

1/6
24



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL CAPTOPRIL SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CON-
VERTIDORA DE ANGIOTENSINA I EN EL SIN-
DROME 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:

AVRIL HYSMENYA MACIEL GOMEZ

MEXICO, D.F.

1991.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.	1
I. INTRODUCCION.	1
1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA	1
2. RENINA.	3
3. SINDROME NEFROTICO.	7
4. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.	8
4a. Sustratos específicos	12
4b. Localización.	13
4c. Inhibidores	14
5. ECA Y ENFERMEDAD.	18
II. ANTECEDENTES.	19
III. HIPOTESIS.	21
IV. OBJETIVOS.	22
V. MATERIALES Y METODOS.	23
1. REACTIVOS.	23
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
3. EXTRACCION DE ECA EN LOS TEJIDOS.	24
4. DETERMINACION DE ECA.	24
5. DETERMINACION DE PROTEINAS.	27
6. DETERMINACION DE CREATININA	29
7. ANALISIS ESTADISTICOS	31
VI. RESULTADOS.	32
VII. DISCUSION.	44
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. REFERENCIAS.	50

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ADP	.Adriamicina
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	.Control
CAP	.Captopril
C	.Grados centigrados
C-terminal	.Carboxilo terminal
D.O.	.Densidad Optica
dpm	.Desintegraciones por minuto
ECA	.Enzima convertidora de angiotensina I
FIG	.Figura
g	.Gramo (s)
h	.Hora (s)
HGG	.Hipurato de glicil glicina
HHL	.Hipurato de histidil leucina
Kg	.Kilogramo
l	.Litro (s)
M	.Molar
MBG	.Membrana basal glomerular
mg	.Miligramo (s)
min	.Minuto (s)
ml	.Mililitro (s)
μl	.Microlitro (s)
mU	.Miliunidades

NNormal (Normalidad)
ngNanogramo (s)
nmNanómetro
nMNanomoles
N-terminalAmino-terminal
PMPeso molecular
rpmRevoluciones por minuto
SNSíndrome nefrótico
SRAASistema renina angiotensina aldosterona

AMINOACIDOS

AlaAlanina
ArgArginina
AsnAspargina
AspAcido aspártico
CisCisteína
PenFenilalanina
GliGlicina
HisHistidina
IleIsoleucina
LeuLeucina
LisLisina
MetMetionina
ProProlina
SerSerina
TirTirosina
ValValina

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

I

1. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

El sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) juega un papel central en la homeostasis de los fluidos, electrólitos y de la presión sanguínea (1,2).

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. (Fig. 1)

El riñón es la fuente principal de la renina circulante, específicamente las células del aparato yuxtaglomerular de cada nefrona, aunque se ha demostrado que otros tejidos tales como el cerebro, el músculo liso arteriolar, el músculo liso uterino, la placenta, las glándulas submandibulares y ciertos tumores también producen renina y actúan sobre el sustrato angiotensinógeno, el cual se sintetiza principalmente en el hígado cuyo producto de hidrólisis es el decapeptido Ang I que es biológicamente inactivo y constituye el sustrato de la segunda enzima, que remueve el extremo carboxilo histidil-leucina (His-Leu), para así producir el octapéptido Ang II que tiene intensa actividad biológica y, a su vez, es transformado, mediante la acción de la angiotensinasa A, a Ang III, la cual remueve el amino (ácido aspártico) de la Ang II para formar el heptapéptido correspondiente. La Ang II es el efector más importante del SRAA ya que es un potente vasoconstrictor, estimula la liberación de aldosterona de las glándulas adrenales, induce la sensación de sed en el hipotálamo, estimula la secreción de angiotensinógeno en el hígado e inhibe la secreción de renina en las células yuxtaglomerulares.

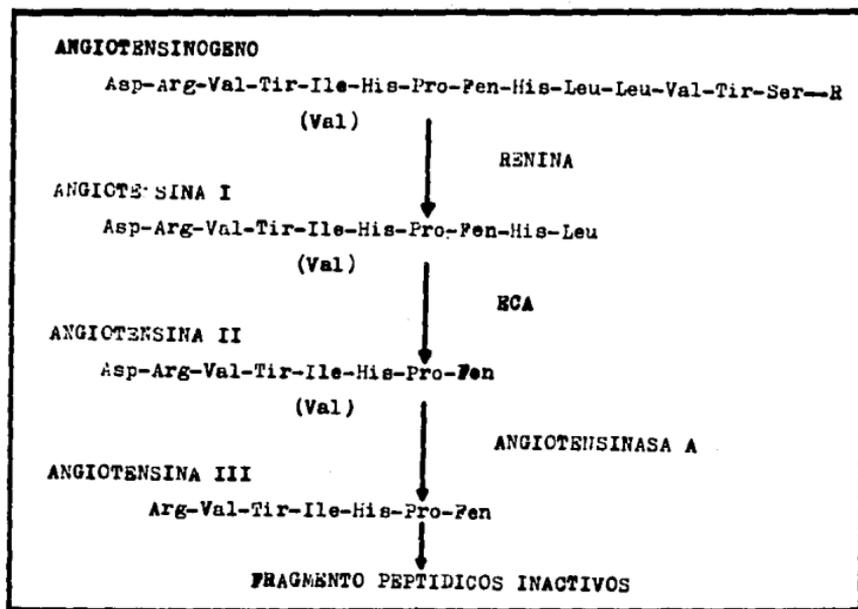


FIG. 1 PRINCIPALES COMPONENTES DEL SRAA

La Ang III se produce por acción de la angiotensinasa A sobre la Ang II, esta 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 actividad del SRAA se controla principalmente por la velocidad de liberación de renina, aunque existe evidencia de que en algunos casos la actividad de ECA puede regular también la actividad del sistema por métodos farmacológicos lo cual tiene gran utilidad clínica (4-8).

2. RENINA

La renina es una de las enzimas del SRAA que se sintetiza en las células yuxtaglomerulares del riñón en respuesta a un estímulo tal como la hipotensión y disminución deliberada de sodio del túbulo distal en los sitios de la mácula densa (Fig. 2) (9). La renina también se ha localizado en tejidos de otros órganos tales como cerebro, pituitaria anterior, útero, arterias, corteza adrenal, hipotálamo y glándula submandibular. Su estudio se inició, desde su descubrimiento en 1898 por Tigerstedt y Bergman (10,11), 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, sin embargo la importancia de la renina no fué valorada, sino hasta después de varios experimentos realizados por Goldblatt y cols. en 1934 (11,12) que demostraron que la hipertensión tenía bases humorales y era de origen renal.

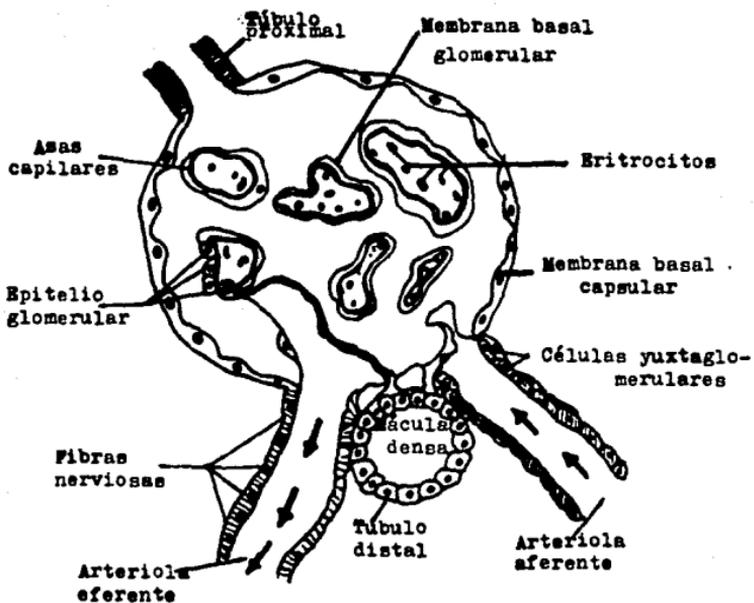


FIG. 2 DIAGRAMA DE UN GLOMERULO

En la actualidad se han descrito al menos 5 mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina en riñón (6,13, 14 y 15):

- 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 electrólitos plasmáticos (Ca^{+2} , K^{+} , etc.).

La secreción de renina por parte de las células yuxtaglomerulares se da en respuesta a una caída en la presión arterial, provocando la producción de Ang II la cual eleva la presión sanguínea hasta valores normales, lo que se detecta por barorreceptores intrarrenales que, junto con la cantidad extra de sodio en sangre, actúan por un sistema de retroalimentación negativa sobre las células yuxtaglomerulares para que disminuyan su actividad secretora.

La renina se sintetiza como un precursor inactivo, prorenina, que es convertido a otra forma inactiva prorenina, la cual después se procesa a renina activa (16).

El calcio juega un papel primordial en la regulación y liberación de la renina (16). En contraste con la secreción de otras hormonas, la secreción de Ca^{+2} en las células citosólicas yuxtaglomerulares y se inhibe por un aumento en la concentra-

ción del Ca^{+2} citosólico. La activación de barorreceptores por mecanismos de la mácula densa liberan renina por reducción en los niveles de Ca^{+2} citosólico. El aumento en la presión de la arteriola aferente depolariza las células yuxtglomerulares provocando un incremento en la entrada de Ca^{+2} y eleva los niveles citosólicos de Ca^{+2} con la consecuente reducción de la secreción de renina.

Los mensajeros intracelulares que regulan la secreción de renina son ATP , Ca^{+2} , inositol trifosfato, y proteína cinasa C; mientras que la Ang II, vasopresina y el agonista α -adrenocceptor de la noradrenalina actúan directamente en las células yuxtglomerulares para inhibir la secreción de la renina (16). El efecto inhibitorio de estas hormonas son dependientes de la presencia de Ca^{+2} extracelular y pueden ser antagonizadas por canales bloqueadores de Ca^{+2} . Estos hallazgos indican que la Ang II, vasopresina y noradrenalina inhiben la secreción de renina por un aumento del influjo de Ca^{+2} en las células yuxtglomerulares.

En plasma se encuentra tanto renina activa como inactiva, esta última constituye más de la mitad de la renina circulante y, al igual que la activa, se secreta de las células yuxtglomerulares (6). La renina inactiva puede activarse por incubación en frío, con un tratamiento con ácido o con enzimas proteolíticas (tripsina, pepsina, kallikreína). Esto tiene por objeto exponer el sitio activo de la enzima para que reaccione con su sustrato, el angiotensinógeno (2,6 y 17), el cual es sintetizado principalmente en el hígado y cuya producción está sujeta a un mecanismo de retroalimentación por los componentes del SRNA, ya que se estimula por la Ang II. Otros factores que estimulan su producción son glucocorticoides, estrógenos, tiroxina y binefrectomía.

3. SINDROME NEFROTICO

El síndrome nefrótico (SN) es un padecimiento que se presenta en humanos de todas las edades; además se puede inducir experimentalmente y se caracteriza por proteinuria, hipoproteíemia, albuminuria, disminución de la presión coloidosmótica, esclerosis, edema, lipiduria, retención de sodio, hipercolesterolemia e hiperlipoproteinemia (18).

En el laboratorio se han desarrollado modelos experimentales para estudiar el SN; entre ellos se encuentran los producidos por inyección de :

- a) suero antirrábico (19,20)
- b) aminonucleósido de puromicina (ANP) (27)
- c) adriamicina (ADR) (21,22)
- d) daunomicina (23)

El SN experimental inducido por el ANP ha recibido gran atención debido a que es muy similar al SN con lesiones mínimas que se presenta en humanos, además este modelo ofrece la ventaja de seguir la evolución de la enfermedad en condiciones controladas y gracias a esto los cambios en el SRAA han sido previamente caracterizados (5,24,25,26). Se han descrito dos variantes de la nefrosis inducida por ANP, el modelo agudo y el modelo crónico (27). El primero se induce por una o varias inyecciones subcutáneas o intraperitoneales que van de 50 a 150 mg/kg de peso corporal total, desencadenando una proteinuria masiva y SN al término de 7 a 14 días después de su aplicación; alrededor de 3 semanas después, la proteinuria disminuye y desaparece a las 6 semanas; este modelo es reversible.

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

El mecanismo por medio del cual el ANP produce el daño renal no ha sido totalmente esclarecido, sin embargo 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; también se ha observado que el ANP reduce la barrera electrostática de polianiones circulantes, además de que existe una degeneración de los procesos podocíticos de la membrana basal glomerular (MBG). 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 (Fig. 3).

4. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA), es un componente del SHAA, que convierte el decapeptido Ang I inactivo, después de que este es liberado por renina, al octapeptido Ang II activo.

Fue descrita por primera vez en plasma de caballo por Skeggs y cols. en 1954 (28); más tarde, Ng y Vane demostraron que esta enzima era responsable de la conversión in vivo de la Ang I circulante a Ang II en pulmón (28). Poco después Erdős y cols. (29) 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 bradisinina al liberar el péptido Fen-Arg del extremo carboxilo; a esta enzima se le llamó inicialmente cininasa II. El sitio del metabolismo para los dos péptidos que pasan a través de la circulación pulmonar es el endotelio vascular; por lo que se concluyó que el pulmón es el lu

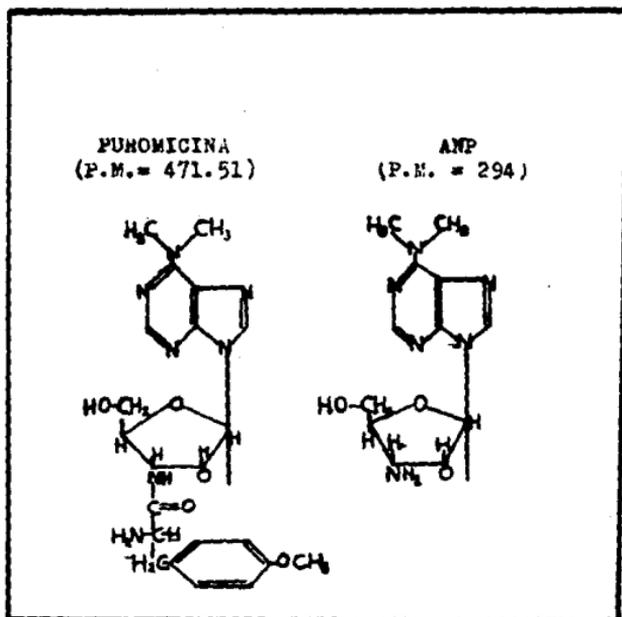


FIG. 3 ESTRUCTURA DE LA PUROMICINA Y DEL ANP

gar exclusivo para la conversión de la Ang I circulante en humano (30).

También se ha visto que la ECA hidroliza a encefalinas y otros numerosos polipéptidos y tri-péptidos N-acilados (31).

La ECA es una molécula proteica monomérica con Zn en el centro activo, con un punto isoeléctrico alrededor de 4.5 y pH óptimo de 8.4 y su actividad depende de la presencia de iones cloro. Su peso molecular depende del tejido y más importante del método de determinación, así para pulmón varía de 126 a 185 kDa determinado por electroforesis en gel y bajo condiciones desnaturalizantes, observándose los valores más altos cuando se emplea técnicas de filtración en gel (32,33).

Probablemente la ECA es una peptidasa transmembranal, con un ancla peptídica hidrofóbica insertada dentro de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (34) y en humanos la enzima parece ser más hidrofóbica que la extraída del pulmón o riñón de otros animales (35). Debido a que gran parte de la enzima está unida a la membrana, se usan detergentes y solventes orgánicos para extraerla de homogenados crudos.

Los grupos funcionales esenciales en el sitio activo de la ECA incluyen los aminoácidos arginina, tirosina, lisina y ácido glutámico y el complejo del ión Zn el cual se requiere para su actividad catalítica (36), aparentemente el Zn está involucrado en la ruptura del enlace amida escindido por la polarización del grupo carbonilo y de la amida facilitando el ataque nucleofílico del carboxilato glutámico (Fig. 4). El residuo Arg probablemente se requiere para la interacción iónica con el grupo carboxilo terminal del sustrato y la lisina debe de estar involucrada en el mecanismo de activación del ión Cl^- ;

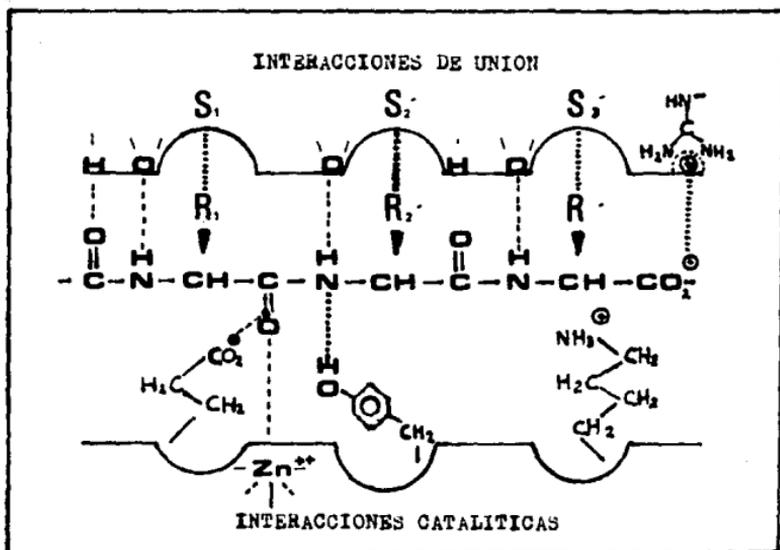


FIG. 4 ESQUEMA HIPOTETICO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA ECA

asimismo la activación por este anión parece tener un papel regulatorio en los sitios extracelulares donde se encuentra la ECA, excepto en las microvellosidades intestinales (1). El flujo de los iones Cl^- e hidrógeno pueden regular la ECA intracelularmente aumentando la actividad hasta un grado límite que varía de acuerdo a la estructura del sustrato y el pH, por ejemplo, la hidrólisis de la Ang I se lleva a cabo sólo en presencia de Cl^- , pero este no es indispensable para la hidrólisis de la bradisinina.

4a. SUSTRATOS ESPECIFICOS

Una gran variedad de péptidos con diferentes secuencias en el C-terminal pueden servir como sustrato para la ECA; de los péptidos biológicamente activos, los que se hidrolizan más rápido in vitro son las bradisininas o Ang I, ya que son las que presentan mayor afinidad por la ECA, sin embargo, los requisitos que debe tener un sustrato para ser hidrolizado por la ECA son:

- 1) Ser un polipéptido que posea un C-terminal (36).
- 2) Tener un aminoácido cargado positivamente en la penúltima posición (37).

La estructura general de los sustratos es R1-R2-R3-OH . La enzima se ancla al R1 a partir de R2; R1 puede ser un aminoácido protegido o un péptido; R3 un aminoácido con un C-terminal libre pero no ácido glutámico y R2 cualquier aminoácido excepto prolina porque los péptidos que tienen prolina en la posición R2 no son hidrolizados. Este hecho explica por qué la Ang II no es hidrolizada adicionalmente por la ECA.

Los péptidos que contienen aminoácidos acídicos son pobres

sustratos para la ECA, mientras que los péptidos con aminoácidos aromáticos son buenos sustratos (36). También los péptidos con el residuo prolina C-terminal pueden unirse excepcionalmente a la ECA y funcionar como buenos sustratos.

En algunos casos, se ha visto que la ECA puede hidrolizar sustratos peptídicos amidados como la sustancia P (38), análogos de la colecistocinina y la gastrina (39), a la luliberina (enzima liberadora de la hormona luteinizante), además de las cininas, Ang I o encefalinas, siendo estos sustratos de importancia biológica potencial.

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 (7,40). 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) (7).

El ácido hipúrico (AH) liberado de sustratos tales como HHL o HGG, se puede medir después de la extracción de la mezcla de incubación con un solvente orgánico o registrando directamente su liberación en el espectrofotómetro (7).

4b. LOCALIZACION

Se sabe que la ECA está ampliamente distribuida y localizada en la superficie de vasos sanguíneos y es abundante en pul-

món y testículos, aunque también se encuentra en cerebro, riñón, intestino, corteza adrenal, tejido ocular, plexo coroideo, ovarios, borques de la placenta y recientemente se descubrió que también se encuentra en los fibroblastos de la piel en humano (36).

En diversos tejidos, la ECA se encuentra unida por una pequeña ancla hidrofóbica en células como endotelio, epitelio, neuroepitelio y otros tipos de células. Se ha encontrado ECA soluble en plasma seminal y en homogenados de próstata y epidídimo, y en fluido amniótico o cerebroespinal. También se encuentra en microsomas o vesículas endocíticas que están en el medio intracelular. La ECA testicular ha sido localizada en gotas citoplasmáticas y células de Leidig.

El origen de la enzima circulante no está esclarecido, sin embargo se ha sugerido que se libera a la sangre durante el recambio normal de las membranas celulares que la contienen. 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 (41).

4c. INHIBIDORES

La ECA se inhibe in vitro por numerosos compuestos, entre los que están los dipéptidos liberados de la Ang I o de la bradisinina (His-Leu y Fen-Arg); agentes quelantes como EDTA, fenantrolina u 8-hidroxiquinolina; compuestos sulfhidrilo (SH) que potencian la actividad in vitro de la bradisinina 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 (41). Compuestos como el mercaptoetanol o dimercaptopropanol que incrementan la acción hipotensiva de la bradiginina en varios animales experimentales (30), los análogos estructurales de la Ang I modificados en algunas posiciones de la cadena polipeptídica; la insulina; el glutatión; el veneno de algunas serpientes como Bothrops jararaca y sus 9 péptidos derivados, también potencian la acción de la bradiginina in vitro e in vivo por la inhibición de la ECA. Algunos de estos péptidos ya han sido sintetizados (42), como el nonapéptido SQ20881 (BPP qa, tepróti do, o bien V-b-1) y otros análogos que han sido usados como drogas antihipertensivas y han mostrado ser inhibidores específicos de la ECA (36).

Los primeros estudios con péptidos de venenos de serpientes demostraron que la inhibición de la ECA podía proporcionar una vía para el manejo de la hipertensión dando paso al descubrimiento de la droga antihipertensiva Captopril (D-3 mercapto-2 metil propanoil) L-prolina, nonapéptido descrito como el inhibidor específico más efectivo de la ECA ya que inhibe a concentraciones nanomolares y es altamente competitivo y reversible. Su acción antihipertensiva está basada en la inhibición de ECA, al inhibirse esta enzima se inhibe la producción de Ang II y degradación de bradiginina (43). El captopril inhibe a la enzima debido a que posee grupos funcionales que se relacionan con los grupos funcionales de la enzima estableciendo interacciones estereo y regioespecíficas haciéndolo un inhibidor específico (Fig. 5). El grupo carbonilo interacciona electrostáticamente con un grupo catiónico; forma un enlace de hidrógeno en el cual el átomo de oxígeno que proviene del captopril funciona como un

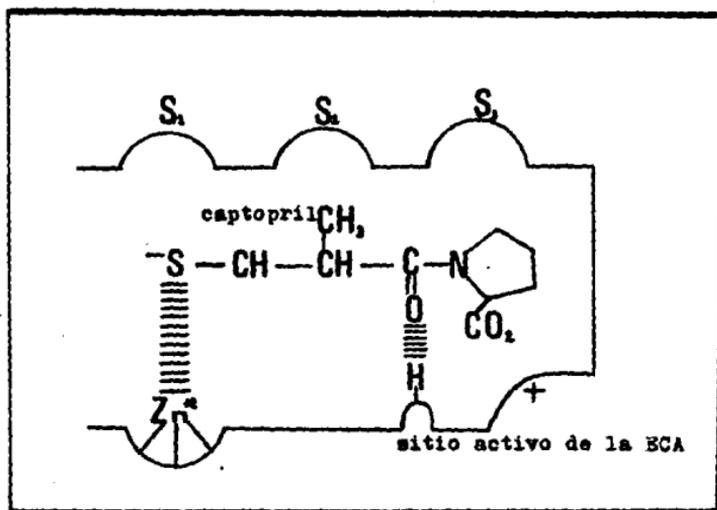


FIG.5 INTERACCION DEL CAPTOPRIL CON EL SITIO ACTIVO DE LA ECA

ceptor de hidrógeno que proviene de la enzima. El grupo sulfhidrilo llega a ser uno de los ligandos del anillo de la pirrolidina del residuo de prolina; este sustituyente metilo alfa afianza la interacción con la enzima restringiendo la movilidad y el grado de libertad del inhibidor (36). Más aún, el captopril no pierde actividad cuando se le suministra oralmente y por lo tanto ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de la hipertensión y en estados de exceso de Ang II así como en la insuficiencia cardíaca congestiva severa (44).

Recientes estudios experimentales han permitido establecer que la respuesta hemodinámica a la administración del captopril en animales de experimentación y en humanos puede explicarse por cambios en la concentración plasmática de Ang II y bradicinina. Es decir la administración del captopril produce una disminución de bradicinina, de Ang II y de aldosterona plasmáticas, e induce cambios que están asociados con la elevación de la actividad de renina plasmática y niveles de Ang I. Por otro lado la combinación del captopril y la bradicinina incrementan la liberación de ácido araquidónico y síntesis de prostaglandinas por el simple efecto aditivo de estos dos componentes (45,46,47).

En algunos estudios se ha encontrado que el captopril atenúa la elevación de la presión sanguínea durante el ejercicio indicando que no hay ninguna acción antihipertensiva.

El captopril también disminuye la excreción de albúmina urinaria en pacientes con diabetes dependiente de insulina, moderando la hipertensión arterial y disminuyendo la filtración de proteínas a través del glomerulo (48). El efecto positivo del captopril en la proteinuria en pacientes con hipertensión

arterial está acompañado por el incremento en la albúmina sérica y disminución del colesterol sérico (47).

El tratamiento crónico con captopril puede incrementar la ECA no solamente en el plasma, sino también en tejidos cerebrales como la médula oblongada, hipotálamo o neurohipófisis; también se ha observado el incremento en la concentración de renina en estas áreas (47,48,49).

También es posible que el captopril disminuya cualquier proliferación celular por inhibición de la producción de Ang II (43).

5. ECA Y ENFERMEDAD

Muchos investigadores han estudiado cambios en la actividad de ECA en el plasma humano observando que la actividad de ECA es mayor en hombres que en mujeres de edad comparable y es mayor en niños que en adultos, está reducida en el suero de 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, lo cual 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 (9).

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

Actualmente no se conoce la fuente de ECA en suero, pero se sabe que esta se sintetiza en muchos tejidos (50), los cuales pueden liberarla a la circulación. Los únicos estímulos conocidos que aumentan los niveles circulantes de ECA son los inhibidores de ECA (51) y las hormonas tiroideas (52). Se piensa que la ECA que aparece en la orina de sujetos normales (53), y cuya excreción aumenta en sujetos con infecciones del tracto urinario (54), proviene del túbulo proximal.

En estudios previos se caracterizaron los cambios en la actividad de ECA tisular, urinaria y sérica en dos modelos experimentales en ratas: síndrome nefrótico (SN) inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP) e intoxicación aguda con tetracloruro de carbono (CCl_4) (55,56). En ambos modelos, la ECA sérica y urinaria aumentó, y la ECA tisular aumentó en algunos tejidos y disminuyó en otros. El aumento en la ECA tisular en estos modelos parecen deberse a un aumento en la biosíntesis de la enzima, mientras que la disminución parece ser secundaria a la liberación de la ECA por daño tisular. El aumento de la ECA sérica en éstos modelos parecen deberse a un aumento en la biosíntesis y liberación de ECA en algunos tejidos y/o a una liberación inespecífica de la enzima tisular a la circulación (55,56).

Por otra parte, el aumento en la ECA urinaria en el SN parece ser secundaria a pérdida de la ECA circulante (55), mientras que en las ratas con CCl_4 parece deberse a la liberación de la ECA tubular debido al daño del túbulo proximal producido por este solvente (56).

Como ya se mencionó, los inhibidores de ECA aumentan los niveles circulantes y en pulmón de esta enzima, por lo que se ha

sugerido que el aumento de la enzima en pulmón puede explicar el aumento en los niveles circulantes (57). También se conoce que el captopril aumenta los niveles circulantes de renina y disminuye los niveles circulantes de angiotensinógeno (58,59). Basados en estas observaciones, en el laboratorio se demostró recientemente que el captopril potencia el aumento en renina y hace más evidente la disminución en angiotensinógeno característicos de las ratas con SN experimental (60). Además se demostró que estos cambios producidos por captopril en los niveles circulantes de renina y de angiotensinógeno se reflejan en la excreción urinaria de estas proteínas, esto es, las ratas con SN tratadas con captopril excretan más renina y menos angiotensinógeno que las ratas con SN sin captopril (61,62).

Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió el efecto del captopril sobre los niveles circulantes, tisulares y urinarios de la ECA en ratas con SN experimental para ayudar a conocer los mecanismos de regulación de la ECA en este modelo experimental.

III. HIPOTESIS

III. HIPOTESIS

- El captopril puede magnificar el aumento en la ECA circulante y urinaria en ratas con SN experimental inducido con ANP.
- El captopril puede modificar el patrón tisular de ECA en ratas con SN experimental inducido con ANP.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Aportar información que permita conocer el mecanismo por medio del cual la ECA circulante cambia en el SN experimental usando como herramienta el captopril.

- Medir los niveles de ECA en los siguientes tejidos: riñón, corazón, cerebro, testículos, glándulas adrenales, aorta, pulmón, intestino e hígado con cuatro diferentes tratamientos :
1) SN sin captopril, 2) SN con captopril, 3) control, y 4) control con captopril.

- Medir los niveles circulantes y la excreción urinaria de ECA en las ratas con los tratamientos citados arriba.

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 100 a 120 g de peso.

Las ratas se dividieron en cuatro grupos: a) SN, b) SN+CAP, c) C, d) C+CAP. El síndrome nefrótico se indujo con una inyección subcutánea única de una solución de ANP al 2% en solución salina (15 mg/100g, refs. 5-24, 25-62) la cual fué aplicada el día 0. El tratamiento con captopril se inició 2 días antes de la inyección del ANP o vehículo; este se les administró disuelto en el agua de beber en una concentración de 0.5 g/L (66), la dosis aproximada por animal fué de 5 mg/100g/día; a las ratas control y con SN que no recibieron captopril sólo se les dió agua.

Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas durante el estudio para recolectar la orina de 24 hrs; posteriormente las ratas fueron sacrificadas por decapitación los días 2, 6, 11, 16 y 20 después de la inyección del ANP o del vehículo (n= 10 para cada día y para cada grupo, total 200 ratas). En estos días se obtuvieron sangre y los siguientes tejidos: cerebro, corazón, hígado, aorta, glándulas adrenales, intestino, riñón, testículo y pulmón. 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.

3. EXTRACCION DE ECA EN LOS TEJIDOS

Los tejidos (aproximadamente 1 g excepto glándulas adrenales y aorta, que por su tamaño se extrajeron totalmente) se descongelaron y se homogenizaron durante 30 segundos con un homogenizador de tejidos (marca Politrón) en 5 ml (excepto glándulas adrenales y aorta que se homogenizaron en 1 ml) de 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% (64). El homogenado se dejó reposar toda la noche a 4 °C, y se centrifugó a 12,500rpm durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante se separó en tres alícuotas para determinar proteínas y ECA.

4. DETERMINACION DE ECA

La actividad de ECA, se midió usando como sustrato hipurato de histidil leucina (HHL) (7,55) y se utilizó un método radioquímico (65,66), ya que tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad y rapidez de la determinación. En este ensayo se emplea una mezcla de HHL radiactivo marcado con C^{14} y HHL no radiactivo. La ECA hidroliza al HHL en histidil leucina y en ácido hipúrico (AH) (Fig. 6). 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 μ l de HHL C^{14} (3 mCi/mmol; 0.0177 nmoles, 77,000 desintegraciones por minuto (dpm) y 3.5 μ l 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.

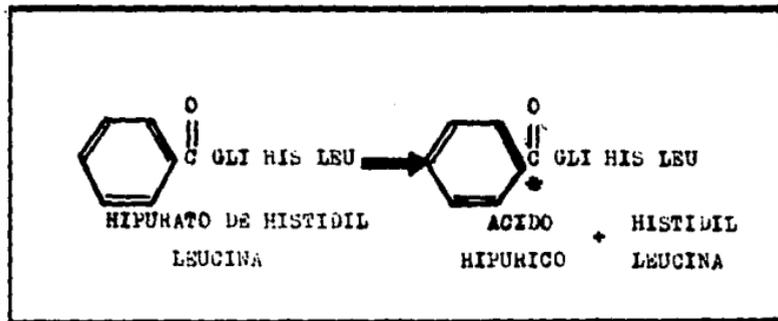


FIG. 6 REACCION EN LA QUE SE BASA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA

- La mezcla se secó bajo una corriente de nitrógeno y se resuspendió en 40 μ l (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 agregaron 10 μ l de la muestra como máximo.
- En los tubos blanco se agregaron 50 μ l de HCl 1 M.
- A todos los tubos se les agregaron 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 contenían 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:

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

donde: AH = Acido hipurico

AE = Actividad específica (308 dpm/nmol)

0.91 = Recuperación de AH

0.67 = Fracción contada de AH

t = Tiempo de incubación (en minutos)

v = Volúmen de incubación (en ml)

Una unidad de ZCA 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.

5. DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry (63), 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).

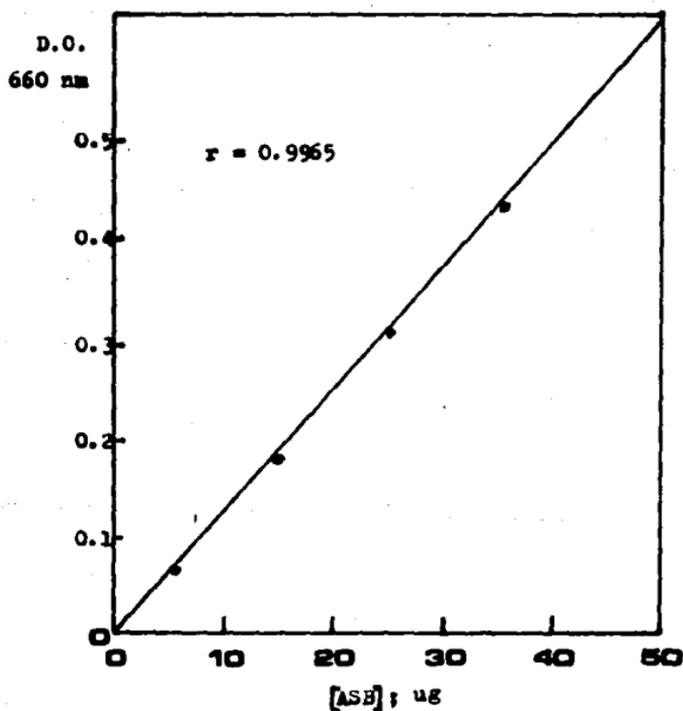
Solución D. Reactivo de Polin & Ciocalteu 1 N. Se prepara a partir de la solución concentrada 2 N.

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 660nm.

A los sueros se les hizo una dilución 1:400, de esta dilución se tomaron 0.2 ml para cuantificar proteínas. A los tejidos (se

FIG. 7. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.



brenadante) se les hizo una dilución previa, según el tejido, y después se tomaron 0.2 ml para cuantificar proteínas. La curva patrón se muestra en la Fig. 7. Los resultados de proteínas en orina se expresan en mg/24h, en suero se expresan en mg/dl y en tejidos en mg/ml.

Fué necesario diálizar las muestras de orina (bolsas de diálisis spectropor con un tamaño de poro de 6,000 d) contra una solución de NaCl 0.9% para determinar la actividad de ECA en orina.

6. DETERMINACION DE CREATININA

La determinación de creatinina se realizó con el estuche de reactivos para creatinina, utilizando el Analizador 2 de Creatinina Beckman. Un volumen preciso de muestra se inyecta con el reactivo de Jaffé modificado en una celdilla de reacción. Se mide la velocidad del aumento de absorción debido a la formación del complejo alcalino de Picrato de Creatinina. La velocidad de formación de color del complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. (Fig. 8).

El analizador utiliza un sistema de detección óptica, empleando una fuente luminosa, un filtro interferencial de 520 nm, un fotodetector y un circuito electrónico que mide el cambio en absorción de la solución de picrato alcalino después de la adición de la muestra. Cuando se inyecta una muestra con el reactivo de picrato alcalino, la creatinina de la muestra se combina con el ácido pícrico en presencia de iones OH en el reactivo, y produce un complejo de color rojo.

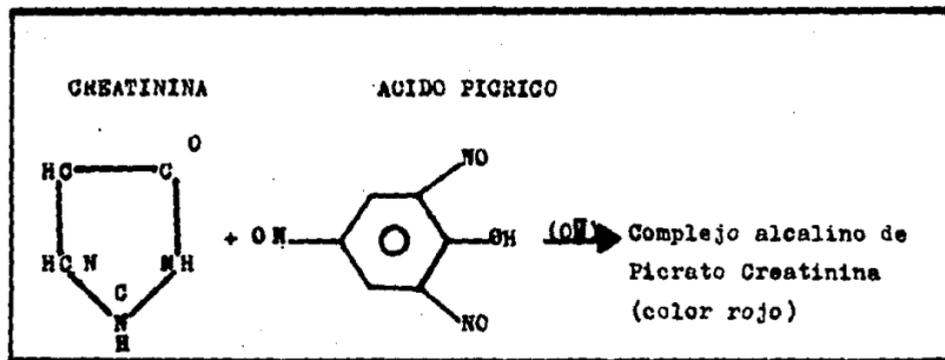


FIG. 8 REACCION QUIMICA DE LA CREATININA

Se midió tanto la creatinina en orina como en suero para calcular la depuración de creatinina (DC), mediante la siguiente fórmula.

$$DC = \frac{(\text{Creat orina mg/dl}) \times \text{flujo urinario (ml/min)}}{[\text{Creat suero mg/dl}]}$$

$$\text{Flujo Urinario} = \frac{\text{ml orina en 24 h}}{24 \times 60 \text{ (min/día)}} = \frac{\text{ml orina}}{1400 \text{ min}}$$

7. ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar. Se aplicó el 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 (66), el cual se basa en el uso de valores de t modificados; mediante estos valores se puede observar qué grupo experimental difiere del grupo control. Una $P < 0.005$ se consideró significativa.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. PESO (gr)

En la Tabla I se muestran los pesos obtenidos durante el estudio observándose que las ratas con SN y SN+CAP tuvieron una menor ganancia de peso corporal, aunque si aumentaron de peso a lo largo del estudio y sólo se mostro una diferencia significativa el día 11 en el grupo SN+CAP con respecto al grupo SN.

2. VOLUMEN URINARIO (V/ml)

En la Tabla II se muestran los volúmenes urinarios obtenidos, no encontrando significancia entre los grupos experimentales con respecto al grupo C.

3. PROTEINAS URINARIAS (mg/24h)

En la Tabla III se presentan los datos de proteínas obtenidos en los 4 grupos. La concentración de proteína en orina aumentó en el grupo SN potenciándose el aumento en el grupo SN+CAP. Según el ANDEVA, ambos grupos son diferentes a partir del día 6 con respecto al grupo control, lo cual indica que el captopril potencia el efecto del SN sobre la excreción urinaria de proteínas totales.

4. PROTEINAS TOTALES EN SUERO (g/dl)

En la Tabla IV se observa que la concentración sérica de proteínas entre los grupos SN y SN+CAP no fué diferente en ningún día, por lo que se deduce que el captopril no afectó la concentración de proteínas totales en suero. Las proteínas totales en estos 2 grupos disminuyeron los días 6, 11 y 16 con respecto a los grupos C y C+CAP, regresando a valores normales para el día 20.

5. DEPURACION DE CREATININA (ml/min)

En la Tabla V se observa que la depuración de creatinina disminuyó significativamente los días 2, 6 y 11, tanto en el grupo SN como en el SN+CAP y mostrando diferencias significativas egte último grupo con respecto al grupo C+CAP los días 6 y 11 indicando que hay disminución en la filtración glomerular, y daño del túbulo.

6. CREATININA EN SUERO (mg/dl)

En la Tabla VI se observa que la concentración de creatinina en suero aumentó significativamente el día 6 en los grupos SN y SN+CAP siendo mayor el aumento en el grupo SN+CAP, volviendo a un estado normal a partir del día 11.

7. ACTIVIDAD DE ECA EN SUERO (mU/ml)

En la Tabla VII se observa que la actividad de ECA aumentó el día 6 en el grupo SN y fué significativamente mayor en el grupo SN+CAP en el cual tanto se presentó un aumento significativo los días 2, 11, 16 y 20 con respecto al grupo C y SN. El grupo C+CAP también aumentó significativamente todos los días con respecto al grupo C. Lo que indica que el captopril aumentó la concentración de ésta enzima en suero y por lo tanto la actividad detectada.

8. ACTIVIDAD DE ECA EN ORINA (U/ml/24h)

En la Tabla VIII se presentan los resultados de ECA en orina donde la actividad de ECA presentó un aumento significativo en el grupo C+CAP con respecto al C los días 2, 16 y 20 aumentando más en los grupos SN y SN+CAP el día 6, siendo éste último significativamente mayor con respecto a los grupos C y SN. Los grupos regresaron a valores normales a partir del día 11.

EL ANDEVA indica que la diferencia entre ambos grupos es significativa para el día 6 lo cual implica que el captopril aumentó la concentración urinaria de ECA en las ratas nefróticas.

9. ACTIVIDAD DE ECA EN TEJIDOS (mU/mg proteína)

En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos en la determinación de ECA en tejidos del día 6. La actividad de ECA en pulmón, hígado y testículo aumentó, mientras que en riñón, intestino, aorta y adrenales permaneció sin cambio, y en cerebro y corazón disminuyó en el grupo SN. Sin embargo, todos los tejidos tuvieron un aumento significativo en el grupo SN+CAP tanto con respecto al grupo C como al C+CAP, así como una disminución significativa con respecto al grupo C en aorta, adrenal, cerebro, corazón y testículo en el grupo C+CAP. Por lo tanto los efectos del captopril y el SN son aditivos.

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SN+CAP
2	114 ± 9 (10)	120 ± 6 (10)	109 ± 10 (10)	103 ± 12 (10)
6	163 ± 13 (10)	166 ± 16 (10)	125 ± 9 (10)*	117 ± 6 (10)*
11	174 ± 10 (10)	162 ± 14 (10)	142 ± 10 (5)*	118 ± 11 (8)*†
16	200 ± 14 (10)	189 ± 35 (10)	137 ± 13 (9)*	141 ± 48 (5)*
20	220 ± 17 (10)	217 ± 18 (10)	164 ± 17 (9)*	163 ± 48 (7)*

TABLE I. Peso corporal (gr). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE.

El número de determinaciones está entre paréntesis.

* $P < 0.005$ VS. C

† $P < 0.005$ VS. SN

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAF	SN	SN+CAF
2	10 ± 2 (5)	9 ± 2 (5)	5 ± 2 (10)	6 ± 2 (10)
6	6 ± 1 (9)	9 ± 4 (9)	6 ± 4 (9)	7 ± 3 (9)
11	8 ± 4 (10)	9 ± 7 (10)	5 ± 3 (5)	8 ± 3 (8)
16	14 ± 4 (10)	15 ± 5 (10)	11 ± 3 (9)	15 ± 3 (9)
20	15 ± 4 (10)	19 ± 5 (10)	13 ± 4 (9)	12 ± 9 (7)

TABLA II Volúmen urinario (V/ml). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE.
 El número de determinaciones está entre paréntesis.

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SN+CAP
2	5 ± 3 (5)	6 ± 3 (5)	4 ± 2 (10)	5 ± 1 (10)
6	3 ± 1 (10)	10 ± 4 (10)	107 ± 51 (8)*	188 ± 89 (8)*†
11	4 ± 1 (10)	10 ± 8 (10)	180 ± 93 (5)*	193 ± 93 (8)*
16	3 ± 1 (10)	17 ± 6 (10)	199 ± 91 (9)*	215 ± 50 (5)*
20	4 ± 1 (10)	17 ± 7 (10)	180 ± 87 (9)*	204 ± 62 (7)*

TABLA III. Proteínas urinarias (mg/24h). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE.
El número de determinaciones está entre paréntesis.
* $P < 0.005$ VS. C
† $P < 0.005$ VS. SN

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SN+CAP
2	9.9 ± 0.9 (10)	9.4 ± 0.6 (9)	8.2 ± 0.8 (9)	8.3 ± 0.5 (9)
6	9.2 ± 0.3 (10)	8.7 ± 0.7 (9)	5.1 ± 0.8 (10)*	5.4 ± 0.6 (9)*
11	9.3 ± 0.3 (10)	9.1 ± 0.3 (10)	6.2 ± 0.7 (5)*	7.1 ± 0.9 (8)*
16	9.1 ± 0.4 (10)	9.2 ± 0.5 (9)	7.2 ± 0.8 (10)*	8.3 ± 0.3 (5)*
20	9.4 ± 0.3 (9)	9.4 ± 0.3 (10)	9.4 ± 0.6 (9)	9.2 ± 0.6 (8)

TABLA IV Proteínas totales en suero (g/dl). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE. El número de determinaciones está entre paréntesis. * $P < 0.005$ VS. C

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SN+CAP
2	0.56 ± 0.14 (5)	0.42 ± 0.1 (5)	0.23 ± 0.15 (8)*	0.29 ± 0.10 (10)*
6	0.41 ± 0.18 (9)	0.46 ± 0.27 (9)	0.04 ± 0.03 (9)*	0.03 ± 0.01 (9)* ^o
11	0.35 ± 0.08 (8)	0.34 ± 0.27 (7)	0.05 ± 0.03 (5)*	0.10 ± 0.06 (7)* ^o
16	0.55 ± 0.19 (9)	0.43 ± 0.24 (9)	0.36 ± 0.19 (8)	0.74 ± 0.35 (5)
20	0.70 ± 0.33 (10)	0.61 ± 0.41 (9)	0.58 ± 0.30 (8)	0.77 ± 0.09 (5)

TABLE V Depuración de Creatinina (ml/min). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE.

El número de determinaciones está entre paréntesis.

*P < 0.005 vs. C

^oP < 0.005 vs. C+CAP

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SM+CAF
2	0.30 ± 0 (10)	0.36 ± 0.12 (10)	0.32 ± 0.06 (10)	0.34 ± 0.10 (10)
6	0.21 ± 0.04 (10)	0.28 ± 0.07 (9)	0.49 ± 0.16 (10)*	0.79 ± 0.08 (9)*OT
11	0.33 ± 0.04 (10)	0.31 ± 0.07 (9)	0.37 ± 0.09 (7)	0.38 ± 0.21 (8)
16	0.33 ± 0.04 (10)	0.35 ± 0.05 (10)	0.30 ± 0.05 (8)	0.40 ± 0.10 (5)
20	0.43 ± 0.08 (7)	0.44 ± 0.07 (10)	0.32 ± 0.04 (9)	0.39 ± 0.08 (8)

TABLA VI Creatinina en suero (mg/dl). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE.
El número de determinaciones está entre paréntesis.
*P < 0.005 VS. C
O P < 0.005 VS. C+CAP
T P < 0.005 VS. SN

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SN+CAP
2	65 ± 16 (8)	114 ± 35 (9)*	61 ± 23 (10)	103 ± 40 (10)*T
6	67 ± 11 (8)	126 ± 35 (9)*	148 ± 47 (10)*	318 ± 75 (10)*T
11	73 ± 19 (8)	156 ± 37 (9)*	83 ± 13 (10)	136 ± 15 (10)*
16	63 ± 11 (7)	131 ± 27 (10)*	77 ± 10 (7)	129 ± 35 (5)*T
20	68 ± 20 (8)	163 ± 39 (10)*	57 ± 26 (9)	182 ± 41 (7)*T

TABLA VII Actividad de ECA en suero (mU/ml). Los resultados están expresados como el promedio ± DE.

El número de determinaciones está entre paréntesis.

*P < 0.005 VS. C

T P < 0.005 VS. SN

DIA	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SE+CAP
2	3 ± 0.5 (5)	8 ± 4 (5)	2 ± 0.9 (7)	3 ± 1 (8)
6	4 ± 1 (9)	6 ± 3 (9)	34 ± 11 (5)*	198 ± 42 (6)*T
11	4 ± 3 (10)	6 ± 3 (9)	2 ± 0.9 (5)	4 ± 1 (9)
16	5 ± 2 (10)	9 ± 3 (8)	3 ± 1 (7)	4 ± 0.9 (5)
20	6 ± 2 (8)	14 ± 7 (7)	3 ± 2 (8)	6 ± 3 (5)

TABLA VIII ECA Urinaria (U/ml/24h). Los resultados están expresados como el promedio \pm DE. El número de determinaciones está entre paréntesis.

*P < 0.005 VS. C

TP < 0.005 VS. SN

TEJIDO	GRUPOS			
	C	C+CAP	SN	SN+CAP
Pulmón	30 ± 6 (8)	22 ± 1 (8)	55 ± 9 (8)*	78 ± 9 (8)*OT
Riñón	1 ± 0.2 (8)	0.8 ± 0.1 (8)	1.1 ± 0.19 (8)	2 ± 0.42 (8)*OT
I. delgado	3 ± 0.64 (8)	2 ± 0.46 (8)	4 ± 0.40 (8)	8 ± 0.86 (8)*OT
Arteria	17 ± 2 (8)	11 ± 0.87 (8)*	18 ± 5 (8)	25 ± 7 (8)*OT
G. adrenal	4 ± 1 (8)	2 ± 1 (8)*	4 ± 0.85 (8)	7 ± 0.99 (8)*OT
Cerebro	9 ± 2 (8)	6 ± 1 (8)*	5 ± 0.90 (8)*	11 ± 0.80 (8)*OT
Corazón	4 ± 1 (8)	2 ± 0.33 (8)*	2 ± 0.30 (8)*	7 ± 0.74 (8)*OT
Hígado	0.26 ± 0.08 (8)	0.29 ± 0.09 (8)	0.49 ± 0.08 (8)*	0.61 ± 0.17 (8)*OT
Testículo	17 ± 5 (8)	11 ± 4 (8)*	26 ± 6 (8)*	37 ± 9 (8)*OT

TABLA IX Actividad de ECA en tejidos ($\mu\text{U}/\text{mg}$ prot.) del día 6.
 Los resultados están expresados como el promedio \pm DE.
 El número de determinaciones está entre paréntesis.
 * $P < 0.005$ VS. C
 O $P < 0.005$ VS. C+CAP
 T $P < 0.005$ VS. SN

VII. DISCUSSION

VII. DISCUSION

En los últimos años se ha demostrado que la ECA no solo juega un papel importante del SRAA, sino en otros sistemas de regulación hormonal y metabólica, así mismo el SRAA en circulación juega un papel central en el mantenimiento de la presión sanguínea y en la homeostasis de fluidos y electrólitos. Estudios de la actividad de ECA en conejos han sugerido que la activación clorhídrica representa un mecanismo regulatorio potencial y que la ECA activada intracelularmente es regulada por hidrógeno y cambios en la concentración del ión Cl^- (42).

También se sabe que hay sustancias que estimulan la biosíntesis de ECA tales como glucocorticoides, inhibidores de ECA, hormonas tiroideas y AMPc (67). Se sabe que la renina es un modulador de la actividad del SRAA circulante, sin embargo, algunos autores han propuesto un papel regulatorio de la ECA en la actividad del sistema renina durante la preñez e hipoxia.

El SRAA está profundamente alterado durante el SN producido por ANP, los niveles de renina y ECA aumentan en tanto que los de angiotensinógeno disminuyen, efectos que se han observado tanto a nivel circulante como en orina (24, 25, 61, 62 y 68). El aumento de ECA en suero se magnifica empleando inhibidores de ECA y hormonas tiroideas.

Los resultados obtenidos en trabajos anteriores confirman datos previos en el sentido en que el aumento de la actividad de ECA es reversible en ratas con SN inducido con ANP (24,25). Además se encontró que existen cambios en la actividad de la ECA en tejidos y en orina; mostrando en un estudio secuencial que los cambios en la actividad de la ECA son tiempo-dependientes y tejido específicos. Sin embargo algunos autores han sugerido que el aumento en los niveles circulantes de la ECA en diversas patologías se puede deber a un daño en el endotelio

vascular (69,70), a una hiperproducción de la ECA a nivel tisular (71,72), y/o a una disminución del catabolismo hepático de ECA (73).

In vivo la actividad de la renina plasmática se regula por un mecanismo de retroalimentación negativo que inhibe la liberación de renina en respuesta a una elevación de bradicinina o de la Ang II plasmática. La inhibición de ECA con captopril puede prevenir el incremento de la concentración de Ang I para ser convertida a Ang II, por lo tanto se ha demostrado que la administración oral del captopril, produce una disminución de bradicinina que está asociado con la caída de la concentración de Ang II y aldosterona plasmática (10).

El captopril es un potente inhibidor del sitio activo de la ECA tanto de plasma como de tejidos. De acuerdo con las observaciones de otros investigadores, dosis de captopril dan como resultado la atenuación de la ECA en plasma así como un aparente efecto inhibitorio reversible. El captopril por tanto es un inhibidor competitivo de la enzima. Recientemente se ha demostrado que una administración crónica del captopril durante una fase crónica de hipertensión produce una disminución en la presión sanguínea, la cual puede estar relacionada con la pérdida de sal y volumen de agua que acompaña a la administración del captopril.

Por otra parte el captopril potencia el incremento en la renina y la disminución en el angiotensinógeno en el plasma (45). Los cambios en la renina circulante y angiotensinógeno están probablemente mediados por cambios en la síntesis y secreción de proteínas. Asimismo se ha demostrado que el captopril aumenta el ARNm de renina renal (60), y disminuye la producción he-

pática de angiotensinógeno (61).

En el presente trabajo se empleó el captopril como herramienta para tratar de conocer el mecanismo por medio del cual la ECA circulante cambia en el SN. Se observó en los resultados obtenidos que el ANP disminuye la ganancia de peso corporal como se puede apreciar en la Tabla I, sin embargo esta modificación es más notable en las ratas del grupo SN+CAP, aunque sí ganan peso a lo largo del estudio, al igual que los otros grupos. Las diferencias significativas con respecto al grupo control se observan a partir del día 6, mientras que la pérdida de peso con respecto al SN solo es significativa el día 11 cuando el grupo SN+CAP sí disminuye de manera notable el peso corporal. Estos datos de crecimiento sugieren que el captopril no sólo no mejora, sino que empeora, la progresión de la enfermedad (5).

Se ha observado que el captopril estimula la biosíntesis de Novo de la enzima en diferentes órganos. En este trabajo el aumento de la actividad urinaria de la ECA durante el SN se potencia por el captopril el día 6 y en el grupo C+CAP los días 2, 16 y 20; mientras que las proteínas urinarias presentan un cambio significativo en el grupo SN con respecto al control, los días 6, 11, 16 y 20 y el aumento se potencia en el grupo SN+CAP el día 6 siendo significativo con respecto al grupo control y SN, indicando que el captopril potencia el efecto del SN sobre la excreción urinaria de proteínas totales.

Esto, se supone es un reflejo de lo que sucede en suero, ya que, se observó que hay una disminución de proteínas séricas en los grupos SN y SN+CAP en comparación con el grupo control y día 2, con una franca hipoproteïnemia los días 6, 11 y 16, mientras que la actividad de ECA en suero presenta un aumento en el

día 6 en los grupos C+CAP, SN y SN+CAP siendo mayor el aumento en este último grupo, lo cual indica que los efectos del SN y del CAP son aditivos. Es decir, la actividad sérica de la ECA está relacionada directamente con la detectada en orina, con lo que se establece que la ECA urinaria es de origen sérico y no de los túbulos renales, lo cual se basa en el hecho de que la ECA urinaria en ratas tratadas con captopril no aumenta en ausencia de proteinuria y por que muestra una correlación positiva con las proteínas urinarias (45,55).

Se ha observado que el aumento de la actividad de la ECA en tejidos en el día 6 pueden contribuir al aumento de la actividad de la ECA en suero. Otros autores han encontrado una relación estrecha entre el aumento de la actividad de la ECA en el suero y en la actividad en pulmón en ratas tratadas con captopril (51). Además la hiperproducción de la ECA en los tejidos sugiere que puede actuar como mediador en el aumento de la actividad de la ECA en suero en la enfermedad de Gaucher (72), y en la Sarcoidosis (71).

También se encontró que existen cambios en la actividad de ECA en tejidos en el día 6. En el grupo SN la actividad de la enzima aumentó en pulmón, hígado y testículo, disminuyó en cerebro y corazón y permaneció igual en riñón, intestino, adrenales y aorta. Sin embargo todos los tejidos tuvieron un aumento significativo en el grupo SN+CAP, tanto con respecto al grupo C, C+CAP y SN, indicando que los efectos del captopril y el SN son aditivos. El grupo C+CAP sólo disminuyó en aorta, adrenal, corazón y cerebro, es decir, el captopril como tal tuvo un efecto sobre la actividad de la ECA en tejidos. Todo es

to sugiere que los mecanismos por medio de los cuáles la ECA aumenta en el SN y con captopril son diferentes, y por lo tanto el captopril no nos permite conocer el mecanismo por medio del cual la ECA circulante cambia en el SN experimental.

El captopril inhibe completamente el efecto presor de la Ang II y la degradación de la bradisinina dentro del organismo y es una forma de probar su acción. Asimismo, el captopril incrementa el flujo renal sanguíneo y disminuye la fracción de filtración; en el presente trabajo esto se comprueba mediante la depuración de creatinina, observándose una disminución significativa el día 6 tanto en el SN como en el SN+CAP. Esto limita la reabsorción en el túbulo proximal porque la presión osmótica en los capilares disminuye y la presión aumenta.

VII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

- La actividad urinaria de la ECA está relacionada directamente con la detectada en la actividad de la ECA sérica, estableciendo que la ECA urinaria es de origen sérico y no de los túbulos renales.

- El captopril no disminuyó la proteinuria, lo que indica que no mejora el daño producido por el ANP.

- El captopril potencia el aumento de la ECA en el SN, es decir el efecto es aditivo; lo que sugiere que los mecanismos por medio de los cuales aumenta la ECA en el SN y con captopril son diferentes.

- El captopril potencia el aumento de la ECA en todos los tejidos en el SN, pero no permite conocer el mecanismo por medio del cual la ECA circulante cambia en el SN.

IX. REFERENCIAS

IX. REFERENCIAS

1. Vallotton MB. The renin angiotensin system. Trends Pharmacol Sci 1987; 8: 69-79.
2. Ballerman BJ, Levenson DJ, Brenner BM. Renin, angiotensin, kinins, prostaglandins and leukotriens. En Brenner BM, Reactor JR, FC eds. The Kidney Philadelphia; Saunders, 1986; 281-304.
3. Soffer RL. Experimental renal hypertension: The discovery of the renin-angiotensin system. En: Biochemical regulation of blood pressure. Editado por Richard L. Soffer. Jhon Wiley & Sons 1981; 4-31.
4. Pedraza-Chaverri J. Influencia de la toxina pertussis sobre la función renal. I Efecto sobre la secreción de renina. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM 1985.
5. Cruz C. Efecto del Captopril (SQ 14,225) sobre el desarrollo del Síndrome nefrótico experimental en ratas. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1988.
6. Dzau V, Pratt E. Renin-angiotensin system: Biology, physiology and pharmacology. En The Heart and cardiovascular system. Raven Press; Nueva York 1986; 631-1662.
7. Ibarra-Rubio M.E. 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.

8. Milledge J.S., Catley D. M. Renin, aldosterone and converting enzyme during exercise and acute hypoxia in humans. J. Appl. physiol. 52: 320-323, 1982.
9. Mario E.W. Ehlers and James F. Riordan Angiotensin Converting Enzyme: New concepts Concerning Its Biological Role. Biochemistry 1989; 28:5311-5317.
10. Peach MJ. Renin angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action. Physiol Rev 1977; 57: 313-370.
11. Mitchell D, Navar L. The renin-angiotensin-aldosterone system in volume control. Baillere's Clin Endocrinology and Metabolism 1989; 3: 393-430.
12. Goldblatt H, Lynch J, Haizal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension. I production or persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. J Exp Med 1934; 59: 347-379.
13. Keeton, T.K. y Campbell, W.O. The pharmacological alteration of renin release. Pharmacol. Rev. 1980; 32: 81-271.
14. 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.
15. Moreno-Muñiz SI. Regulación intracelular de la secreción de renina. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 1989.
16. Dazau VJ, Burt DW & Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin system. American Journal of Physiology. 1988; 255: 563-573.

17. Ganten D, Herman K, Unger T, Lang RE. The tissue renin-angiotensin-system: Focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. Clin Exp Hypertens A 1983;5 (7&8): 1099-1118.
18. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. En: The nephrotic syndrome; editado por Brenner & Steven, Churchill, Livingstone 1982; 9: 85-114.
19. Heyman W, Lund H.Z. Nephrotic syndrome in rats. Pediatr. 1951; 7: 691-706.
20. Marsh J.B, Drabkin D.L. Metabolic channeling in experimental nephrosis. II. Lipid metabolism. J. Biol. Chem. 1955; 212: 633-639
21. Frenk S, Antonowics I, Craig J.M, Metcoff J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955; 89: 424-427.
22. Fiegelson E.F, Drake J.W, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis. J. Lab. Clin. Med. 1957; 50: 437-446.
23. Morisak N, Matsuoka N, Saito Y, Jumagai A. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. Metabolism. 1984; 33: 405-410.
24. Chávez-Ponce MT. Caracterización del sistema renina angiotensina aldosterona en el síndrome nefrótico experimental. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1988.

25. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio M, Chavez MT, Callejo 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 hipoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodium retention. *Rev. Invest Clin* 1990 ; 42: 29-38.
26. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña J.C. 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: 120-126.
27. Hoedemaeker Ph J. Experimental glomerulonephritis. En *Nephrology*, editado por Davidson AM, Cambridge University Press, 1988; 1: 424-426.
28. Skeggs LT, Doreer EE, Khan JR, Lente KE & Levine M. Experimental Renal Hypertension: The discovery of The renin-angiotensin system. Biochemical regulation of blood pressure. Editado por Soffer ML, Wiley J 1981; 3-338.
29. Soffer R. Angiotensin converting enzyme and the regulation of vaso-active peptides. *Annu Rev Biochem* 1976; 45: 73-76.
30. Erdős EG. The angiotensin I converting enzyme. *Fed Proc* 1977; 36: 1760-1765.
31. Erdős EG, Skidgel PA. The angiotensin I converting enzyme. *Lab Invest* 1987; 56: 345-348.

32. Baudin B, Timmins PA, Drovet L, Legrand Y, Baumann F Ch. Molecular Weight and shape of angiotensin I converting enzyme: A neutron scattering study. *Biochem Res Comm* 1988; 154: 1144-1150.
33. Buning P, Riordan JF. The functional role of zinc in angiotensin converting enzyme: Implications for the enzyme mechanism. *T Inorganic Biochem* 1985; 24: 183-198
34. Erdős EG, y Skidgel PA. Structure and functions of human angiotensin I converting enzyme (kininase II). *Biochem. Soc. Trans* 1985; 13: 42-44.
35. Erdős EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am. J. Med* 1970; 60: 749-759
36. Ondentti M.A. y Cushman DW. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological actions. *GRC Critical Reviews in Biochem* 1984; 16(4): 381-411.
- 37 Shapiro K; Riordan F. Inhibition of angiotensin converting enzyme: Mechanism and substrate dependence. *Biochemistry* 1984; 23: 5225-5233.
38. 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.
39. Dubreul 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; 262a 125-130.

40. 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.
41. Van Sande ME, Scharpé SL, Neels HM, Van Camp KO. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. *Clin Chem Acta* 1985; 147: 261-265.
42. Ondentti, MA, y Cushman, D.W. Inhibitors of angiotensin converting enzyme, *En Biochemical regulation of blood pressure*, Editado por R.L. Soffer, Jhon Wiley & Sons. USA, 1981; 165-204.
43. Bauer H, Lametschwandtner A, Steiner M, y Bauer H.C. Influence of angiotensin converting enzyme inhibitor (captopril) on kidney epithelial cells in vitro; studies on potassium (⁸⁶Rb) influx and celular proliferation. *Clin Chim Acta*, 1990; 187: 47-54.
44. Kusaka M, Atarashi K, Matsumoto K, Sumida Y, Shingu T, Cotsuki T, Matsura H and Kakiyama G. Effects of treatment with captopril on exercise tolerance and plasma catecholamines in elderly hypertensives. *Journal of Hypertension* 1989; 7: 59-61.
45. Rodicio J.L, Praga M, Alcazar J. M, Olliet A, Millet G.V, Ruilope M.L. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on the progression of renal failure and proteinuria in humans. *Journal of Hypertension* 1989; 7: 43-47.
46. Stornello M, Valvo V, Vázquez B, Leone S, Scapallato L. Systemic and renal effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition with captopril in hypertensive diabetic patients. *Journal of Hypertension* 1989; 7: 65-67.

47. Unger T, Scüll B, Hübner D, Yukimura T, Lang E, Rascher W, Ganten D. Plasma converting enzyme activity does not reflect effectiveness of oral treatment with captopril. *Eur Journal of Pharmacology* 1981; 72: 255-259.
48. Lombardi F, Ruscone T, Montano N, Pinocchiaro M L, Conti M, Mallani A. Restraining effect of captopril on cardiovascular sympathetic efferent neural activity. *Journal of Hypertension*. 1989; 7: 55-56.
49. Wyvratt M, Patchett A. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Med. Res Rev* 1985; 5 (4): 483-531.
50. Lanzillo JJ, Steven J, Descrathy Y, Yotsumoto H, Fanburg BL. Angiotensin converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic, and immunologic properties. *J. Biol. Chem* 1985; 260: 14938-14944.
51. Fyhrquist F, Gröshagen-Riska C, Horling L, Forslundt, Tikkanen I, Klochare M. The induction of angiotensin converting enzyme by its inhibitors. *Clin Exp Hypertens* 1983; A5: 1319-1330.
52. Yotsumoto A, Kusuya N, Uchimura H, Matsuzaki F. Increased levels of serum angiotensin-converting enzyme activity in hyperthyroidism. *Ann Inter Med* 1982; 96: 126-328.
53. Kokubū T, Kato I, Nishimura K, Hiwoda K, Ueda E. Angiotensin I-converting enzyme in human urine. *Clin Chim Acta* 1978; 89: 375-379.

54. Baggio G, Favaro S, Cantaro S, Bartazzo L, Franzio A, Borsatti A. Increased urine angiotensin converting enzyme activity in patients with upper urinary tract infection. Clin Chim Acta 1981; 109: 211-218.
55. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. Clin Chim Acta 1990; 191: 175-184.
56. Pedraza-Chaverri J, et al. Resultados no publicados.
57. Forslund 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.
58. Kokubu T, Ueda E, Ono M, Kawabe T, Hayashi Y, Kan T. Effects of captopril (SQ 14, 225) on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal rats. Eur J Pharmacol 1980; 62: 269-275.
59. Radziwill R, Stuzmann M, Hingelfeldt U, Hackenthal E. Converting enzyme inhibitor-induced changes of plasma angiotensinogen concentration in the rat. Eur J Pharmacol 1986; 122: 59-64.
60. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, et al. Pathophysiology 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 (Méx) 1990; 42: 210-216.

61. 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; 57: 106-108.
62. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Sandoval AA, Tapia E, Peña Jc. Effect of captopril on urinary excretion of renin and angiotensinogen in aminonucleoside-nephrosis. *Nephron* 1990, enviado.
63. Lowry CA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 267-275.
64. 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.
65. Bohrbach Ms. [Glicine-1-14 C] Hippuryl-1-histidyl-1-leucine: a substrate for radiochemical assay of angiotensin converting enzyme *Anal Biochem* 1978; 272-279.
66. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research *Circ Res* 1980; 47: 1-9.
67. Ibarra-Rubio ME, Cruz C, tapia E, Peña J, Pedraza-Chaverri J. Serum angiotensin converting enzyme activity and plasma renin activity in experimental models of rats. *Clin and exp pharmacology and physiology* 1990; 17: 391-399.
68. Bertani T, Pogg A, Pozzoni E, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Meca G, Remuzzi G, Donati MB. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982; 46: 16-23.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

59

69. Hollinger MA, Giri SN, Patwells, 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.

70. Lieberman J. Sastre A. Serum angiotensin converting enzyme: elevation in diabetes mellitus. Ann Int Med 1980; 93: 825-826.

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

72. Silvertain E, Pertschuk LP, Friedland J. Immunofluorescent detection of angiotensin converting enzyme (ACE) in Gaucher cells. Am J Med 1980; 69: 408-410.

73. Matzaki K, Sakata T. Angiotensin converting enzyme in discas_{is} of liver. Am J Med 1982; 69: 408-410.