



191
2ej⁶
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FUNCION RENAL Y SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA EN UN MODELO DE
INTOXICACION AGUDA POR TETRACLORURO
DE CARBONO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

THALIA SANTANA NAJERA

FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



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.

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	111
I INTRODUCCION.....	1
1. RENINA.....	3
2. ANGIOTENSINOGENO.....	9
3. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.....	10
4. ALDOSTERONA.....	13
5. TETRACLORURO DE CARBONO.....	16
6. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	20
II HIPOTESIS.....	22
III OBJETIVOS.....	22
IV MATERIAL Y METODOS.....	23
1. REACTIVOS.....	23
2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
3. DETERMINACIONES ANALITICAS.....	24
a). Proteínas totales.....	24
b). Creatinina.....	25
c). Urea.....	26
d). Sodio y Potasio.....	28
e). Enzimas séricas.....	28
f). Renina.....	31
g). Enzima convertidora de AI (ECA).....	34
h). Estudios histológicos.....	37
4. ANALISIS ESTADISTICO.....	37
V RESULTADOS.....	39
1. PESO CORPORAL Y CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA.....	39
2. CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS Y ENZIMAS CIRCULANTES.....	39

3.	FUNCION RENAL.....	42
4.	COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.....	42
5.	ESTUDIOS HISTOLOGICOS.....	49
VI	DISCUSION.....	53
VII	CONCLUSIONES.....	58
VIII	REFERENCIAS.....	59

RESUMEN

El solvente orgánico tetracloruro de carbono (CCl_4) produce daño celular debido a la acción del radical libre triclorometilo sobre las membranas plasmáticas lo que provoca lipoperoxidación. La intensidad de su efecto depende de la concentración y de factores como la edad, sexo, vía de acceso, ingestión de alcohol y sensibilidad al compuesto halogenado entre otros. En la intoxicación por CCl_4 ocurre preferentemente daño en hígado y en riñón.

En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento agudo reversible con CCl_4 sobre el sistema renina angiotensina aldosterona y la función renal.

La intoxicación se indujo a 80 ratas macho Wistar con una sola dosis intragástrica de 2.5 ml/Kg de CCl_4 mezclado con un volumen igual de aceite de maíz y se comparó con 20 ratas a las cuales solo se les administró aceite de maíz. Las ratas se sacrificaron 1, 2, 3 y 7 días después de la administración del tetracloruro de carbono y se midió el peso, volumen urinario, consumo de alimento y agua. Además se obtuvieron plasma, suero y tejidos de corazón, riñón, pulmón, cerebro, testículos e intestino delgado.

En suero se midió la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), otras enzimas circulantes como fosfatasa alcalina (FA), deshidrogenasa láctica (LDH), alanina (ALT) y aspartato amino transferasa (AST), proteínas totales, creatinina y urea, mientras que en el plasma se determinó la actividad plasmática de renina (APR) y la concentración plasmática de renina (CPR), de angiotensinógeno (CPA) y de angiotensina I (AI). En orina se

midió sodio, potasio, proteínas totales, aldosterona y ECA. A su vez, en riñón se determinó el contenido de renina y finalmente en todos los tejidos se cuantificaron proteínas totales y actividad de ECA.

El daño por intoxicación con CCl_4 se evidenció por el aumento en las enzimas circulantes que son consideradas marcadores de daño a tejidos y que son LDH, FA, AST, ALT. Se encontró una reducción en el peso corporal y en el consumo de alimento y agua. La disminución en la función renal se evidenció por el aumento de urea y creatinina en suero, por la disminución de la depuración de creatinina y por el aumento en el volumen urinario. Las proteínas séricas, la CPA, CPR, APR y AI disminuyeron, y el contenido de renina renal aumentó. La ECA en suero y orina se elevó, mientras que en los tejidos, a excepción del riñón, disminuyó. Por último, la aldosterona en orina aumentó.

Estos datos indican que el CCl_4 afecta la función renal como consecuencia del daño a túbulo proximal. La reducción de la renina circulante y la elevación del contenido renal de renina sugieren que la secreción de renina se inhibe. El daño hepático ocasionado por el solvente puede contribuir a la disminución del angiotensinógeno. La elevación de ECA en suero y su disminución en los tejidos, puede explicarse por la liberación de la enzima a la circulación como consecuencia del daño ocasionado a los tejidos. El incremento de ECA en orina puede ser consecuencia del daño tubular. El aumento en la excreción urinaria de aldosterona probablemente se deba a la disminución de su catabolismo hepático y renal.

ABREVIATURAS EMPLEADAS.

aa	Aminoácido (s)
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de varianza
ANS	Acido-anilino-1-naftalen-sulfónico
APR	Actividad plasmática de renina
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ASB	Albumina sérica bovina
AST	Aspartato aminotransferasa
BK	Bradiginina
C	Carbón
°C	Grados centígrados
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
Colo	Colaboradores
CPA	Concentración plasmática de angiotensinógeno
CPR	Concentración plasmática de renina
dL	Decilitro
EC	Enzyme Commission
ECA	Enzima convertidora de AI
EDTA	Acido etilendiamino-tetra-acético
EE	Error estándar
FA	Fosfatasa alcalina
Fig	Figura

g	Gramo (s)
h	Hora (s)
HHL	Hipurato de histidil leucina
KDa	Kilodaltones
L	Litro (s)
LDH	Deshidrogenasa láctica
M	Molar
mg	miligramo
mEq	Miliequivalentes
mL	Mililitro (s)
mU	Mil:unidades
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro (s)
PM	Peso molecular
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
U	Unidades
YG	Yuxtaomerulares

AMINOCIDOS.

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Acido Aspártico
Asn	Asparagina
Cis	Cisteína
Fen	Fenilalanina

Gli	Glicina
Glu	Glutamina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tir	Tirosina
Val	Valina

I INTRODUCCION.

Los seres vivos al tener contacto con diferentes tipos de compuestos tóxicos, ya sean drogas, sustancias de origen industrial o de tipo biológico producidas por plantas, hongos, animales e incluso aquellas elaboradas por el propio organismo, desencadenan una serie compleja de respuestas fisiológicas con el fin de mantener la homeostasis.

En el humano existen varios sistemas de control, algunos de ellos operan dentro de las células para controlar funciones intracelulares, otros actúan dentro de los órganos para regular la función de las diversas partes que los constituyen, mientras que otros actúan en todo el cuerpo para coordinar relaciones mutuas entre diferentes órganos.

En los mamíferos, el riñón tiene la función de eliminar de la circulación productos terminales del metabolismo y controlar la constitución de la mayor parte de los líquidos corporales.

La estructura interna de cada riñón se compone de un millón de nefronas o más nefronas en el hombre (Fig. 1), que son la unidad funcional del mismo. Cada nefrona está constituida por un glómerulo a través del cual la sangre se filtra y de un largo túbulo donde el líquido filtrado se convierte en orina mientras circula hasta la pelvis del riñón. El glómerulo es una red de hasta cincuenta capilares paralelos cubiertos por células epiteliales que están incluidos en la cápsula de Bowman, la presión de la sangre en el glómerulo hace que se filtre el líquido hacia la cápsula de Bowman desde donde pasa al túbulo

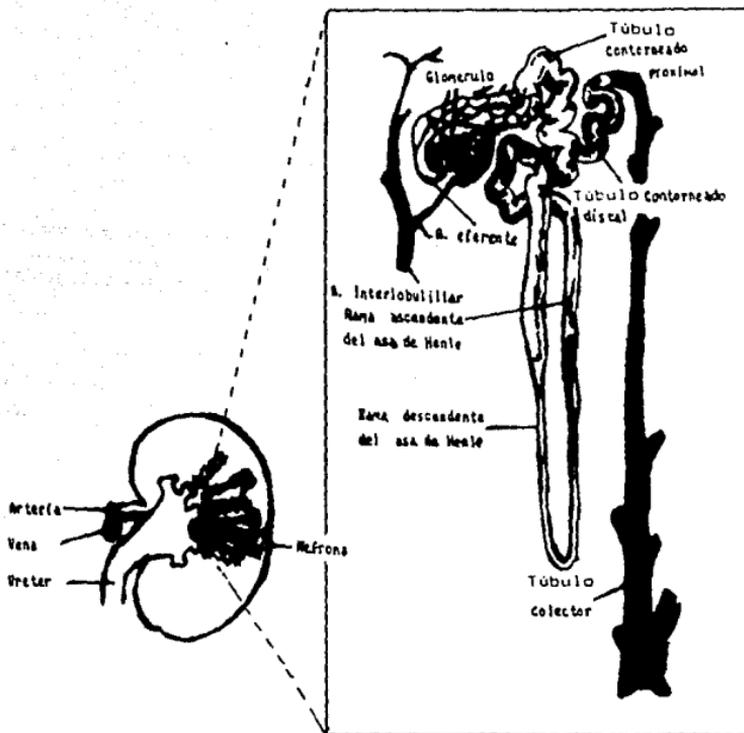


Fig. 1. Estructura de una nefrona (unidad anatómica del riñón) donde se puede apreciar un túbulo con un glomérulo conectado a un túbulo colector. A= arteriola.

proximal situado en la corteza renal, junto con los glomérulos, desde ahí el líquido pasa al asa de Henle y después al túbulo distal que se encuentra de nuevo en la corteza renal y finalmente penetra en el túbulo colector que reúne el líquido de varias nefronas. De éste pasa por la corteza a través de la médula, paralelamente al asa de Henle para luego vaciarse en la pelvis renal. Cuando el filtrado glomerular sigue a través de los túbulos, gran parte del agua y cantidades variables de solutos son reabsorbidos hacia los capilares tubulares, mientras que el agua y los solutos que no se reabsorben se transforman en orina.

Las sustancias que deben ser eliminadas del plasma incluyen productos terminales como urea, creatinina, ácido úrico y uratos, además de sustancias no metabólicas como los iones de sodio, potasio, cloro e hidrógeno cuando estos se consumen o producen en cantidades excesivas (1).

1. RENINA.

La enzima renina se localiza en las células juxtaglomerulares (YG) de la nefrona, de donde se libera a la circulación general por la venas renales y es la limitante de la velocidad del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Por técnicas de microdissección se ha demostrado que la renina es liberada por las células granulares del aparato juxtaglomerular (2), que son células de músculo liso diferenciadas y localizadas en las paredes de cada arteriola renal aferente adyacentes al glomérulo (Fig. 2).

La cantidad de gránulos en las células indican el nivel de síntesis y de la actividad secretora de la renina (3). El

túbulo distal y la arteriola aferente establecen un punto o área de contacto donde las células tubulares son más numerosas y densas por lo que se le conoce como mácula densa. En este punto de unión las células musculares de la arteriola se encuentran hinchadas y llenas de gránulos, estas son las células YG que tienen la capacidad de transformarse, de células musculares lisas a células granulares o viceversa por la variación en el contenido de sal en la dieta o bien como respuesta a tratamientos a largo plazo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (4,5).

La enzima renina es una proteasa ácida la cual actúa sobre el angiotensinógeno (una alfa 2 globulina sintetizada por el hígado), para formar el deca péptido angiotensina I (AI) que es biológicamente inactivo. Sobre éste actúa la ECA que es una dipeptidil carboxipeptidasa que hidroliza al dipéptido His-Leu carboxilo terminal de la AI para formar el octapéptido angiotensina II (AII). A la ECA se le conoce también como cininasa II debido a que inactiva al nonapéptido vasodilatador bradicinina.

La AII tiene una intensa actividad biológica ya que es un potente vasopresor (50 veces más potente que la norepinefrina), estimula la secreción de aldosterona y de angiotensinógeno, inhibe la secreción de renina, aumenta la síntesis de catecolaminas y actúa directamente en cerebro para aumentar la presión por medio del sistema nervioso simpático y parasimpático estimulando la secreción de vasopresina y de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH).

Por otro lado, el ácido aspártico amino terminal de la

AII es hidrolizado por la aminopeptidasa A para producir el heptapéptido angiotensina III que tiene menor actividad biológica que la AII.

Las angiotensinasas son un grupo de enzimas hidrolíticas formado por aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas que hidrolizan las angiotensinas a sus correspondientes aminoácidos.

La cascada de reacciones enzimáticas descritas anteriormente constituyen el SRAA (Fig.3) el cual participa en el balance de líquidos y electrólitos así como en la regulación de la presión sanguínea. La estimulación exagerada de este sistema produce un estado patológico conocido como hipertensión.

El estudio del SRAA se inició en 1898 cuando Tigersted y Bergman demostraron que al administrar un extracto de riñón de conejo por vía endovenosa a animales de la misma especie, se producían elevaciones repentinas y prolongadas de la presión sanguínea lo cual se atribuyó a la gran cantidad de renina que se encontró en el tejido renal y se postuló que éste era el agente causal de la hipertensión (6).

En 1934, Goldblatt y cols. (7) demostraron que la hipertensión inducida por la oclusión parcial de la arteria renal desaparecía al ligarlo totalmente, lo que indicaba que este tipo de hipertensión era causado por un agente humoral liberado por el riñón isquémico.

Por otro lado, en 1940, Page y Helmer (8) demostraron que la renina era una enzima que actuaba sobre un sustrato en el plasma para producir un péptido al cual llamaron angiotonina

mientras que al sustrato sobre el que actuaba lo llamaron sustrato de renina. De manera simultánea Braun-Menéndez y cols. en 1940 (9) hicieron una observación similar pero llamaron a la sustancia hipertensina. Más tarde la sustancia activa fue llamada angiotensina que es una combinación de los términos angiotonina e hipertensina.

Aunque el riñón es el sitio más importante de síntesis de renina también se ha encontrado isoenzimas en otros tejidos incluyendo cerebro, glándulas adrenales, arterias y venas, útero, placenta y glándula submandibular de ratón (10). Además, se ha encontrado ARNm de renina en cerebro, glándulas adrenales, corazón, testículos y glándula submandibular de ratón (11).

A pesar de que la renina se encuentra en otros tejidos diferentes al renal, se acepta que la mayor parte de la enzima presente en el plasma se origina en el riñón. Esto se confirma cuando la renina circulante prácticamente desaparece después de la binefrectomía. Esta enzima tiene una vida media de 80 minutos o menos y es específica para su sustrato, lo cual es poco común en una enzima proteolítica. Su acción catalítica se restringe a la hidrólisis de un solo enlace peptídico del angiotensinógeno. En la mayoría de las especies, la renina rompe el enlace Leu¹⁰-Leu¹¹ del sustrato para liberar el fragmento amino terminal. Sin embargo, en el humano el enlace que hidroliza es Leu¹⁰-Val¹¹ por lo que la hidrólisis del angiotensinógeno solo se lleva a cabo por renina humana o de primates (6).

La renina se sintetiza como un precursor inactivo llamado preprorenina, parte del cual se convierte intracelularmente en prorenina (6) y éste a su vez en renina

activa, de tal forma que en el plasma circulan ambas formas de renina (activa e inactiva). Los niveles de prorenina en el plasma humano son considerablemente más altos que la renina activa (11).

Se conocen por lo menos 5 mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina del riñón (12) y son:

- 1.- Un barorreceptor intrarrenal que responde a los cambios de la presión sanguínea.
- 2.- La mácula densa que responde a la concentración del ión sodio y/o cloro.
- 3.- El sistema nervioso simpático y catecolaminas circulantes.
- 4.- Los factores hormonales, angiotensina II, prostaglandinas, adenosina, esteroides y factor auricular natriurético y endotelial.
- 5.- La concentración de electrólitos plasmáticos como potasio y calcio.

Además, los mensajeros intracelulares que regulan la secreción de renina son AMPc, calcio, inositol trifosfato y proteína cinasa C (13, 14).

2. ANGIOTENSINOGENO.

El angiotensinógeno o sustrato de renina es una glucoproteína presente en la fracción alfa-2 globulina del plasma. Fue purificada del plasma de cerdo por Skeggs y cols. en 1963 (15). Su peso molecular en el humano es de 61.4 kilodaltones (KDa) y el de la molécula libre de carbohidratos es de 49.77 KDa. En la rata el angiotensinógeno tiene un peso molecular de 65 KDa y la molécula libre de carbohidratos es de 49.548 KDa (16,17).

Los primeros experimentos en donde se realizó hepatectomía proporcionaron las evidencias de que el angiotensinógeno se sintetiza en el hígado (18). Más tarde se demostró que el angiotensinógeno puede sintetizarse in vitro en perfusiones hepáticas (19), rebanadas de hígado de rata (20) y en hepatocitos aislados (21). También se ha detectado en la linfa renal de ratas y en gránulos subcelulares específicos de la corteza renal (22,23).

Por técnicas inmunocitoquímicas Richoux y cols. en 1983 (24) demostraron que el angiotensinógeno estaba presente en forma granular en las células del túbulo proximal de riñón de ratas. Además se encontró ARNm de angiotensinógeno en la corteza y médula renal de rata y ratón (5,11,25). La localización del ARNm en las células del túbulo proximal, indica que probablemente el angiotensinógeno se sintetiza en estas células y se secreta dentro del intersticio cortical donde a su vez es hidrolizado por la renina (26).

3. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I.

Es una dipeptidil carboxipeptidasa la cual puede romper una amplia variedad de sustratos como AI, bradicinina (Bk), Leucina- y Metionina-enkefalinas, por la ruptura de fragmentos dipeptídicos del extremo carboxilo (27, 28).

La ECA es una glucoproteína que consiste de una sola cadena de aminoácidos (aa) con un peso molecular entre 129 y 200 kDa y con un centro activo que contiene una molécula de zinc (28). La actividad de la enzima es dependiente de ión cloro, su

actividad máxima la alcanza alrededor de un pH de 8 y su punto isoeléctrico es de 4.5 (29).

La clasificación que le da la Enzyme Commission es EC 3.4.15.1, pertenece al grupo de las hidrolasas, ya que cataliza la ruptura hidrolítica de un enlace ("3"), es una dipeptidil hidrolasa porque actúa sobre un enlace peptídico ("4") libera un péptido de un polipéptido por lo que se clasifica como peptidil dipeptidil hidrolasa ("15") y por romper el extremo carboxi de sus sustratos se considera como dipeptidil carboxipeptidasa, y su número progresivo es el "1" (30).

Esta enzima se localizó y purificó por primera vez en el plasma de caballo por Skeggs y cols. en 1954 (27) quienes observaron que la enzima convertía el decapeptido AI en un octapeptido (AII).

La mayor parte de la conversión de AI a AII ocurre durante el paso de la sangre por los pulmones. Sin embargo, se ha observado que otros tejidos y órganos también pueden convertir la AI en AII (31).

Estudios posteriores demostraron que la superficie de las células endoteliales vasculares en pulmón son ricas en ECA (32), aunque también se ha encontrado en muchos otros tejidos (33). En el riñón se ha demostrado la presencia de la ECA por la conversión de AI (34) así, también se ha encontrado que la enzima esta presente en los vasos sanguíneos del iris de las ratas (35), ovario, cerebro (36), fibroblastos de piel en humanos (37), túbulo proximal (38), suero (39) y en otros tejidos como corazón, intestino y testículo (40,41). En este último la enzima

difiere en estructura de la localizada en el pulmón por lo que se considera que son isoenzimas. La ECA en testículo aparece después de la pubertad, su tamaño y peso molecular son menores en comparación con la localizada en el pulmón (42,43). La enzima convertidora juega un papel importante en la motilidad de los espermatozoides y en los mecanismos de inmunidad (41). El origen de la ECA circulante no está esclarecido pero se sugiere que esta es liberada a la sangre durante el recambio normal de las membranas celulares que la contienen. La enzima es una peptidasa transmembranal, con ancla peptídica hidrofóbica insertada dentro de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (27). Debido a su amplia localización se le ha asociado a otros sistemas hormonales diferentes del SRAA como son la hidrólisis de análogos de colecistocinina y gastrina (44).

La actividad de la ECA en suero puede variar según la especie. En cobayos, por ejemplo, la actividad es 72 veces mayor que la que se presenta en perros (44,45).

Se sabe que la actividad de la enzima se reduce en el suero en enfermedades como tuberculosis, cáncer pulmonar y fibrosis quística. Sin embargo, en enfermedades como la sarcoidosis, histoplasmosis, lepra y enfermedad de Gaucher los niveles séricos de la ECA se encuentran elevados lo cual parece estar asociado al proceso activo de estas enfermedades (47). En la sarcoidosis la ECA se ha propuesto como auxiliar en su diagnóstico, ya que los niveles de la enzima en otras enfermedades con altos índices de actividad no siempre son constantes (47).

La ECA puede ser inhibida por numerosos compuestos entre

los que se encuentran aquellos que forman complejos metálicos, como EDTA, EGTA, dimercaptopropanol o cationes como níquel, cadmio, plomo y calcio, que reemplazan al ión zinc de la enzima para formar una metaloproteína catalíticamente inactiva (15,48). La actividad de la ECA también es inhibida por los dipéptidos liberados de AI y bradicinina (His-Leu y Fen-Arg), compuestos sulfhidrilo, análogos estructurales de AI, insulina, glutatión y el veneno de algunas serpientes como Bothrops jararaca (especie sudamericana) y Akistrodon halysblomotti (especie asiática) por lo que potencian a la bradicinina in vitro. Se sabe que en el veneno de la especie B. jararaca hay nueve péptidos cada uno con capacidad inhibitoria, algunos de estos se han sintetizado y probado su capacidad para inhibir la hidrólisis de AI y de bradicinina in vivo e in vitro.

El SQ 20881 (teprotide) fue el primer inhibidor específico de ECA probado clínicamente y se ha utilizado ampliamente en investigación, aunque su uso clínico es limitado. Una droga antihipertensiva con potente efecto inhibitor de la enzima ECA es el captopril (SQ 14,225) que la inhibe a concentraciones nanomolares, es altamente competitivo, de amplio uso clínico y de investigación (49).

4. ALDOSTERONA.

Es una hormona esteroide-aislada e identificada por Simpson y cols. en 1953 (50). Se sintetiza en la zona glomerular de la corteza adrenal (Fig.4); como su gran potencia es balanceada por una reducida tasa secretora comparada con la mayoría de esteroides adrenales, se metaboliza rápidamente por el

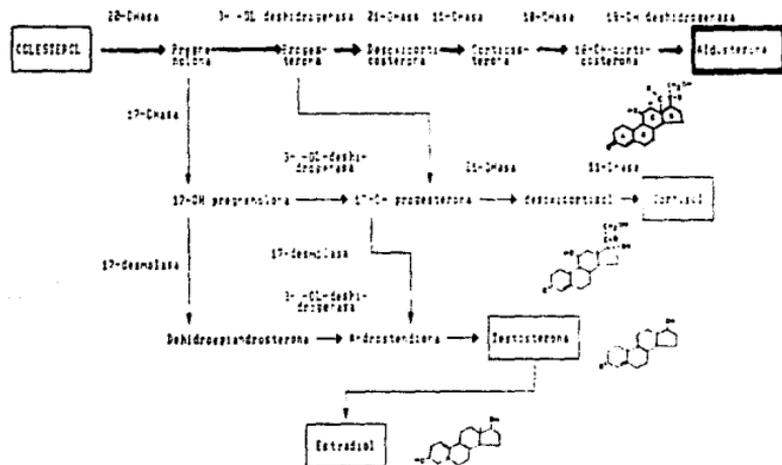


Fig. 4. Síntesis bioquímica de aldosterona y otros corticosteroides.

hígado y por el riñón transformando a la hormona en una variedad de metabolitos y conjugados (51-53). Se sabe que después de 48 h de la inyección de aldosterona marcada, aproximadamente el 90% de la radiactividad aparece en la orina. El hígado, como ya se mencionó, es el sitio principal de catabolismo de la aldosterona. Del 40 al 50% de esta hormona sufre la reducción del anillo A y la conjugación del ácido glucurónico en la posición 3 para dar tetrahydroaldosterona, del 5 al 10% sufre la conjugación del ácido glucurónico en la posición 18 formándose un metabolito ácido lábil debido a que se hidroliza a un pH de 1. Una pequeña proporción de aldosterona circulante se convierte a 18-glucuronido de aldosterona en los riñones.

La aldosterona penetra a las células epiteliales del túbulo distal y se une a un receptor específico en el citoplasma, el complejo receptor-aldosterona, migra al núcleo y se une a un receptor de cromatina nuclear, dando lugar a la estimulación de un ARN y a la síntesis proteica. Una proteína específica es el mediador de la principal función de la aldosterona, es decir, el intercambio de sodio por potasio en el túbulo distal (52).

La acción de la aldosterona se manifiesta por el aumento en la reabsorción de sodio y cloro así como la excreción de potasio. La hormona es la responsable del 95% de actividad mineralocorticoide de la corteza adrenal, tiene una potente acción para aumentar la reabsorción de sodio en la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle en el túbulo distal, en el túbulo colector y en el túbulo proximal, aunque en este último es menor comparada con los otros túbulos (54).

Los factores que se ha considerado que pueden regular la

secreción de aldosterona son:

- 1) Sistema renina-angiotensina.
- 2) Concentración sérica de potasio.
- 3) Hormona adrenocorticotrópica.
- 4) Prostaglandinas.

5. TETRACLORURO DE CARBONO.

El tetracloruro de carbono (CCl_4) es un solvente orgánico no inflamable de olor característico que se puede disolver en agua, alcohol, benceno, cloroformo, éter y aceite; es más pesado que el aire (55). Se ha empleado en la industria como constituyente de algunos tipos de extinguidores, en la medicina como vermífugo antihelmíntico, fumigante de granos y como desmanchador de uso casero. En la actualidad algunos de sus usos se han abandonado debido a sus efectos tóxicos y por disponerse de alternativas más seguras (56).

La importancia del solvente ha aumentado al encontrarse que forma parte de los contaminantes ambientales emitidos por fábricas, fugas de tanques de almacenamiento y por otras fuentes de emisión de CCl_4 (57).

En los mamíferos el contacto con el tóxico produce lesiones principalmente en el hígado, aunque pueden encontrarse también alteraciones en la estructura del riñón (58). La administración del solvente en roedores proporciona un modelo reproducible de necrosis hepática el cual ha sido muy útil en la investigación relacionada con el estudio de las alteraciones hepato-renales (59).

El mecanismo de toxicidad se debe a la formación del metabolito reactivo triclorometilo (CCl_3) que es un radical libre formado por la ruptura homolítica del CCl_4 (60). La biotransformación se produce por oxidación en el retículo endoplásmico y se ha planteado que la toxicidad que ocasiona se debe a la reacción del radical libre con los lípidos y proteínas (61). El grupo formado por Recknagel y Glende propone en 1973 que el radical libre es el causante de la peroxidación de los lípidos poliénoicos del retículo endoplásmico, y que los radicales libres secundarios derivados de los lípidos producen una reacción en cadena que es el resultado de la reacción de los radicales libres clorinados con el oxígeno, lo que ocasiona la lipoperoxidación y ruptura de las membranas alterando de esta manera su función (62,63).

Durante la intoxicación el compuesto halogenado se absorbe rápidamente a través de los pulmones y en forma más lenta por el tracto digestivo y la piel (58). Se ha estudiado que esta velocidad de absorción se incrementa por la ingestión de alcohol (64) y otros factores como la obesidad, desnutrición, hipertensión, daño hepático, pulmonar, cardíaco, renal e incluso aquellos en los que se presenta sensibilidad a los hidrocarburos halogenados (65).

Así, se puede decir que en el ser humano la intoxicación puede variar de acuerdo a su susceptibilidad, duración y modo de exposición (66).

Cuando la exposición es transitoria a concentraciones que producen intoxicación se presenta fiebre, irritación de las mucosas nasales y conjuntivales con presencia de epistaxis

subconjuntival y equimosis periorbital; náuseas, vómito, diarrea y distensión abdominal (67-69). Cuando la exposición es por poco tiempo, los síntomas por lo general desaparecen, no así cuando el contacto es continuo o hay una mayor absorción de CCl_4 ; al suceder esto el cuadro clínico se caracteriza por la presencia de estupor, convulsiones y coma o muerte por depresión del sistema nervioso central, y es posible que se presente muerte súbita por fibrilación ventricular o depresión de los centros bulbares vitales (70).

A su vez, la intoxicación leve con el solvente puede caracterizarse por oliguria reversible que dura solo unos días. La recuperación se produce en tres etapas descritas por Sirota en 1949 (71). La primer etapa se presenta cuando la oliguria cesa aunque las concentraciones de creatinina y urea en plasma se mantienen elevadas. En la segunda etapa se inicia una rápida disminución de las concentraciones de urea y creatinina plasmáticas. Y en la tercera etapa, que se presenta aproximadamente un mes después del daño inicial, el flujo sanguíneo renal y la filtración glomerular comienzan a mejorar recuperándose la función renal después de 100 a 200 días.

En los casos más severos, la oliguria puede llegar a casi anuria en el término de una semana con presencia de glóbulos rojos y albúmina. Cuando no se restablece la función renal se produce hipertensión, cianosis, convulsiones, acidosis, uremia terminal o coma urémico y/o edema pulmonar generalizado (71).

El tratamiento de emergencia en la intoxicación con el

compuesto halogenado debe iniciarse lo más pronto posible en cualquier persona con sospecha de haberse expuesto a cantidades tóxicas del compuesto. Los individuos expuestos al vapor deben ser llevados a zonas ventiladas y para aquellas que lo han ingerido provocar el vómito si es que se encuentra consciente, si no lo está, se debe practicar un lavado gástrico aunque también es necesario administrar laxantes salinos para disminuir la absorción. Cuando se les observa por primera vez en la etapa depresiva avanzada del sistema nervioso central, debe prevenirse la hipoxia administrando respiración artificial y oxígeno, nunca debe elevarse la presión arterial con el uso de drogas simpaticomiméticas por existir el riesgo de producir serias arritmias (69).

El tratamiento para la insuficiencia hepática y renal es difícil. Aunque el daño hepático es un rasgo prominente de la intoxicación, la insuficiencia renal es la causa más frecuente de muerte por lo que la función renal no debe pasar desapercibida y es necesario observar de cerca la presencia de oliguria o anuria. Las medidas básicas empleadas en el tratamiento de insuficiencia renal aguda son la administración de glucosa, el mantenimiento del volumen y composición de los líquidos corporales así como la aplicación de diálisis (58,72,73).

El CCl_4 por sí solo es hepato y nefrotóxico, pero agentes como el alcohol, DDT (74) y fenobarbital (75), que estimulan el metabolismo de las drogas, favorecen su efecto en forma notable. Por el contrario, agentes como el ácido pantoténico, cistamina (76), vitamina E (77) y acetilcisteína (73) lo disminuyen y se han propuesto como protectores del

efecto hepatotóxico.

Se sabe que al desarrollarse la lesión hepática en ratas también se observan signos de daño renal. El CCl_4 produce una lesión reversible del túbulo proximal. El daño se inicia en mitocondrias seguido por hinchazón y proliferación del retículo endoplásmico liso con aumento simultáneo de la excreción de sales y agua (78). Aunque el daño se presenta preferentemente en el túbulo proximal y el asa de Henle, la necrosis del túbulo distal también puede presentarse. Los túbulos proximales se dilatan, el epitelio se inflama y el material sudanofílico se observa en la porción basal de la célula (59). Se ha propuesto que la entrada de calcio a través de la membrana plasmática de hepatocitos es la responsable de los daños celulares irreversibles ocasionados por el CCl_4 . El gradiente de concentración de calcio se mantiene normal en la membrana celular de hepatocitos, sin embargo, la capacidad de estas células para mantener una concentración intracelular baja de calcio se pierde rápidamente después de la exposición aguda con el solvente halogenado lo que ocasiona que el calcio se acumule (62,63).

6. ANTECEDENTES DIRECTOS.

Al administrar dosis tóxicas de CCl_4 que producen lesión hepática de tipo crónico se afectan el peso corporal, y el consumo de agua y alimento llegando a hipovolemia (79).

La respuesta de algunas enzimas e isoenzimas en el plasma al producirse el daño con el solvente es elevando su actividad; por ejemplo, la aspartato aminotransferasa que es un

indicador de daño hepático y cardíaco (69,80-82), alanina aminotransferasa y deshidrogenasa láctica (83,84).

Sin embargo, en ratas tratadas con una sola dosis de CCl_4 no se han caracterizado los cambios en el SRAA y tampoco se conocen los cambios en la actividad de la ECA urinaria ni la de diversos tejidos.

En los modelos crónicos para inducir cirrosis con CCl_4 los niveles de renina y aldosterona en el plasma son elevados (79) o normales (85) al igual que en el humano (86). En un modelo de hepatitis experimental con CCl_4 el SRA se suprime debido a la hiperperforación renal y es posible que esta juegue un papel primario en los niveles bajos de AI y en la actividad de renina plasmática (85).

En ratones tratados con una sola dosis (2.5 ml/Kg) de CCl_4 , la ECA aumenta en el suero y se reduce en el pulmón a las 48 h lo cual sugiere que el solvente produce daño a las células endoteliales del pulmón (87).

Por otra parte, en la especie Meriones unguiculatus tratados con una sola dosis de CCl_4 (2.4 ml/Kg), se han detectado radicales libres en hígado y en otros tejidos como son riñón, corazón, pulmón, testículo, cerebro y sangre (88) lo que demuestra la existencia de daño en tejidos diferentes al hígado y riñón.

II HIPOTESIS.

El daño que se produce durante la intoxicación aguda con CCl_4 puede alterar los niveles circulantes de angiotensina I, angiotensinógeno, renina y enzima convertidora de angiotensina I así como los niveles tisulares de renina y enzima convertidora de angiotensina I.

El daño tubular agudo que se produce con el solvente CCl_4 puede aumentar la excreción urinaria de enzima convertidora de angiotensina I localizada en túbulo proximal y alterar la función renal.

III OBJETIVOS.

En base a las hipótesis anteriores se plantearon los siguientes objetivos, utilizando como modelo experimental ratas macho Wistar tratadas en forma aguda con tetracloruro de carbono.

-Evaluar algunas de las alteraciones en la función renal (volumen urinario, proteinuria, excreción urinaria de sodio, potasio y depuración de creatinina).

-Determinar las alteraciones en el sistema renina angiotensina-aldosterona.

-Conocer los cambios de actividad de la enzima convertidora de angiotensina I en orina, suero y en algunos tejidos.

IV MATERIAL Y METODOS.

1. REACTIVOS.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.: Nonidet P-40, albúmina sérica bovina fracción V, reactivo de Folin & Ciocalteus, carbón activado, dextrán, 2,3 dimercaptopropanol, sulfato de 8-OH-quinolina, benzoato de bencilo, hipurato de histidil leucina (HHL) y Tris-HCL. El HHL radiactivo (^{14}C) y la angiotensina I (^{125}I) se obtuvieron de New England-DuPont. El tetracloruro de carbono (CCl_4) se obtuvo de Merck de México. El anticuerpo para medir angiotensina I (AI) por radioinmunoanálisis se preparó en nuestro laboratorio (89,90). Las demás sustancias se obtuvieron comercialmente y fueron de alta pureza.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron 100 ratas macho de la cepa Wistar de 200 ± 20 g. La intoxicación aguda por CCl_4 se indujo en 80 ratas con una sola dosis intragástrica de 2.5 ml/Kg mezclándola con un volumen igual de aceite de maíz (91). El grupo control consistió de 20 ratas a las cuales se les dió el mismo volumen de vehículo (aceite de maíz). Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas durante todo el estudio (2 días antes y 7 días después de la administración del CCl_4 o del vehículo) para recolectar orina, medir el peso corporal y consumo de alimento y agua. Las ratas se sacrificaron por decapitación los días 1,2,3 y 7 después de la administración del CCl_4 y 7 días después de la administración del vehículo. De cada rata se obtuvo sangre que se separó en dos fracciones, una para suero y la otra para plasma, a la cual se le

agregaron 50 microlitros de EDTA 250 mM. Además se extrajeron los siguientes tejidos: corazón, riñón, testículo, y una porción de cerebro, pulmón e intestino delgado, los cuales se mantuvieron congelados a -70°C hasta su procesamiento. En suero se midió la actividad de ECA, fosfatasa alcalina (FA), deshidrogenasa láctica (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), creatinina, urea y proteínas totales, mientras que en el plasma se determinó la actividad plasmática de renina (APR) y la concentración plasmática de renina (CPR), de angiotensinogeno (CPA) y de angiotensina I (AI). En orina se midió sodio, potasio, aldosterona, proteínas totales y ECA. En riñón se determinó el contenido renal de renina, y en todos los tejidos se determinarán proteínas totales y actividad de ECA.

3. DETERMINACIONES ANALITICAS.

a). PROTEINAS TOTALES.

Las proteínas totales se midieron por el método de Lowry y cols. (92), utilizando como patrón albúmina sérica bovina (ASB). En la primera etapa de esta reacción se involucra la formación de un complejo proteína cobre en solución alcalina, en la segunda etapa de la reacción, el complejo formado reduce a un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (Fenol folín y Ciocalteu) para producir un intenso color azul. Las soluciones empleadas fueron:

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 la solución A + 1 ml. de la solución B.

Solución D: Folín-fenol y Ciocalteu 1 N.

Solución E: Solución patrón de albúmina sérica bovina, 50 mg/100 ml.

Tanto la solución de albúmina como la muestra se colocaron en un volumen final de 0.2 ml. El procedimiento fué el siguiente: se tomaron 0.1 ml de una dilución 1:100 de suero (o la cantidad correspondiente de la solución E) + 0.1 ml de agua, esta dilución puede modificarse de acuerdo a la concentración de proteínas en la muestra. Se agregó 1 ml de solución C, se agitaron y se dejaron en reposo durante 10 minutos, se les agregó 0.1 ml de la solución D, se dejaron en reposo durante 30 minutos y finalmente se leyó la densidad óptica a 660 nm.

Las proteínas urinarias se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético al 10%. El precipitado obtenido se resuspendió en 0.6 ml de hidróxido de sodio 0.5 M. La determinación fué idéntica a la antes descrita. La concentración se multiplica por el volumen urinario el resultado se expresó en mg de proteína/día.

De los tejidos previamente homogeneizados se tomaron muestras del sobrenadante, se les hizo la dilución dependiendo del tejido y finalmente se tomó la muestra para cuantificar las proteínas por la técnica antes citada. Los resultados se expresan en mg/ml.

b) CREATININA.

La creatinina se midió por el método de picrato alcalino en un analizador 2 de creatinina Beckman. Se inyectaron 0.025 ml de muestra al aparato que se mezclaron con el reactivo picrato

alcalino en una celdilla de reacción. Se midió la velocidad del aumento de absorción debido a la formación del complejo alcalino de picrato de creatinina. La velocidad de formación del complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. El analizador utiliza un sistema de detección óptica, empleando una fuente luminosa, un filtro 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 en el reactivo picrato alcalino, la creatinina de la muestra se combina con el ácido picrico en presencia de iones OH en el reactivo, y produce un complejo de color rojo (fig.A). Los resultados se expresan en mg/dL. Para calcular la depuración de creatinina se utilizó la siguiente relación en donde las unidades se expresan como mL/min.

$$D = \frac{\text{Creatinina urinaria mg/dL} \times \text{Flujo urinario mL/min.}}{\text{Creatinina en suero mg/dL}}$$

c). UREA.

La urea se cuantificó en un analizador BUN 2 Beckman. Este analizador utiliza un método enzimático que mide la velocidad de la conductividad en la reacción. Un volumen de 0.010 ml. se inyecta y se mezcla con el reactivo en la cubeta de reacción. El electrodo de conductividad mide la velocidad de aumento de conductividad en la reacción. La velocidad medida es proporcional a la cantidad de nitrógeno uréico presente en la muestra (fig.B). Resultados en mg/dL

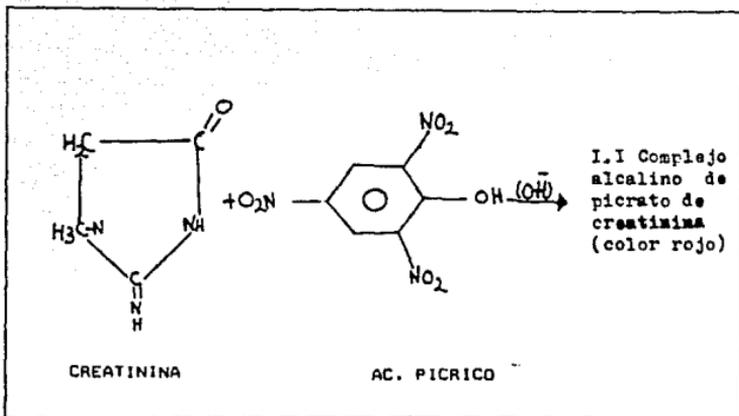


Fig. A. Formación del complejo picrato de creatinina

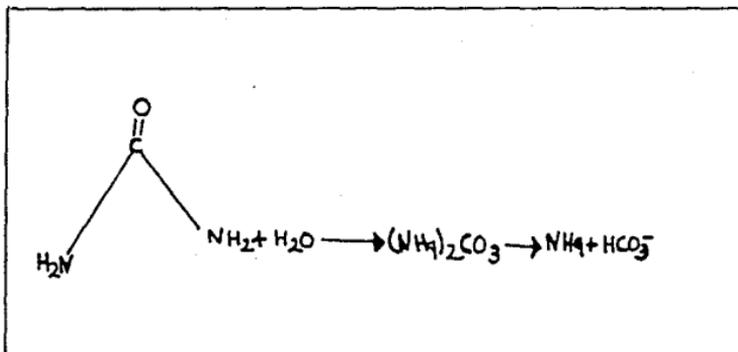


Fig. B. Reacción para determinar la cantidad de urea por la conversión de la urea en carbonato de amonio

d). SODIO Y POTASIO.

El sodio y el potasio se midieron por flamometría en un flamómetro digital modelo 343. Este flamómetro compara electrónicamente la señal de la concentración de la muestra de Na/K con la señal de la concentración de la constante de Litio y se reporta a la relación de estas dos cantidades directamente en unidades de concentración del elemento analizado. A 0.25 ml de orina se le adicionó 1 ml de agua desionizada (1:5), la solución es aspirada por el aparato, el cual muestra digitalmente la concentración de Na/K a los pocos segundos. La concentración obtenida se multiplica por el volumen urinario y el factor de dilución. Los resultados se expresan en mEq/L.

e) ENZIMAS SERICAS.

Las enzimas FA, AST, ALT y LDH se midieron por medio de un estuche comercial Beckman específico para cada enzima.

FOSFATASA ALCALINA (FA).

Las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis de una amplia gama de ésteres de ácidos fosfóricos, fisiológicos y no fisiológicos, en medio alcalino. Los sustratos naturales de estas enzimas no han sido identificados hasta este momento. Por esto, se han empleado una amplia gama de sustratos sintéticos en los métodos de ensayo de FA, eligiéndose cada uno en función de la propia conveniencia. Se ha encontrado que los grupos hidroxil alcohólicos sirven como aceptores de fosfatos acelerando la velocidad de reacción de la FA. El reactivo para FA Dri-STAT (tampón CO_3) se formula como un reactivo de un solo componente y contiene manitol como aceptor.

Los valores elevados de FA se asocian con enfermedades hepáticas que incluyen obstrucciones de las vías biliares.

La fosfatasa alcalina cataliza la siguiente reacción:



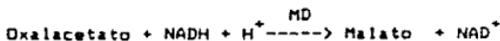
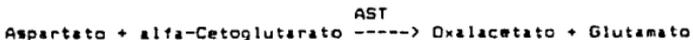
El sustrato no tiene color mientras el p-nitrofenol absorbe luz a 405 nm. La velocidad de aumento de absorbencia es directamente proporcional a la actividad de FA en la muestra, los resultados se expresan en U/L.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST).

Las aminotransferasas, también llamadas transaminasas, son un grupo de enzimas que catalizan la interconversión de ácidos amino y alfa-ceto por la transferencia de un grupo amino. La aspartato aminotransferasa cataliza la transferencia del grupo amino de alanina a alfa cetoglutarato, produciendo glutamato y oxaloacetato.

Se encuentran niveles elevados de AST en el infarto al miocardio. La determinación de AST tiene valor diagnóstico en conjunción con la determinación de alanina aminotransferasa la cual permanece en niveles normales. Se observa elevación de AST en casos de hepatitis viral y tóxica así como en enfermedades musculares y traumáticas.

La secuencia de la reacción enzimática empleada en el análisis de aminotransferasa es la siguiente:



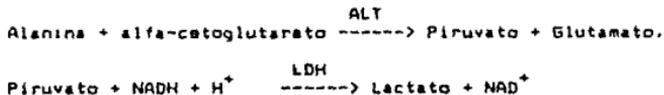
La reacción de aminotransferasa primaria se acopla con una reacción de deshidrogenación. La malato deshidrogenasa (MD) cataliza la reducción de oxalacetato a malato con la oxidación concomitante de NADH. La velocidad de disminución de la absorbencia a 340 nm debido a la oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad de AST en la muestra.

ALANINA AMINDTRANSFERASA (ALT).

La alanina amino transferasa cataliza la interconversión de alanina a alfa-cetoglutarato, produciendo glutamato y piruvato.

La determinación de la actividad de ALT es de gran valor en el diagnóstico de la hepatitis tóxica y viral, así como de las enfermedades y trauma musculares. Los niveles normales de ALT son significativos en el diagnóstico de infarto de miocardio conjuntamente con niveles elevados de la separtato aminotransferasa.

La secuencia de reacciones enzimáticas empleada en el ensayo de la alanina aminotransferasa es la siguiente:



La reacción primaria de aminotransferasa está acoplada con una reacción de deshidrogenación. La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción de piruvato a lactato con la consiguiente oxidación del dinucleótido adenina nicotinamida reducido (NADH). La disminución en la absorbencia a 340 nm debida

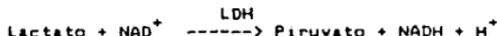
a la oxidación del NADH es directamente proporcional a la actividad de ALT en la muestra. Resultados en U/L.

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).

La enzima lactato deshidrogenasa cataliza la interconversión de lactato y piruvato; por esto, la enzima no es específica para esta única reacción. Debido a que la LDH cataliza la oxidación de otros ácidos alfa-hidroxi, las determinaciones clínicas de LDH se basan indistintamente en la oxidación de lactato (reacción directa) o en la reducción de piruvato.

El aumento en los niveles de LDH se asocian con el infarto de miocardio. Se observan elevaciones de LDH en enfermedades hepáticas, anemia perniciosa, algunos casos de enfermedades renales y de traumatismo muscular.

La reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa es la siguiente:



La formación de NADH reducido produce un aumento de absorbencia a 340 nm. La velocidad de cambio de absorbencia es directamente proporcional a la actividad de LDH en la muestra. Los resultados se expresan en U/L.

f). RENINA.

En el plasma se cuantificó por RIA de RI (95-98), APR, CPR, CPA, AI y el contenido renal de renina (CRR).

CONCENTRACION PLASMÁTICA DE RENINA (CPR).

La concentración de renina en el plasma se midió

indirectamente por RIA de AI generada por la acción enzimática de la renina sobre el angiotensinógeno. Los anticuerpos usados para esta determinación así como para la cuantificación de angiotensinógeno plasmático fueron preparados y caracterizados en nuestro laboratorio. El procedimiento fue el siguiente: A la muestra de plasma (0.05 ml) se le adicionaron 0.005 ml de B-OH-quinolina, 0.005 ml de Dimercaprol (inhibidores de la ECA y angiotensinasas), 0.45 ml de plasma de ratas binefrectomizadas y 1 ml de amortiguador de maleatos (pH 6.0, 0.1 M). Se tomo 1 ml de esta mezcla y se incubo a 37°C. Al final de la incubación se tomaron 0.1 ml y se les adiciónó 0.05 ml de A¹²⁵I y 0.5 ml del anticuerpo. La mezcla se icubó 18 h a 4 °C. La radiactividad libre se separó con una solución de carbón activado y dextrán. La radiactividad unida al anticuerpo se determino por conteo en un contador de radiaciones gamma. Se construyó la curva patrón para interpolar las muestras problema. Las concentraciones de los patrones fueron : 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 y 5.00 ng AI/ml.

ACTIVIDAD PLASMATICA DE RENINA (APR).

La actividad plasmática de renina se midió al igual que CPR por RIA de AI. En APR la producción de AI se lleva a cabo en presencia de sustrato endogeno. La cantidad de AI también se midió a 4 °C. El resto del procedimiento, curva patrón y forma de calcular es idéntica a la presentada para la CPR.

CONCENTRACION PLASMATICA DE ANGIOTENSINOGENO (CPA).

La CPA también se determino por RIA de AI. En este caso la variante, en relación a la determinación de la CPR, fue que se

adicionó un exceso de renina (para agotar angiotensinógeno) en vez de un exceso de sustrato (para saturar a la renina en CPR). El procedimiento de RIA fué el mismo. Las variantes del procedimiento fueron: a 0.025 ml de muestra se le adicionaron 0.005 ml de B-DH-quinolina, 0.005 ml de dimercaprol, 0.005 de EDTA 250 mM, 0.005 de renina porcina y 0.3 ml de amortiguador de maleatos pH 6.0.

CONTENIDO RENAL DE RENINA (CRR).

Para cuantificar la renina intrarrenal, primero se homogeneizaron las rebanadas de riñón en un homogeneizador de tejidos (politrón) se les adicionó 1 ml de amortiguador de maleatos pH 6 y se centrifugó a 2500 rpm. Este paso se repitió hasta completar un volumen de 4 ml. Se le hizo una dilución 1:20 con amortiguador de maleatos pH 6 y se generó de la misma manera que para la concentración plasmática de renina.

ANGIOTENSINA I (AI).

La AI se midió por RIA de AI. Se tomaron 0.1 ml de plasma al cual se le adiciono 0.005 ml de B-DH-quinolina y 0.005 ml de dimercaprol. La muestra con inhibidores no se genera y el procedimiento de RIA es el mismo que para las anteriores. Los resultados se expresan para AI en ng/ml, CPR, APR, y CPA en ng AI/mL/h y para CRR como ng AI/mg.

ALDOSTERONA.

La técnica de RIA también se utilizo para medir aldosterona (93,94). El método se basa en la competencia entre la aldosterona marcada con ¹²⁵I y la aldosterona conteniendo el

patrón o la muestra por un número fijo y limitado de sitios activos de anticuerpo. En el estuche comercial el anticuerpo está pegado al tubo. Los patrones son de: 0, 50, 100, 250, 500 y 1000 pg de aldosterona. Un amortiguador de fosfatos pH 7.4 al cual se le agrega la sal disódica del ácido B-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS) también son incluidos en el estuche.

Para la aldosterona urinaria se efectuó una hidrólisis ácida de la orina (93,94) en donde a 0.1 ml de orina se le agregaron 0.2 ml de HCl 0.2 N; se mezcló y se incubó de 15 a 20 h a una temperatura de 30 °C. La aldosterona se midió en 0.01 ml del hidrolizado, a los cuales se les adicionaron 0.2 ml del patrón cero (sol. de proteínas, sin aldosterona) y 0.5 ml de aldosterona radiactiva. La incubación se realizó de 18 a 22 h a una temperatura de 18 a 25 °C. La mezcla incubada de cada tubo se aspiró cuidadosamente y se contó la radiactividad pegada al tubo en un contador de radiaciones gamma durante 1 minuto. Los resultados se expresan en ng/dLa.

g) ENZIMA CONVERTIDORA DE AI.

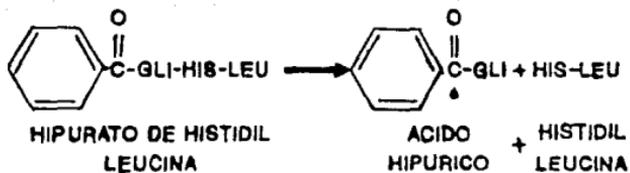
La ECA se cuantificó por medio de un ensayo radioquímico con el sustrato HHL- ¹⁴C (91,92). Previamente al ensayo los tejidos de riñón, corazón y testículo, las porciones de cerebro, pulmón e intestino delgado se homogeneizaron en un homogeneizador de tejidos (politrón), en una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M pH 7.8, KCl 30 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 0.25 M y Nonidet P-40 al 0.1%. El homogenado se dejó reposar durante aproximadamente 24 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 minutos a 4 °C y del sobrenadante se tomaron las

alícuotas para determinar la actividad de ECA. La enzima hidroliza al HHL en histidil leucina y ácido hipúrico (AH) (fig. C), este último, que está marcado radiactivamente, se extrae con acetato de etilo y se cuenta en un contador de radiaciones beta durante 2 minutos.

Previo al ensayo se mezclaron 3.5 microlitros de HHL- ^{14}C con un volumen igual de HHL no radiactivo 68.1 mM (preparado con etanol y agua 6:4) por tubo. La concentración final del HHL fue de 5 mM. La mezcla se seco con nitrógeno y se resuspendió en 0.04 ml de amortiguador Tris-HCl 0.125 M, NaCl 0.6 M pH 8.3. Cada muestra requirió para su análisis de 4 tubos de los cuales dos fueron blancos y dos problema. La cantidad de muestra fue de 0.01 ml. A los tubos blanco se les agregaron 0.05 ml de HCl 1 M y a todos los tubos se les agregó 0.04 ml de sustrato-amortiguador. Se incubaron a 37°C a diferentes tiempos según el tejido (ver tabla).

	Volumen (microlitros)	Incubación (minutos)
SUERO	5	5
ORINA	10	60
PULMON	10	5
RIÑON	10	20
CEREBRO	10	20
CORAZON	10	20
INTESTINO DELGADO	10	20
TESTICULOS	5	10

Después de la incubación se colocaron 0.05 ml de HCl 1 M a los tubos problema y a todos los tubos se les adicionó 0.3 ml



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

de acetato de etilo iniciando con los tubos blanco. Se agitaron durante 15 segundos en un vortex y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron 0.2 ml de muestra de la fase orgánica, y se colocaron en 5 ml de líquido de centelleo en un frasco destinado para contar radiaciones beta. Los resultados se expresan en suero como mU/mL, en tejidos como mU/mg proteína y en orina mU/dLs.

h). ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

Fragmentos de tejido renal constituidos por corteza y médula se fijaron con una solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos y se incluyeron en parafina. Los cortes de 4 a 5 micras de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina para realizar estudios de microscopía de luz.

El análisis ultraestructural se realizó en pequeños fragmentos cúbicos de corteza renal que se fijaron con glutaraldehído al 4% en amortiguador de cacodilatos 0.01 M a temperatura ambiente durante 4 h. Posteriormente se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 2% , se deshidrataron en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol y finalmente se incluyeron en resinas de Epon. Se obtuvieron cortes semifinos y finos con un ultramicrotomo Sorval MT-6000, los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. El estudio ultraestructural se realizó con un microscopio electrónico Zeiss M-10.

4. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos se expresan como el promedio (\bar{x}) \pm error estándar (EE). Se aplicó el análisis de varianza univariado (ANOVA, el cual se realizó usando una calculadora Hewlett packard

modelo 41CV. Cuando el ANOVA fue significativo se determinó cuáles grupos fueron diferentes al control por medio del método de Bonferroni (101), el cual se basa en el uso de valores de t modificada. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

V RESULTADOS.

1. PESO CORPORAL Y CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA.

Para evaluar el efecto tóxico general del CCl_4 en las ratas, se determinaron el peso corporal y el consumo de alimento y agua.

En la fig. 3 se muestran los cambios en el peso corporal (5A), consumo de alimento (5B) y consumo de agua (5C). El peso corporal de las ratas tratadas con CCl_4 disminuyó claramente desde el día 1, alcanzó el valor mínimo el día 2 (10% menos que el control) e inició su recuperación a partir del día 3, aunque en el día 7 no alcanzó el peso de las ratas control. El consumo de alimento de las ratas tratadas con el compuesto halogenado disminuyó el día 1, alcanzó el valor mínimo el día 2 (87% menos que el control), y aumentó el día 3 hasta llegar a valores cercanos al control el día 4. La ingestión de agua disminuyó el día 1, alcanzó el valor mínimo el día 2 (57% menos que el control) y aumentó el día 3 hasta llegar a valores similares al control el día 4.

2. CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS Y ENZIMAS CIRCULANTES.

Para evaluar el daño a tejidos producido por el CCl_4 se midieron los niveles circulantes de fosfatasa alcalina, deshidrogenasa láctica, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa que son enzimas marcadoras de daño tisular, es decir, que se liberan a la circulación inespecíficamente al producirse una lesión en tejidos.

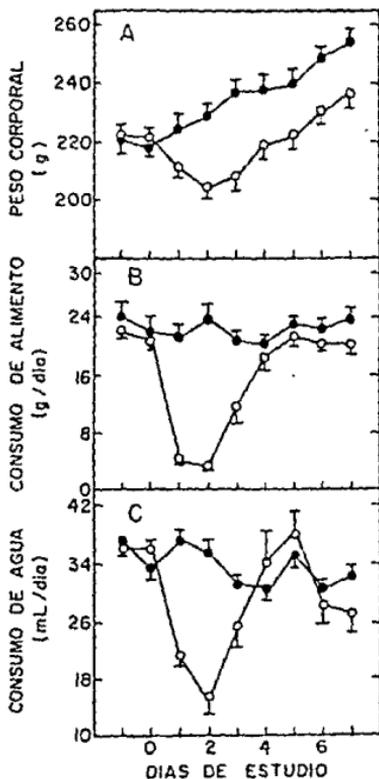


Fig. 5. Perfiles del peso (A), consumo de alimento (B) y agua (C) de las ratas control contra las tratadas con CCl₄. Los datos se expresan como la media \pm EE de 25 a 30 determinaciones por día de estudio. ● = control y ○ = con CCl₄.

En la tabla 1 se presentan los cambios en la concentración de proteínas séricas y en los niveles circulantes de las enzimas AST, ALT, LDH Y FA. La concentración de las proteínas séricas disminuyó los días 1, 2 y 3 (15%, 8% y 8%, respectivamente) comparándolas con los controles. Todas las enzimas circulantes aumentaron: LDH 2.8 veces el día 1, ALT 6.1 y 4.8 veces los días 1 y 2, AST 7.4 y 5.0 veces los días 1 y 2, y finalmente FA 1.7, 1.6 y 1.4 veces los días 1, 2 y 3 respectivamente.

 TABLA 1. CONCENTRACION DE PROTEINAS Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN EL SUERO DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON CCl_4 .

	DIAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE CCl_4				
	CONTROL	1	2	3	7
PROTEINAS (g/dL)	7.5±0.18	6.4±0.13*	6.8±0.14*	6.8±0.12*	7.5±0.16
AST (U/L)	307±16	2278±401*	1551±197*	810±113	291±14
ALT (U/L)	131±8	800±136*	629±92*	205±89	125±8
LDH (U/L)	2713±179	7493±1170*	3603±479	2232±381	2876±134
FA (U/L)	322±23	531±44*	498±46*	463±37	306±15

 ANOVA* $p < 0.05$. Los datos están expresados como la media ± EE de 10-15 determinaciones en diferentes animales. AST= Aspartato aminotransferasa, ALT= Alanina aminotransferasa, LDH= Deshidrogenasa láctica y FA= Fosfatasa alcalina.

3. FUNCION RENAL.

En la fig. 6 se indican los cambios en el volumen urinario (6A) y en la proteinuria (6B) en ratas tratadas con CCl_4 . El volumen urinario aumentó hasta un valor máximo el día 1 (1.92 veces) y después disminuyó paulatinamente hasta llegar a valores control el día 7. Las proteínas en orina aumentaron solo el día 2 (2 veces).

En la fig. 7 se muestran los cambios en la excreción urinaria de sodio (7A) y potasio (7B) en las ratas tratadas con CCl_4 . La excreción urinaria de sodio disminuyó el día 1, alcanzó un valor mínimo el día 2 (disminuyó 70%) y regresó a valores similares al control el día 4. La excreción urinaria de potasio disminuyó el día 1, alcanzó un valor mínimo el día 2 (52% menor que el control) y regresó a valores parecidos al control el día 5. En la fig. 8A se presentan los valores de urea sérica, la cual aumentó 1.3 y 1.5 veces en los días 1 y 2, respectivamente. La creatinina sérica aumentó 1.3 veces el día 1 y 1.8 veces el día 2 (fig. 8B). Por último, la depuración de creatinina (fig. 8C), que es una medida de la filtración glomerular, disminuyó los días 1, 2, y 3 (45%, 65% y 31%, respectivamente).

4. COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.

En la tabla 2 se observan los cambios en los niveles circulantes de los componentes del SRAA en las ratas tratadas con CCl_4 . La concentración plasmática de AI disminuyó 93%, 97% y 62% los días 1, 2 y 3, en tanto que la actividad plasmática de renina disminuyó 66% y 87% los días 1 y 2 respectivamente, y aumentó 1.34 veces el día 7.

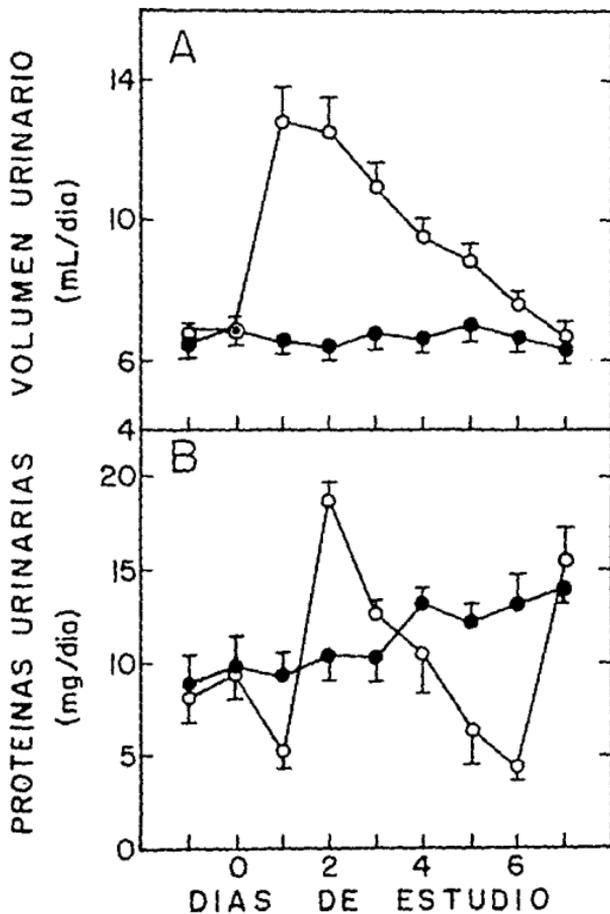


Fig. 6. Volumen de orina (A) y proteínas urinarias (B) por día de estudio tanto en ratas tratadas como en ratas control. Los datos se expresan como la media \pm EE de 10-15 determinaciones en diferentes ratas. ● = control y ○ = con CCl₄.

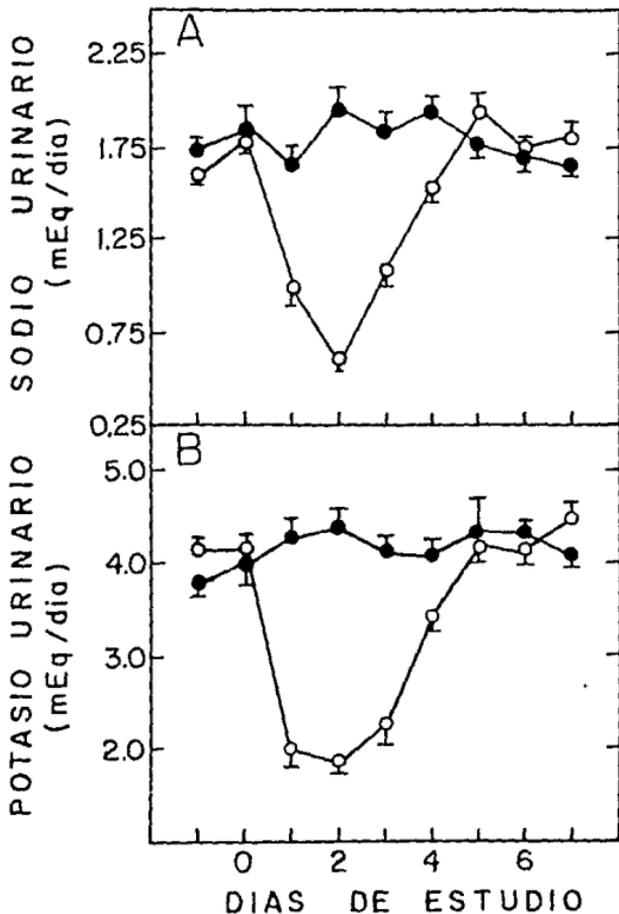


Fig. 7. Perfiles de excreción urinaria de sodio (A) y potasio (B) en ratas control y tratadas con CCl_4 . Los datos se expresan como la media \pm EE de 25-30 determinaciones. \bullet = control y \circ = con CCl_4 .

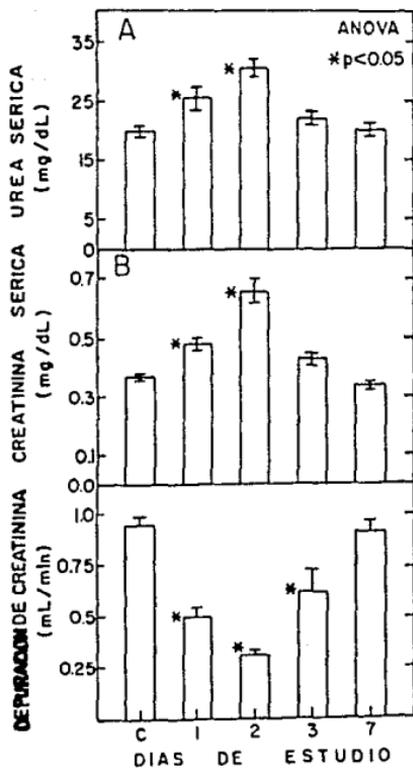


Fig. B. Concentración de urea (A) y creatinina sérica (B) y depuración de creatinina (C). ANOVA * P < 0.05. O = control y O = con CCl₄.

La concentración plasmática de renina disminuyó 66% el día 2 y aumentó 1.46 veces el día 7. La concentración plasmática de angiotensinógeno disminuyó 50% el día 1, 47% el 2 y 25% el 3 y aumentó 1.46 veces el día 7. La concentración plasmática de angiotensinógeno disminuyó 50%, 47% y 25% los días 1, 2 y 3, respectivamente y aumentó 1.8 veces el día 7. El contenido renal de renina se incrementó 1.9, 2.7 y 2.2 veces los días 1, 2 y 3. Por último, la actividad sérica de ECA aumentó 1.7, 2.0 y 1.5 veces los días 1, 2 y 3.

TABLA 2. COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA EN RATAS CONTROL Y EN RATAS TRATADAS CON CCl₄.

		DÍAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE CCl ₄				
		CONTROL	1	2	3	7
AI	0.45±0.04 (ng/mL)	0.03±0.01*	0.01±0.01*	0.13±0.03*	0.36±0.04	
APR	9.8±0.7 (ngAI/mL/h)	3.3±0.2*	1.3±0.3*	6.6±0.7	13.3±1.4*	
CPR	22±1 (ngAI/mL/h)	19±2	8±1*	17±1	33±2*	
CPA	875±37 (ngAI/mL/h)	439±37*	466±35*	651±25*	1571±50*	
CRR	4.3±0.2 (ngAI/mg)	8.2±0.6*	11.8±2.2*	9.6±1.0*	3.7±0.3	
ECA	62±5 (mU/mL)	105±6	129±9*	92±9*	47±5	

ANOVA* P<0.05. Los resultados están expresados como la media ± EE de 15 a 20 determinaciones usando animales diferentes. AI= angiotensina I, APR= actividad plasmática de renina, CPR= concentración plasmática de renina, CPA= concentración plasmática de angiotensinógeno, CRR= contenido renal de renina y ECA= enzima convertidora de angiotensina I.

En la tabla 3 se muestra la actividad de ECA en los diferentes tejidos estudiados. Los valores más altos se obtuvieron en testículo y los más bajos en corazón. Esta actividad bajó en todos los tejidos con excepción del riñón en donde no hubo cambios significativos. En testículo disminuyó los días 1 y 2, en pulmón los días 3 y 7, en intestino delgado los días 2, 3 y 7, en cerebro el día 2, y en corazón los días 2, 3 y 7.

TABLA 3. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I (mU/mg PROTEINA) EN RATAS CONTROL Y EN RATAS TRATADAS CON CCl_4 .

TEJIDO	DIAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE CCl_4				
	CONTROL	1	2	3	7
TESTICULO	56.0±2.6	35.0±2.7*	37.3±3.2*	53.1±3.2	56.4±3.4
PULMON	27.9±1.7	25.0±1.8	22.4±1.3	18.7±1.2*	17.5±1.4*
INTEST. D.	7.3±0.6	7.4±0.5	4.8±0.7*	3.0±0.3*	3.6±0.5*
CEREBRO	1.0±0.1	1.1±0.1	0.5±0.1*	0.7±0.1	0.8±0.1
RIÑON	1.0±0.1	1.0±0.1	1.3±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1
CORAZON	0.3±0.02	0.3±0.02	0.1±0.01*	0.1±0.02*	0.1±0.01*

ANOVA* $P < 0.05$. Los resultados están expresados como la media ± EE de 8-10 determinaciones en animales diferentes. INTEST. D.= intestino delgado.

En la fig. 9 se observan los cambios en la excreción urinaria de ECA (fig. 9A) y aldosterona (fig. 9B). La excreción urinaria de ECA alcanzó un valor máximo los días 1 y 2 y disminuyó paulatinamente hasta llegar a valores control el día 7. La aldosterona urinaria aumentó 2.6 y 3 veces los días 1 y 2 y regresó a valores parecidos al control el día 3.

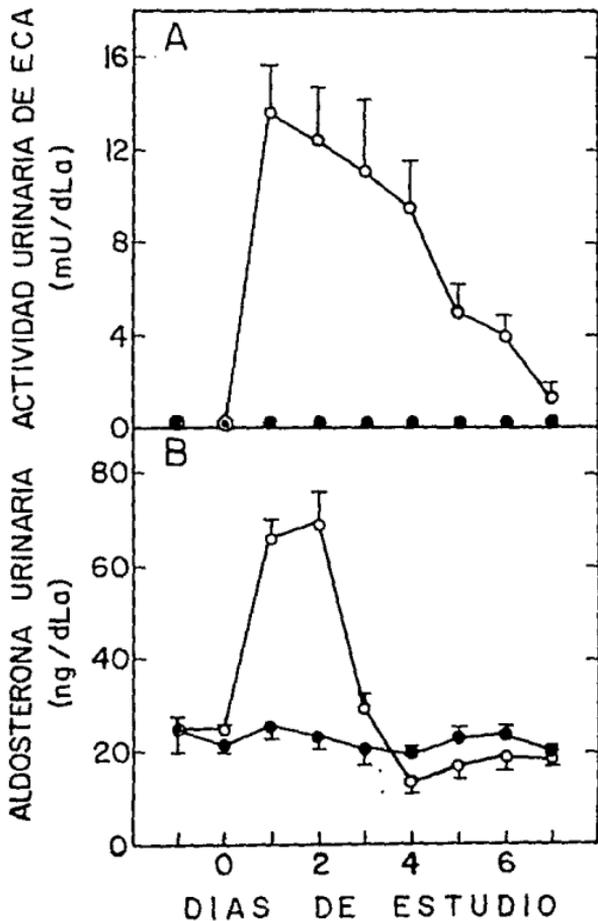


Fig. 9. Actividad urinaria de ECA (A) y concentración urinaria de aldosterona (B) en ratas tratadas y control. Los datos se expresan como el promedio \pm EE de 10-15 determinaciones por día. O = control y \circ = con CCl_4 .

5. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

Las alteraciones ultraestructurales fueron estudiadas 24, 48 y 72 h después de la administración del CCl_4 . A las 24 h (Fig. 10) se observarán cambios importantes en la estructura mitocondrial caracterizados por vacuolación de la matriz, lo cual origina compresión con deformación de las crestas, dilatación y conformación esférica; en el citoplasma apical y lateral se congregan gran número de estructuras tubulares distribuidas irregularmente limitadas por membrana en cuyo interior hay filamentos electrodensos. Existen además vacuolas citoplásmicas de tamaño variable en cuyo interior se observa material electrodenso escaso finamente granular, algunas de estas estructuras pueden identificarse como vacuolas autofágicas. Las microvellosidades apicales son cortas ó están ausentes.

Después de 48 y 72 h de la ingestión de CCl_4 se observó un incremento en el número de las estructuras tubulares previamente descritas (Fig. 11 y 12), las cuales son de aspecto más compacto en las porciones laterales de las células epiteliales. Las mitocondrias muestran menos edema pero tienen múltiples depósitos electrodensos de tamaño diverso que corresponden a calcio precipitado.



Fig. 10. Micrografía electrónica de un vaso capilar localizado entre dos túbulos contorneados proximales, 24 h después de la administración de CCl_4 . Las células endoteliales muestran fragmentación extensa del citoplasma celular (12,500 X)



Fig. 11. Imagen ultraestructural de las células del epitelio tubular proximal 48 h después de la administración de CCl_4 . Existen acentuada proliferación túbulo cisternal y vacuolación citoplásmica. (4,000 X).



Fig. 12. Micrografía electrónica del citoplasma del epitelio túbulo proximal 72 h después de la administración de CCl₄. Existe daño mitocondrial acentuado caracterizado por la dilatación de las crestas mitocondriales, el retículo endoplásmico muestra también dilatación y fragmentación (10,000 X).

VI DISCUSION.

El presente estudio se enfocó a conocer la respuesta de cada uno de los componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona durante la intoxicación aguda con tetracloruro de carbono, evaluando, además algunas de las alteraciones que se producen en la función renal.

La administración de una sola dosis intragástrica de tetracloruro de carbono (2.5 ml/kg) en ratas, ocasiona un daño renal agudo sin dejar de mantener su efecto directo en el hígado.

Después de la administración del CCl_4 se observó que las ratas disminuyen la ingestión de alimento y agua, lo cual ocasiona una disminución del peso corporal durante los tres primeros días. Estudios previos de Striker y cols., (59) y Elias (79) también demostraron que el peso disminuye tanto en los modelos agudos como en los crónicos inducidos con este solvente.

Por otro lado, se sabe que las enzimas séricas como AST, ALT, LDH y FA muestran un incremento en su actividad cuando hay evidencias de daño en diferentes tejidos (65, 68, 83, 84). En este estudio también se encontró un incremento en la actividad de las enzimas antes mencionadas, lo cual nos indica la presencia de daño a nivel tisular.

Asimismo, se encontró una disminución en la concentración de proteínas totales del suero. Es posible que esto sea ocasionado por la lipoperoxidación que sufren las membranas de los hepatocitos, lo cual induce una alteración del metabolismo de los lípidos y una disminución en la síntesis de proteínas (62,102). A su vez, Panduro y cols. (91), han demostrado que al

administrar una sola dosis de 2.5 ml/Kg de CCl_4 en ratas la transcripción del gen de albúmina disminuye en un 85% regresando a valores normales después de tres días.

Los valores de urea y creatinina sérica, marcadores de la función renal, se incrementan. Estos datos, junto con la disminución de la depuración de creatinina, indican que la función renal disminuye en este modelo. Striker y cols. (59) también encontraron un aumento en la creatinina y urea séricas en un modelo similar.

Se observó un incremento en el volumen urinario con un pico de diuresis máxima a las 24 h, lo cual concuerda con datos previos (59) en donde se propone que el aumento puede deberse a la lesión renal reversible limitada al túbulo proximal y asa de Henle. La excreción urinaria de sodio y potasio disminuyó a pesar de la lesión renal, esto parece explicarse por la marcada disminución en el consumo de alimento y agua.

En la orina de las ratas tratadas se observaron proteínas el día 2, la proteinuria solo se había reportado en el modelo crónico de CCl_4 (104). Es probable que la proteinuria no tenga su origen en el glomérulo, sino en los túbulos dañados. Por un lado, la evidencia de las alteraciones ultraestructurales del túbulo proximal dañado en donde este puede liberar enzimas intracelulares a la orina, y por otro, la pérdida de la capacidad para reabsorber proteínas pequeñas que se filtran explicando así la proteinuria. Cuando existe una proteinuria de origen glomerular esta es mucho más abundante que la tubular, por ejemplo, en la proteinuria glomerular la excreción de albúmina excede los 10 g, en tanto que en la proteinuria tubular la

excreción de beta-2 microglobulina puede exceder 100 mg (105). Para determinar definitivamente si el origen de la proteinuria presente en las ratas con CCl_4 es glomerular o tubular, es necesario determinar el peso molecular de las proteínas urinarias por la técnica de electroforesis en geles de acrilamida y/o medir marcadores de daño tubular como la alfa-1 microglobulina o la beta-2 microglobulina.

El aumento en la excreción urinaria de aldosterona probablemente es secundario a una disminución en el catabolismo renal y hepático de esta hormona como consecuencia del daño en estos tejidos.

El comportamiento de la APR, CPR y CPA después de la administración del compuesto halogenado es bifásico, primero disminuyen (días 1-3) y después aumentan (día 7). Se ha observado que en la cirrosis inducida en ratas, los valores de APR aumentan (79) mientras que en la hepatitis experimental disminuyen (85). En este último modelo, al igual que en este trabajo, también disminuye la AI (85). La disminución de APR y CPR probablemente se deba a la inhibición de la secreción de renina. Mourelle y Meza (60) observaron en un modelo agudo de CCl_4 en ratas que el calcio intracelular se acumula. Los depósitos electrondensos encontrados en el análisis ultraestructural y que corresponden a calcio precipitado apoyan la teoría en la cual suponemos que esta ión es el responsable de la inhibición de la secreción de la renina. El aumento del contenido intrarrenal de renina puede ser el resultado de la inhibición de la secreción de esta enzima en presencia de una síntesis normal, lo que finalmente ocasiona

la acumulación renal de la enzima. La disminución de la CPA probablemente se deba al daño que sufre el hígado que es el sitio principal de su síntesis. Sin embargo, con estos datos no se sabe si esto se debe a una disminución en la síntesis, en la secreción y/o aumento de su catabolismo, o si es una combinación de estos fenómenos.

La actividad de ECA en suero, orina, testículo, pulmón, intestino delgado, cerebro y corazón también se afecta durante la intoxicación con el solvente. En suero la actividad se incrementa, mientras que en los tejidos disminuye a excepción del riñón, donde la actividad de la enzima no es significativamente diferente de los valores control. La disminución de ECA en tejidos coincide con el aumento de la misma en suero, lo que sugiere que probablemente parte de la enzima circulante deriva de los tejidos dañados, ya que se ha informado daño a otros tejidos diferentes de hígado y riñón como corazón, pulmón, testículo, cerebro y sangre en donde el CCl_4 produce la formación de radicales libres (86).

Se ha observado que al administrar aminonucleósido de puromicina, el cual produce daño tisular por la formación de radicales libres en las ratas, la actividad de ECA en suero aumenta (45,100) y hay cambios en la actividad de la enzima en tejidos y en orina (106), lo que indica que las sustancias que producen daño tisular por formación de radicales libres pueden producir alteración en la actividad de ECA.

Hollinger (87) observó que al administrar 2.8 ml/Kg de CCl_4 a ratones, los niveles de ECA en pulmón se reducen, mientras que en hígado y riñón permanecen sin cambio. También observó que

la disminución de ECA en pulmón coincide con el aumento de la misma en suero y concluye que el aumento de la enzima circulante se debe al daño por CCl_4 .

La ECA circulante probablemente deriva del recambio de las membranas del endotelio (107), aunque su origen no se ha esclarecido. Se ha sugerido que el aumento en los niveles circulantes de la enzima en las diversas patologías puede deberse al daño ocasionado al endotelio vascular (108,109) o bien a la disminución del catabolismo hepático de la misma (110).

En orina no se detectó la actividad de la enzima convertidora de AI en los animales control, esto puede deberse a que la enzima se encuentra en bajas concentraciones, o bien que no está presente normalmente. No existen datos previos en la literatura sobre la excreción urinaria de ECA en ratas normales. Solo existe información de enzima presente en la orina de humanos normales (111), en donde se sugiere que el origen de la ECA son los túbulos renales y no el plasma. Esto se comprueba por las observaciones hechas en donde la enzima aumenta en las afecciones renales del tracto urinario superior y en el rechazo agudo de trasplante renal(112).

El CCl_4 produce daño renal, principalmente al túbulo proximal (56,100) en donde la ECA es abundante (113) lo cual indica que posiblemente la mayoría de ECA excretada por orina proviene de los túbulos dañados, descartando la posibilidad de que provenga del plasma ya que el daño a los glomérulos es mínimo como se observó en el análisis ultraestructural, lo que se refleja en la baja excreción de proteínas urinarias.

VII CONCLUSIONES.

- 1.- La función renal disminuyó como consecuencia del daño al túbulo proximal por el CCl_4 .
- 2.- La renina circulante disminuyó y la renina intrarrenal aumentó como consecuencia, probablemente, de la inhibición de la secreción de renina.
- 3.- La disminución del angiotensinógeno circulante tal vez se deba a la disminución de su síntesis secundaria al efecto hepatotóxico del CCl_4 .
- 4.- El aumento en la excreción urinaria de aldosterona se explica por la probable disminución de su catabolismo hepático y renal.
- 5.- La disminución de la enzima convertidora de AI en tejidos y su aumento en el suero sugieren que estos cambios se deben al daño ocasionado por el solvente a los tejidos.
- 6.- El aumento en la excreción urinaria de ECA tiene su origen probablemente en el túbulo proximal, como consecuencia del daño que este sufre por la acción del CCl_4 .

VIII REFERENCIAS

1. Guyton CA. Tratado de fisiología médica. 5a. edición. México: Editorial Interamericana, 1977;pp 1159.
2. Faarup, P. Renin localization in the different parts of the juxtaglomerular apparatus in the cat kidney. 2. Fraction of the afferent arteriole, and the glomerulus. Acta Pathol Microbiol Scand 1971;72:1109-117
3. Davies JD, Freeman RH. Mechanisms regulating renin release. Physiol Rev 1976;56:1-56.
4. Taugner R, Hackenthal E, Helmchen U. The intra renal renin-angiotensin system: an immunocytochemical study on the localization of renin, angiotensinogen, converting enzyme and the renin-angiotensin in the kidney of mouse and rat. Klin Wchr 1982;60:1216-1222.
5. Gámez RA, Lynch KR, Chevalier RL. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. Am J Physiol 1988;254:900-906.
6. Vallotton MB. The renin-angiotensin system. Trends Pharmacol Sci 1987;8:69-74.
7. Goldblatt H, Lynch J, Hazal RF, 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.
8. Page IH, y Helmer OMA. Crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. J. Exp. Med 1940;71:29-42.
9. Braun-Menéndez E, Fasciolo JC, Leloir LF y Muñoz JM. The substance causing renal Hypertension. J Physiol 1940; 98:283-298.
10. Peach MJ. renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. Physiol Rev 1977;57:313-370.
11. Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin- system. Am J Physiol 1988;255:F563-F573.
12. Keeton TK, Campbell. The pharmacological alteration of renin release. Pharmacol Rev 1980;32:181-227.
13. Pedraza-Chaverrí J., Ibarra-Rubio ME., Cruz C., Tapia E. Mensajeros intracelulares en la regulación de la secreción de renina. Rev Invest Clin 1989;41:165-176.
14. Moreno-Muñoz SI. Regulación intracelular de la secreción de

renina. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM. Mexico, DF, 1989.

15. Mitchel KD, Navar LG. The renin-angiotensin aldosterone system in volume control. *Bailliere's Clin Endocrinol Metabol* 1989;3:393-403.

16. Kageyama R, Okhubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 1984;23:3603-3609.

17. Okhubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNA from rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2196-2200.

18. Page IH, McSwain B, Knappam, Andras WA. The origin of renin activator. *Am J Physiol* 1941;135:214-222.

19. Nasjletti A, Masson GMC. Hepatic origin of renin substrate. *Can J Physiol Pharmacol* 1971;49:931-932.

20. Freeman RH, Rostorter HH. Hepatic changes in renin substrate biosynthesis and alkaline phosphatase activity in the rat. *Am J Physiol* 1972;223:364-370.

21. Weigand K, Weinze Hand, Falge C. Synthesis of angiotensinogen by isolated rat liver cells and its regulation in comparison to serum albumin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;75:102-110.

22. Horky K, Rojo- Ortega JM, Rodriguez J, Boucher R, Genest J. Renin substrate and angiotensin I-converting enzyme in the lymph of rat. *Am J Physiol* 1971;220:307-311.

23. Morris BJ, Jhonston CI. Renin substrate in granules from rat kidney cortex. *Biochem J* 1976;154:625-637.

24. Richoux JP, Cordonnier JL, Bouhnik J. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res* 1983;223:439-451.

25. Fried TA, Simpson EA. Intrarenal localization of angiotensinogen mRNA by RNA-DNA dot blot hybridization. 1986;250:374-377.

26. Ingelfinger J, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. Localization of the intrarenal renin angiotensin system (RAS) by in situ hybridization of renin and angiotensinogen mRNAs. *Kidney Int* 1988;33:269.

27. Skeegs LT, Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M. Experimental renal hypertension: the discovery of the renin angiotensin system. Ed: Soffer RL, ed. *Biochemical regulation of blood pressure*. N York: Wiley 1981:3-338.

28. Erdos EG: Angiotensin I converting enzyme. *Circ Res* 1975;36:247-255.
29. Ondetti MA, Cushman DW. Angiotensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological actions. 1984;4:381-411.
30. International Union of Biochemistry. Enzyme Nomenclature. N York:Academic Press 1978:606.
31. Erdos EG. The angiotensin I converting enzyme. *Federation Proceeding* 1977;36:1760-1765.
32. Ryan US, Ryan JW. Angiotensin converting enzyme: II pulmonary endothelial cells in culture. *Environ Health Persp* 1980;35B:171-180.
33. Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 1976;191:1050.
34. Rusivall L, Navar LG. Effects on renal hemodynamics on intra arterial infusions of angiotensins I and II. *Am J Physiol* 1983;245:181-187.
35. Laliberte F, Laliberte MI, Alhenc-Gelas F, Chevillard C. Angiotensin converting enzyme (ACE) in iris vessels: An ultrastructural study. *Exp Eye Res* 1989;49:153-157.
36. Strittmatter SM, Thiele AE, Kapiuloff S, Mand Snyder SH. A rat brain isozyme of angiotensin enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates. *J Biol Chem* 1985;260:9825-9832.
37. Smallridge CR, Gamblin TG, Charles E. Angiotensin converting enzyme: characteristics in human skin fibroblast metabolism. *J Cell Physiol* 1986;35:899-904.
38. Schulz WW, Hagler HK, Boja LM y Erdos EG Ultrastructural localization of angiotensin I converting enzyme (E.C. 3.4.15.1.) and neutral metalloproteinase (E.C. 3.4.24.11.) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest* 1988;59:789-797.
39. Loyke HF. Converting enzyme in rat serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970;131:248-251.
40. Van Sande ME, Sharpe SL, Neels HM, Van Camp KD. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. *Clin Chim Acta* 1985;147:261-265.
41. Ehlers MRW, Riordan JF. Angiotensin converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989;28:5311-5317.
42. Soffer RL, Berg T, Sulner J, Li CY. Pulmonary and testicular angiotensin-converting isoenzyme. *Clin Exp Hypertens A*

1987;9:229-234.

43. Kumar RS, Kusary J, Samar NR, Soffer RL, Sen GC. Structure of testicular angiotensin converting enzyme: a segmental mosaic isozyme. *J Biol Chem* 1989;264:16754-16758.

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

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

46. Ibarra-Rubio ME. Estudio comparativo de la actividad 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 México, D. F. 1986.

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

48. Ondetti MA, Cushman DW. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological actions. 1984 16,4:381-411.

49. Sweet CS, Gross DM, Arbogast TPL. Antihypertensive activity of N-[(S)-lethoxycarbonyl]-3 phenylpropyl-L Ala-L-Pro (MK421), and orally active converting enzyme inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;216:558-566.

50. Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Vancow VJ, Reichstein T. Isolierung eines neuen kristallisierten Hormones ausnebennies mitbesonder hoerwirksamkeit and den minerals toff wechsel. *Experientia* 1953;9:333.

51. Melby JC. Intermediary metabolism of aldosterone. In: page H, Bumpus FN (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag 1973;37:298.

52. Jubiz W. *Endocrinología Clínica*. Editorial El Manual Moderno. S. A. de C. V. 1986, p 456.

53. Morris DJ. Metabolism and mechanism of action of aldosterone. *Endocrine Rev* 1981;2:234-247.

54. Liddle GW. The adrenals. En: *Textbook of Endocrinology*. Williams RH. Philadelphia:Saunders. 1981; p 249.

55. Budavon S, Manadele Jo, Heckelman EP. *Merck Index*. Merck Co, Inc. 1989, p 822.

56. Guild WR, Young JV, Merrill JP. Anuria due to carbon tetrachloride intoxication. *Ann Int Med* 1958;48:1221-1227.
57. Kim HJ, Bruckner JU, Dallas CE, Gallo JM. Effect of dosing vehicles on the pharmacokinetics of orally administered carbon tetrachloride in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;102:50-60.
58. Schreiner GE, Maher JF. Toxic nephropathy. *Am J Med* 1965;38:409-449.
59. Striker GE, Smuckler EA, Kohnen Pw, Nagle RB. Structural and functional changes in rat kidney during CCl₄ intoxication. *Am J Pathol* 1968;53:769-789.
60. Slater TF. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat, a speculative mechanism based on activation. *Nature* 1966;209:36-40.
61. Rao KS, Recknagel RO. Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exp Mol Pathol* 1968;9:271-278.
62. Recknagel RO. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci* 1983;33:401-408.
63. Mourelle M, Meza MA. CCl₄-induced lipoperoxidation triggers a lethal defect in the liver plasma membranes. *J Appl Toxicol* 1990;10:23-27.
64. Viggo KN, Jens L. Acute renal failure due to carbon tetrachloride poisoning. *Acta Med Scand* 1965;178:363-374.
65. Myatt Av, Salmons JA. Carbon tetrachloride poisoning. *Arch Industr Hyg* 1952; 6: 741.
66. Morris PAF, Gedney WB, Barth W, Hepenstall RH. Acute tubular necrosis; report of a case with failure to recover after sixty seven days of oliguria. *Ann Int Med* 1962;56:925.
67. Smetana H. Nephrosis due to carbon tetrachloride. *Arch Int Med* 1939;63:760-777.
68. Loyke FH, Claveland MD. Reduction of hypertension after liver disease. *Arch Int Med* 1962;110:83-87.
69. Stewart DR, Boettner AE, Soutworth RR, Cerney CJ. Acute carbon tetrachloride intoxication. *J Am Med Assoc* 1963;183:994-997.
70. Goodman GA, Goodman SI, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Sexta edición. México D. F.: Panamericana 1981;p 1756.
71. Sirota JH. Carbon tetrachloride poisoning in man. I. The mechanisms of renal failure and recovery. *J Clin Invest*

1949;28:1412-1422

72. Sayed FH, Elmekatti N. Acute carbon tetrachloride poisoning. *Intensive Care Med* 1981;7:203-204.

73. Ruprah M, Mant TGK, Flanagan RJ. Acute carbon tetrachloride poisoning in 19 patients: implications for diagnosis and treatment. *Lancet* 1985;1:1027-1029.

74. McLean AE, McLead EK. The effect of diet and 1,1,1-trichloro 2,2-bis-(p-chlorophenyl) ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on the sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *J Biochem* 1966;100:564-571.

75. Garber RC, McLean AE. Increased susceptibility to carbon tetrachloride poisoning in the rat liver after pretreatment with oral phenobarbitone. *Biochem Pharmacol* 1969;18:645

76. Nagel-Ostaszewski I, Lev-Cam AC. Protection by panthethoine, pantothenic acid and cystamine against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990;67:289-292.

77. Hove EL. Interrelation between alpha-tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CCl₄ poisoning in rats. *Arch Biochem Biophys* 1948;17:463-473.

78. Jennings RB, Kearns WM. Necrotizing nephrosis in the rat following administration of carbon tetrachloride. *AMA Arch Pathol* 1953;56:348-359.

79. Elias AN, Vaziri ND, Domurat ES, Pandian MR, Ansari MA, Yazdani M. Atrial natriuretic peptide, arginine vasopressin, aldosterone and plasma renin activity in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;252:438-441.

80. Pappas NJ. Increased rat liver homogenate, mitochondrial, and cytosolic aspartate aminotransferase activity in acute carbon tetrachloride poisoning. *Clin Chim Acta* 1980;106:223-229.

81. Pappas NJ. Response of rat liver aspartate aminotransferase to carbon tetrachloride. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1981;31:475-482.

82. Pappas NJ. Source of increased serum aspartate and alanine aminotransferase: cycloheximide effect on carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Clin Chim Acta* 1986;154:181-190.

83. Ideo A, Del Ninno E, De Franchis R. Behaviour of some enzymes and isoenzymes in plasma liver and bile of rats treated with carbon tetrachloride. *Enzyme* 1971;12:242-254.

84. Gabrieli AE, Drifanos A. Effect of carbon tetrachloride on serum glutamic-oxalacetic transaminase isoenzymes. *Proc Soc Exp*

B5. Elias AN, Vaziri NA, Pandian MR, Domurat E, Ansari MA, Yazdani M. Atrial-natriuretic peptide, arginine vasopressin, and the renin-angiotensin system in carbon tetrachloride-induced hepatitis in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988;60:401-405.

B6. Villamediana LM, García-Villalón AC, Caramelo C, López-Novoa E. Effect of dietary sodium intake on the pressor reactivity to angiotensin II in rats with experimental cirrhosis of the liver. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67:1506-1511.

B7. Hollinger MA. Biochemical evidence for pulmonary endothelial cell injury after carbon tetrachloride administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;222:641-644.

B8. Ahmad FF, Cowan DL, Sun AY. Detection of free radical formation in various tissues after acute carbontetrachloride administration in gerbils. *Life Sci* 1987;41:2469-2475.

B9. Pedraza-Chaverri J, Zúñiga-Estrada A, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Producción de anticuerpos policlonales para la cuantificación del decapeptido angiotensina I por radioinmunoanálisis. *Rev Invest Clin* 1988;40:363-377.

90. Zúñiga-Estrada E. Producción de reactivos para la determinación de angiotensina I por radioinmunoanálisis. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 1987.

91. Panduro A, Shalaby F, Weiner FR, Bieмпiecka L, Zern MA, Shafritz DA. Transcriptional switch from albumin to alpha-fetoprotein and changes in transcription of other genes during carbon tetrachloride induced liver regeneration. *Biochemistry* 1986;25:1414-1420.

92. Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:267-275.

93. Pedraza-Chaverri J, Alatorre-González MC, Ibarra-Rubio ME, Peña JC, García-Sáinz JA. Effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. *Life Sci* 1984;35:1683-1689.

94. Pedraza-Chaverri J, Ibarra-Rubio ME, Alatorre-González MC, Peña JC, García-Sáinz JA. Pertussis toxin potentiates anesthesia-induced renin secretion. *Eur J Pharmacol* 1985;112:115-117.

95. Pedraza-Chaverri J, Sánchez MCC, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Niveles de angiotensina II en ratas sometidas a estímulos del sistema renina-angiotensina. *Rev Invest Clin* 1988;40:253-258.

96. 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;42:210-216.

97. 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;42:120-126.

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

99. 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, en prensa.

100. Arévalo-Vazquez AE. Enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4.15.1) en ratas con síndrome nefrótico experimental. Tesis de Licenciatura, facultad de ciencias. UNAM 1990.

101. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980;47:11-9.

102. Hatch GE, Santrock, Slade R, Hayes JM. Detection of CCl₄-induced oxidation of hepatic tissue in vivo by oxygen-18 tracing. *Toxicol Appl* 1988;93:81-88.

103. Zimmerman WS, Norback HD. Carbon tetrachloride nephrotoxicity in rats with reduced renal mass. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107:264-269.

104. 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;42:29-38.

105. Webell L. Aspects on tubular proteinuria. *Upsala Med. Sci* 1985;90:5-14.

106. Soffer RL. Angiotensin converting enzyme. En: Soffer RL, ed. *Biochemical regulation of blood pressure*. N York:Wiley 1981:123-164.

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

108. Lieberman J, Stresastre A. Serum angiotensin converting

enzyme: elevation in diabetes mellitus. Ann Int Med 1980;93:825-826.

109. Matsuki K, Sakata T. Angiotensin converting enzyme in diseases of liver. Am J Med 1982;69:408-410.

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

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

112. Pitoti A, Mourech V, Nonaghini M, Vianellos S. HPLC method for evaluation of urinary angiotensin enzyme: some example of normales subjects and patients with renal transplantation. J Pharm Biomed Anal 1986;5:677-683.

113. Hall ER, Kato J, Erdos EG, Robinson CJG, Oshima G. Life Sci 1976;18:1299-1304.