó en testículo, mientras que durante esta misma etapa, los demás tejidos no tuvieron cambios, a excepción del corazón que disminuyó; en la etapa nefrótica (días 6 y 11) la actividad de la ECA aumenta en pulmón y aorta, en el día 6 el riñón, intestino delgado y las glándulas

suprarrenales, no mostraron cambio alguno, sin embargo, la actividad de ECA en corazón y en cerebro disminuyó, en el día 11. La actividad de la ECA se elevó drásticamente en riñón, intestino delgado, aorta, glándulas suprarrenales y corazón, para después, en la etapa de remisión del SN (día 16), disminuir la actividad a excepción del riñón y del corazón, que aún mostraban valores elevados todavía mayores que el día 11.

El mecanismo involucrado en el aumento de la actividad de la ECA en el suero de ratas con SN inducido con ANP es multifactorial. Se ha informado que los inhibidores de la ECA (55) y las hormonas tiroideas (56) aumentan la actividad de ECA en suero. En este trabajo, este aumento no se debió a inhibidores de la ECA, ya que las ratas no fueron tratadas con éstas drogas. Glass et al. (57), encontraron un aumento en triiodotironina en ratas con SN inducido por ANP por lo que no se descarta la posibilidad de que las hormonas tiroideas jueguen un papel importante en el aumento de la actividad de la ECA en ratas nefróticas.

Otros autores sugieren que el aumento en los niveles circulantes de la ECA en diversas patologías se puede deber a un daño en el endotelio vascular (58-60), una hiperproducción de la ECA a nivel tisular (61,62), y una disminución del catabolismo hepático de ECA (63).

Se ha informado que el ANP produce lesiones en el corazón (64) y en el hígado (65), y que, probablemente, este daño está mediado por radicales libres (66-67). El aumento de ECA en suero en el día 2 puede ser ocasionado por la liberación de la enzima desde los tejidos o desde el endotelio vascular dañado por el ANP. De hecho, la actividad de ECA en corazón disminuye en los días 2 y 6, lo cual puede ser el resultado secundario de la liberación ocasionada por un efecto tóxico del ANP sobre este tejido.

De manera interesante, el daño pulmonar inducido por otras sustancias tóxicas como la tiourea (58) o el paraquat (59) causa una disminución en la actividad pulmonar y sérica de la ECA. El contenido de la ECA en corazón se eleva los días 11 y 16. Esto muestra que el efecto del ANP sobre el corazón es reversible.

Además, ya que el ANP produce daño hepático antes de la aparición de proteinuria (64), es posible que el hígado de estas ratas tenga un catabolismo de ECA disminuido, lo cual por sí solo pueda contribuir a aumentar los niveles de la actividad de la ECA en suero. Sin embargo, no se conocen los sitios en donde la ECA se cataboliza, por lo tanto, este mecanismo requiere ser estudiado adicionalmente.

La actividad de la ECA en testículo aumenta en el día 2, sugiriendo un efecto directo del ANP sobre éste tejido. Se desconoce si el aumento de la actividad de la ECA en testículo contribuye al aumento en la actividad en el suero en éste día. La razón por la cual el ANP tiene efectos contrarios sobre la actividad de la ECA en corazón y en testículo es incierta. No hay estudios de daño comparativo producido por el ANP en diferentes tejidos.

El aumento en la actividad de la ECA observado en otros tejidos en los días 6 y 11 pueden contribuir al aumento de la actividad de ECA en suero en estos días. Otros autores han encontrado una relación estrecha entre el aumento de la actividad de la ECA en suero y en la actividad en pulmón en ratas tratadas con captopril (55). Además la hiperproducción de la ECA en los tejidos sugiere que puede actuar como mediador en el aumento de la actividad de ECA en suero en la enfermedad de Gaucher (62), y en la sarcoidosis (61).

De manera interesante no todos los estímulos que aumentan la actividad celular de la ECA, aumentan la actividad de ECA en el suero o en los medios de cultivo de la ECA (68,69).

Los mecanismos responsables del aumento de la actividad de la ECA en los tejidos en las ratas con SN por ANP no están esclarecidos aún. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Ingelfinger et al. (70), quienes encontraron que la actividad de la ECA se encuentra elevada en el riñón, 2 semanas después de la inyección del ANP, y que la actividad de la ECA en el suero no cambia en esta etapa del síndrome.

En este trabajo se esperaba encontrar que la actividad de la ECA en riñón disminuyera el día 2, debido al daño del ANP sobre los túbulos renales, pues se conoce que los túbulos renales contienen gran cantidad de ECA, pero no sucedió así, sino que la actividad de la ECA se mantuvo dentro de lo normal, hasta el día 11 en que se encontró un aumento notable, y aún en el día 16 se encuentra elevada. Se ha demostrado recientemente que otros componentes del SRAA se excretan por la orina de éstas ratas, como renina y angiotensinógeno (71). También se encontró actividad de la ECA en la orina de ratas nefróticas, pero no en ratas control o en ratas del día 2, con o sin diálisis, esto puede deberse a que la ECA en estas ratas se encuentra en concentraciones muy bajas en la orina; sin embargo, no hay otros informes de actividad de ECA en ratas normales, sólo hay información de actividad de ECA en humanos normales (72), la cual

se deriva probablemente de los túbulos renales y no del plasma, como lo sugiere el hecho de que aumenta por infecciones renales, una función anormal tubular, poliuria o trasplante renal (73,74).

En ratas tratadas con ANP, la ECA puede provenir del suero, esta idea se basa en el hecho de que la ECA urinaria no aumenta en ausencia de proteinuria y por el hecho de que la ECA urinaria muestra una correlación positiva con la proteína urinaria.

Otra posibilidad es que la ECA en orina provenga del riñón como consecuencia del daño producido por el ANP a los túbulos renales; sin embargo es poco probable ya que la ECA no se excretó durante el periodo prenefrótico (día 2), en donde se esperaría que el daño tubular fuera evidente; además de que la actividad de la ECA en riñón no disminuyó en el día 2.

En resumen, los resultados obtenidos indican que los cambios que ocurren en la actividad de la ECA en los tejidos contribuyen a elevar la actividad de la ECA en suero en ratas con SN inducido con ANP.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

Las ratas con síndrome nefrótico experimental inducido con ANP muestran grandes alteraciones en la actividad de la ECA en suero, orina y en los tejidos estudiados.

Las grandes variaciones observadas en los tejidos pueden ser causadas por daño tisular producido por ANP ó por aumento en la biosíntesis de la enzima. Estos cambios en los tejidos pueden contribuir a aumentar los niveles circulantes de la enzima en el suero de estas ratas. El estímulo que dispara la biosíntesis de la ECA en los tejidos no está claro aún.

El origen de la ECA en la orina de las ratas es, muy probablemente, la enzima del suero. Esto es apoyado por el hecho de que existe correlación en la enzima excretada y la proteinuria, y por el hecho de que en ausencia de proteinuria no hay enzima en orina.

Por último, la pérdida de la ECA en orina puede ser un estímulo que dispare la biosíntesis de la enzima.

IX. REFERENCIAS

IX. REFERENCIAS

1. Valloton MB. The renin angiotensin system. Trends Pharmacol Sci 1987;8:69-74.
2. Ballerman BJ, Levenson DJ, Brenner BM. Renin, angiotensin, kinins, prostaglandins and leukotriens. En Brenner BM, Rector JR, FC eds. The Kidney, Philadelphia; Saunders, 1986:281-304.
3. Peach MJ. Renin angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action. Physiol Rev 1977;57:313-370.
4. Goldblatt H, Lynch J, Haizal RF y Summerville WW. Studies on experimental hypertension. I Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. J Exp Med 1934;59:347-379.
5. Keeton TK, Campbell. The pharmacological alteration of renin release. Pharmacol Rev 1980;32:81-227.
6. Pedraza-Chaverri J, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E. Mensajeros intracelulares en la regulación de la secreción de renina. Rev Invest Clin 1989:165-176.

7. Moreno-Muñiz SI. Regulación intracelular de la secreción de renina. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 1989.

8. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: Pathophysiology and complications. En: The nephrotic syndrome; editado por Brenner & Steven, Churchill, Livingstone 1982;9:85-114.

9. Chávez-Ponce MT. Caracterización del sistema renina angiotensina aldosterona en el síndrome nefrótico experimental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1988.

10. Cruz-Rivera C. Efecto del captopril (SQ 14,225) sobre el desarrollo del síndrome nefrótico experimental en ratas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1988.

11. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico. En: Nefrología. Martínez-Maldonado M, Rodicio-Díaz JL, Herrera-Acosta J, eds. 1990. En prensa.

12. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodium retention. Rev Invest Clin 1990:42(1). En Prensa.
13. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. In vitro release of renin, angiotensinogen and aldosterone. Rev Invest Clin 1990:42(2). En prensa.
14. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on proteinuria and sodium retention. Rev Invest Clin 1990:42(3). En prensa.
15. Hoedemaeker Ph J. Experimental glomerulonephritis. En Nephrology, editado por Davidson AM, Cambridge University Press, 1988;(1):424-426.

16. Skeggs LT, Doreer FE, Khan JR, Lentz KE & Levine M. Experimental renal hypertension: The discovery of the renin-angiotensin system. Biochemical regulation of blood pressure editado por Soffer RL, Wiley J 1981: 3-338.
17. Soffer RL. Angiotensin converting enzyme and the regulation of vaso-active peptides. Annu Rev Biochem 1976;45:73-76.
18. Erdős EG. The angiotensin I converting enzyme. Fed Proc 1977;36:1760-1765.
19. Erdős E, Skidgel PA. The angiotensin I-converting enzyme. Lab Invest 1987;56:345-348.
20. Fyhrquist F, Gronhagen-Riska C, Fourslund T, Hortling L. Physiological and pharmacological aspects of angiotensin converting enzyme. Rev paper 1985:39-42.
21. Baudin B, Timmins PA, Drovot L, Legrand Y, Baumann F Ch. Molecular weight and shape of angiotensin-I converting enzyme: A neutron scattering study. Biochem Biophys Res Comm 1988;154:1144-1150.

22. International Union of Biochemistry, Enzyme Nomenclature. Academic Press Inc USA. 1978:606.

23. Erdős EG, Skidgel RA. Structure and functions of human angiotensin converting enzyme (kininase II). Biochem Soc trans 1985;13:42-44.

24. Buning P, Riordan JF. The functional role of zinc in angiotensin converting enzyme: Implications for the enzyme mechanism. J Inorganic Bioch 1985;24:183-198.

25. van Sande ME, Scharpé SL, Neels HM, Van Camp KO. Distribution of angotensin converting enzyme in human tissues. Clin Chem Acta 1985;147:261-265.

26. Cushman DW, Cheung HS. Concentrations of angiotensin converting enzyme in tissues of the rat. Biochim Biophys Acta 1971;250:261-265.

27. Fourslund T, Kouvonen I, Fyhrquist F. Tissue distribution of angiotensin converting enzyme in the rat: effect of captopril treatment. Acta Pharmacol Toxicol 1984;54:124-128.

28. Saavedra JM, Fernandez-Pardal J, Chevillard C. Angiotensin converting enzyme in discrete areas of the forebrain & pituitary gland. Brain Res 1982;245:317-325.
29. Shullek JR, Wilson IB. Purification of bovine angiotensin converting enzyme. Life Sci 1989;45:685-690.
30. Laliberté F, Laliberté MI, Alhenc-Gelas F, Chevillard C. Angiotensin converting enzyme (ACE) in iris vassels: An ultrastructural study. Exp Eye Res 1989;49:153-157.
31. Strittmatter SM, Thiele AE, Kapiloff SM, Snyder SH. A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates. J Biol Chem 1985;260:9825-9832.
32. Smallridge CR, Gamblin TG, Charles E. Angiotensin-converting enzyme: characteristics in human skin fibroblast. Metabolism 1986;35:899-904.
33. Ikemoto F, Bu Song G, Tominaga M, Kanayama Y, Yamamoto K. Angiotensin converting enzyme predominates in the inner cortex and medulla of the rat kidney. Biochem Biophys Res Commun 1987;144:915-921.

34. Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdős EG. Ultrastructural localization of angiotensin I converting enzyme (E.C. 3.4.15.1) and neutral metalloproteinase (E.C. 34.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest* 1988;59:789-797.

35. Ocunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:1186-1192.

36. Loyke HF. Converting enzyme in rat serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970;134: 248-251.

37. Ondetti MA, Cushman DW. Enzymes of the renin angiotensin system and their inhibitors. *Ann Rev Biochem* 1982;51:283-308.

38. Dubreuil P, Fulcrand P, Rodriguez M, Fulcrand H, Laur J, Martinez J. Novel activity of angiotensin-converting enzyme: hidrolisis of cholecystokinin and gastrin analogues with release of amidated C-terminal dipeptide. *Biochem J* 1989;262:125-130.

39. Ehlers MRW, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: New concepts Its biological role. *Biochemistry* 1989;28:5311-5317.

40. Soffer RL, Berg T, Sulner J, Lai CY. Pulmonary and testicular angiotensin-converting isoenzymes. Clin Exp Hypertension 1987;A9:229-234.

41. Kumart RS, Kusary J, Samar NR, Soffer RL, Sen GC. Structure of testicular angiotensin converting enzyme: A segmental mozaic isozyme. J Biol Chem 1989;264:16754-16758.

42. Morin JP, Moulin B, Borghi H, Grise P, Fillastre JP. Comparative regional distribution of angiotensin-I-converting enzyme in the rat, rabbit, dog, monkey and human kidneys. Renal Physiol Biochem 1989;12:96-103.

43. Ibarra-Rubio ME, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Kinetic and inhibitory characteristics of serum angiotensin converting enzyme from nine mammalian species. Com Biochem Physiol 1989;92B:399-403.

44. Ibarra-Rubio ME. 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, 1986.

45. Ondetti MA, Cushman DW. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological actions. 1984 16,4:381-411.
46. Shapiro R, Riordan F. Inhibition of angiotensin converting enzyme: mechanism and substrate dependence. Biochemistry 1984;23:5225-5233.
47. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol 1971;20:1637-1648.
48. Ikemoto F, Song GB, Tominaga M, Yamamoto K. Endogenous inhibitor of angiotensin converting enzyme in the rat heart. Biochem Biophys Res Commun 1989;159:1093-1099.
49. Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Serum angiotensin converting enzyme activity and plasma renin activity in different experimental models of rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1990. En prensa.
50. Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:267-275.

51. Horiuchi M, Fujimura KI, Terashima T, Iso T. Method for determination of angiotensin converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1982;233:123-130.
52. Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N. Vascular renin angiotensin system in two kidneys, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 1986;8:560-565.
53. Rohrbach MS. ^3H -Glycine-1- ^{14}C Hippuryl-1-histidyl-1-leucine: a substrate for radiochemical assay of angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem* 1978:272-276.
54. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980;47:1-9.
55. Fyhrquist F, Grönhagen-Riska C, Hortling L, Forslund T, Tikkanen I, Klockars M. The induction of angiotensin converting enzyme by its inhibitors. *Clin Exp Hypertens* 1983;A5:1319-1330.
56. Yotsumoto A, Kusuya N, Uchimura H, Matsuzaki F. Increased levels of serum angiotensin-converting enzyme activity in hyperthyroidism. *Ann Int Med* 1982;96:326-328.

57. Glass AR, Vigersky RA, Rajatanavin R, et al. Low serum thyroxine and high serum triiodothyronina in nephrotic rats: etiology implications for bioavailability of protein-bound hormone. *Endocrinology* 1984;114:1745-1753.

58. Hollinger MA, Giri SN, Patwell S, Zuckerman JE, Gorin A, Parsons G. Effect of acute lung injury on angiotensin converting enzyme in serum, lung lavage, and effusate. *Am Rev Respir Dis* 1980;121:373-376.

59. Hollinger MA, Patwell SW, Zuckerman JE, Gorin AB, Parsons G, Giri SN. Effect of paraquat on serum angiotensin converting enzyme. *Am Rev Resp Dis* 1980;121:795-798.

60. Lieberman J, Sastre A: Serum angiotensin converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. *Ann Int Med* 1980;93:825-826.

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

62. Silvertein E, Pertschulk LP, Friedlan J. Immunofluorescent detection of angiotensin-converting enzyme (ACE) in Gaucher cells. *Am J Med* 1980;69:408-410.

63. Matzuki K, Sakata T. Angiotensin converting enzyme in diseases of liver. Am J Med 1982;69:408-410.
64. Van Der Vijgh WJF, Van Velzen D, Van Der Poort JSEM, Schluper HMM, Mross K, Feijen J, Pinedo HM. Morphometric study of myocardial changes during puromycin aminonucleoside induced nephropathy in rats. Anticancer Res 1987;7:1111-1116.
65. Lewin PK, Moscarello MA. Liver ultrastructural and biochemical changes in the prenephrotic stage of aminonucleoside nephrosis. Exp Mod Pathol 1968;8:21-30.
66. Diamond JR, Bonvetre JV, Karnovsky. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. Kidney Int 1986;29:478-483.
67. Thakur V, Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. Kidney Int 1988;34:494-499.
68. Mendelson FAO, Lloyd CJ, Kachel C, Funder JW. Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. J Clin Invest 1982;71:684-692.

69. Krulewitz AH, Fanburg BL. Stimulation of bovine endothelial cell angiotensin-I-converting enzyme activity by cyclic AMP-related agents. *J Cell Physiol* 1986;129:147-150.

70. Ingelfinger JR, Anderson S, Hirsch AT, Dzau VJ, Brenner BM. Elevation of renal angiotensin-converting enzyme activity in nephrotic rats. *Kidney Int* 1990;37:356. Resúmen.

71. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC. Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 1990. En prensa.

72. Kokubu T, Kato I, Nishimura K, Hiwada K, Ueda E. Angiotensin I-converting enzyme in human urine. *Clin Chim Acta* 1978;89:375-379.

73. Baggio G, Favaro S, Cantaro S, Bertazzo L, Frunzio A, Borsatti A. Increased urine angiotensin I converting enzyme activity in patients with upper urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 1981;109:211-218.

74. Pitoti A, Maurich V, Moneghini M, Vianellos S. HPLC Method for evaluation of urinary angiotensin-converting enzyme: some examples of normal subjects and patients with renal transplantation. J Pharmaceutical & Biomedical Analysis 1986;5:677-683