

03466

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EXCRECION URINARIA DE ENZIMA
CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I EN
LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA
EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. SILVIA IVETTE MORENO MUÑIZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN MÉXICO, D. F.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA), forma parte del sistema renina angiotensina aldosterona donde cataliza la conversión del decapeptido angiotensina I (AI), al octapeptido vasoconstrictor angiotensina II (AII).

La ECA es una glicoproteína que se encuentra presente en casi todos los tejidos y fluidos corporales. En el riñón está en el borde en cepillo de las células del túbulo proximal. Como su peso molecular es alto, la actividad de la ECA en orina probablemente derive sólo de células tubulares, sugiriendo que la determinación de ECA urinaria puede ser útil como marcador de daño tubular. En algunos estudios en humanos con diversas patologías que cursan con daño del túbulo proximal se ha encontrado aumento de la ECA urinaria lo que sugiere que éste puede ser un marcador de daño del túbulo proximal.

El objetivo del presente trabajo fué el de conocer si en ratas con daño del túbulo proximal aumenta la excreción urinaria de la ECA, por lo tanto se midió la actividad de la ECA urinaria, en dos modelos de insuficiencia renal aguda experimental (IRA): el inducido con cloruro de mercurio (1.5 mg/Kg) y el inducido dicromato de potasio (15 mg/Kg). Además se midió la actividad sérica y renal de la ECA y las proteínas totales en estos mismos modelos.

Se realizaron dos estudios secuenciales para seguir la evolución de la lesión con las nefrotoxinas antes mencionadas. Después de la inyección de cloruro de mercurio, las ratas se sacrificaron por decapitación a las 4, 8, 16, 24, 48 horas (h) y 3, 5, 7, 9, 15, 22 y 28 días (n=2 en cada tiempo). La orina y la sangre se recolectaron y además, se tomaron secciones de riñón para hacer estudios de microscopía de luz. Para el estudio secuencial con dicromato de potasio, las ratas se sacrificaron los días 1, 3, 5, 7 y 9 (n=2 en cada tiempo); y se tomaron muestras de orina y sangre. Tanto en suero y orina, se determinaron: la actividad de ECA, proteínas totales, sodio y creatinina; y en suero se determinó urea.

La IRA se evaluó con las siguientes determinaciones: depuración de creatinina: (creatinina en orina/creatinina en suero) x flujo urinario; índice de insuficiencia renal: (Na urinaria [creatinina urinaria/creatinina sérica], relación de creatinina urinaria/creatinina sérica y creatinina y urea en suero.

Los resultados de los estudios secuenciales mostraron daño funcional y estructural a las 24 h de la administración de las nefrotoxinas, el cual se caracterizó por proteinuria, pérdida de la integridad celular en el túbulo proximal e incremento de la actividad de la ECA en orina. Estos cambios se presentaron con un máximo a los 3 días y regresaron a valores basales a partir de la administración de la toxina a los 5 días.

En el estudio morfológico celular, se observó daño estructural desde las 16 h. A los 3 días de evolución se inició la actividad regenerativa tubular que fué más evidente a los 5 días, ya que, se observó la mayor parte de los túbulos revestidos por un

epitelio cuboide

Posteriormente se realizaron 2 estudios, uno a las 24 horas (h) (n=10 cada modelo) y otro a las 48 h (n=10 por cada modelo y para cada tiempo) de la inyección. Las ratas se sacrificaron también por decapitación, y se obtuvieron muestras de orina, sangre y riñón, para realizar las determinaciones antes mencionadas en el estudio secuencial. Se adicionaron estudios de microscopía electrónica y en riñón se determinaron la actividad de la ECA y las proteínas totales. Además la integridad del borde en cepillo se evaluó con las actividades de la Dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV) y N-acetil- β -Glucosaminidasa (NAG) que son indicadores de daño celular. La proteinuria se analizó con electroforesis, comprobando su origen tubular, ya que se registró un incremento en las proteínas de un peso molecular menor al de albúmina.

Estas ratas desarrollaron IRA evidenciada por el aumento en el índice de insuficiencia renal y en la urea y creatinina sérica, una disminución en la depuración de creatinina y en la relación creatinina urinaria/creatinina sérica. Además los datos histológicos mostraron pérdida de la integridad celular en el túbulo proximal renal, en los grupos tratados con las nefrotoxinas, no se observó daño a nivel glomerular.

La excreción urinaria de ECA, aumentó en las ratas tratadas con las nefrotoxinas, además, también se observó una disminución de la ECA en riñón, lo que sugiere que la disminución del contenido de la ECA en este tejido, puede contribuir a elevar la ECA urinaria en ratas con insuficiencia renal aguda. La excreción urinaria de DAP IV Y NAG se incrementó significativamente indicando daño en el borde en cepillo del túbulo proximal.

En conclusión, estos estudios apoyan la hipótesis de que la ECA urinaria aumenta durante el daño tubular renal agudo y sugieren que esta enzima puede ser un marcador de daño tubular.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Sistema renina angiotensina.....	1
1.2. Enzima convertidora de angiotensina.....	1
1.2.1. Bioquímica.....	3
A. Clasificación.....	3
B. Propiedades fisicoquímicas.....	3
C. Peso molecular y estructura.....	3
D. Composición de aminoácidos.....	4
E. Contenido de carbohidratos.....	4
F. Residuos del sitio activo.....	4
G. Propiedades catalíticas.....	4
a. Especificidad de sustratos.....	4
b. Inhibidores.....	6
c. Inhibidores endógenos.....	7
d. Activación por aniones.....	7
1.2.2. Distribución regulación y papel biológico de la ECA.....	7
A. ECA endotelial.....	8
B. ECA epitelial.....	8
a. Riñón.....	8
b. Intestino.....	8
c. Plexo coraideo.....	9
d. Próstata y epidídimo.....	9
e. Placenta.....	9
C. ECA neuroepitelial.....	9
D. ECA endócrina.....	9
a. Gónadas.....	9
b. Adrenal.....	10
E. ECA sérica.....	10
1.3. Insuficiencia renal aguda.....	10
1.3.1. Obstructiva.....	11
1.3.2. Prerrenal.....	11
1.3.3. Intrarrenal.....	11
A. Estructura subcelular.....	11
a. Membrana plasmática.....	11
b. Mitochondria.....	12
c. Lisosoma.....	12
d. Retículo endoplásmico.....	12
B. Principales mecanismos bioquímicos mediadores del daño celular.....	13
a. Fosfolipasas.....	13
b. Otros procesos degradativos enzimáticos.....	13
c. Producción de radicales libres y Lipoperoxidación.....	13
d. Calcio.....	13

II. ANTECEDENTES.....	14
III. HIPOTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS.....	19
V. MATERIALES Y METODOS.....	20
V.1. Reactivos.....	20
V.2. Diseño experimental.....	20
V.3. Técnicas analíticas.....	21
V.4. Estudios morfológicos y evaluación del daño histológico.....	27
V.5. Análisis estadístico.....	27
VI. RESULTADOS.....	28
VI.1. Estudio secuencial mercurio.....	28
VI.2. Estudio secuencial dicromato.....	33
VI.3. Estudio de 24 y 48 horas.....	38
VI.4. Estudio de microscopía de luz: mercurio y dicromato.....	47
VI.5. Microscopía electrónica del túbulo contorneado proximal en el modelo de dicromato a 48 h.....	54
VI.6. Microscopía electrónica en el túbulo contorneado proximal en el modelo de mercurio a 48 h.....	54
VI.7. Microscopía electrónica en el túbulo contorneado proximal en el modelo control a 48 h.....	54
VI.8. Evaluación del daño histológico.....	58
VI.9. Electroforesis de proteínas urinarias.....	58
VII. DISCUSION.....	61
VIII. CONCLUSIONES.....	65
IX. BIBLIOGRAFIA.....	66

ABREVIATURAS.

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATA	Acido tricloroacético
ASB	Albúmina sérica bovina
APM	Alto peso molecular
AAP	Alanina aminopeptidasa
ANDEVA	Análisis de varianza de una vía
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
ALP	Fosfatasa alcalina
ACP	Fosfatasa ácida
BPM	Bajo peso molecular
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CI	Curies
d	Daltones
DAP IV	Dipeptidil aminopeptidasa IV
dpm	Desintegraciones por minuto
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EDTA	Etilendinitrilotetracetato
g	Gramo
GAL	β -galactosidasa
GGT	Gamma-glutamilttransferasa
GRS	β -Glucoronidasa

h	Horas
HGG	Hipurato de glicil glicina
HHL	Hipurato de histidil leucina
IIR	Índice de insuficiencia renal
IRA	Insuficiencia renal aguda
Kb	Kilobases
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Molar
ME	Microscopia electrónica
mg	Miligramo
min	Minuto
mM	Milimoles
ml	Mililitro
mU	Miliunidades
μ l	Micro litro
nmol	Nanomoles
NAG	N-acetil- β -glucosaminidasa
O/S	Creatinina urinaria/Creatinina sérica
PM	Peso molecular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN	Síndrome nefrótico
SRA	Sistema renina angiotensina

I. INTRODUCCION

I.1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

El sistema renina angiotensina (SRA), es un sistema enzimático hormonal que controla el balance de electrolitos, el volumen y la presión arterial (1) (figura 1). En éste intervienen diferentes moléculas: las enzimas: renina, convertidora de angiotensina I (ECA), y angiotensinasas; los péptidos: angiotensinas (AI, AII, AIII); la globulina alfa 2 (angiotensinógeno) y la hormona esteroide aldosterona.

El SRA funciona de la siguiente manera: la renina libera el decapeptido angiotensina I (AI) contenido en el extremo amino de su sustrato, la glicoproteína angiotensinógeno cuyo principal sitio de síntesis es el hígado. La AI tiene poca o nula actividad biológica, pero cuando pasa a través de la circulación pulmonar es convertida por la ECA al octapéptido angiotensina II (AII) (2) el cual tiene las siguientes acciones fisiológicas: 1) es un potente vasoconstrictor, 2) estimula la liberación de la hormona aldosterona, 3) actúa directamente en el cerebro para: a) incrementar la presión sanguínea mediante el sistema nervioso parasimpático, b) estimula la sed, y c) estimula la secreción de vasopresina y de la hormona adrenocorticotrópica, 4) inhibe la secreción de renina, 5) estimula la secreción de angiotensinógeno, 6) aumenta la secreción de catecolaminas de las glándulas suprarrenales y facilita la transmisión adrenérgica (3). La acción enzimática de la aminopeptidasa A libera el ácido aspártico (Asp), produciendo el heptapéptido angiotensina III (AIII) que es menos potente que la AII para estimular la biosíntesis de aldosterona y posee sólo una quinta parte de su potencia vasopresora. Por lo tanto, el SRA es vasoconstrictor y antinatriurético (levita la pérdida de sodio a través de la orina), y en condiciones normales actúa con sistemas vasodilatadores para mantener la presión arterial constante a pesar de los cambios en el consumo de sodio y en la actividad física del sujeto.

I.2. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

I.

Skeggs y cols. (4) demostraron la existencia de dos formas de angiotensina (AI y AII) y descubrieron una enzima en plasma equino capaz de convertir AI en AII, a la que posteriormente se le llamó *Enzima Convertidora de Angiotensina I* (4-9). Estos estudios establecieron la importancia de la ECA en la generación de AII, el efector final del SRA.

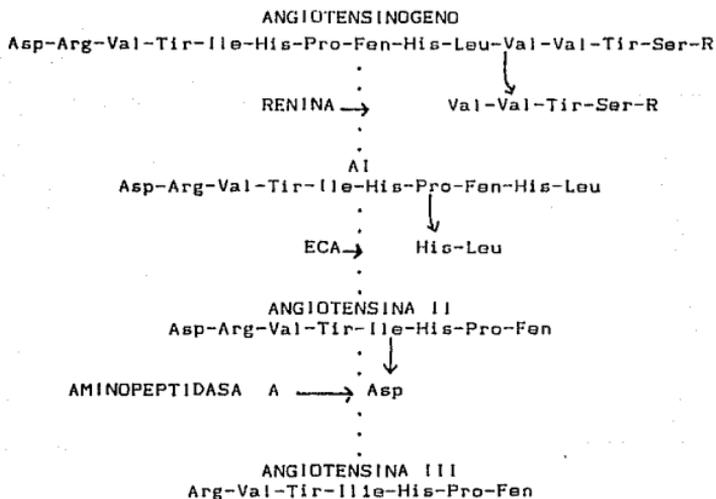


FIGURA 1. COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

1.2.1. BIOQUIMICA

A. CLASIFICACION. Según la "Enzyme Commission" la ECA tiene el siguiente número: E. C. 3.4.15.1. Pertenece al grupo de las hidrolasas, ya que cataliza la ruptura hidrolítica de un enlace, "3"; es una péptido hidrolasa pues actúa sobre un enlace peptídico, "4"; libera un péptido de un polipéptido, por lo cual se le clasifica como una peptidil-dipéptido-hidrolasa "15", y debido que corta el extremo C-terminal de sus sustratos se le considera una dipeptidil carboxipeptidasa; y su número progresivo es el "1" (10).

B. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS. La ECA es una glicoproteína ácida que contiene una sola cadena polipeptídica y un equivalente molar de zinc (11) en su sitio activo que es esencial para su actividad (12) pero no es necesario para mantener la estabilidad estructural (13) y tampoco desempeña un papel importante en la unión del sustrato (14). A diferencia de otras metaloenzimas, en la ECA el zinc está unido débilmente, disociándose fácilmente a pH menor de 7 (14, 15).

C. PESO MOLECULAR Y ESTRUCTURA. La determinación del peso molecular (PM) de la ECA es complicada por su alto contenido en carbohidratos, su tendencia a agregarse y su gran tamaño, el PM varía dependiendo del tipo de tejido y del método de determinación, cuando se utiliza filtración en gel (16) el valor se encuentra entre 140,000 y 180,000 d para la ECA de pulmón de conejo y la ECA de riñón de cerdo respectivamente, con métodos de centrifugación las estimaciones varían de 129,000 a 199,000 d, con técnicas electroforéticas los valores varían dependiendo de la concentración de acrilamida (11, 17, 18).

En testículo la enzima es aproximadamente 30% más pequeña que la pulmonar, su peso varía entre 100,000 y 90,000 d (19, 20).

Recientemente, se ha obtenido la información sobre la secuencia de aminoácidos de la ECA en humano mediante la clonación de ADNc (21-27), en conejo (28, 29) y en ratón (22, 30, 31). Se han encontrado dos formas estructurales de la ECA, una de ellas se presenta en las células endoteliales y posee un peso de 170,000 d. Una forma más pequeña se presenta en células germinales de testículo y tiene un peso de 90,000 d. Así mismo, esta técnica de clonación de ADNc ha permitido establecer que estas dos formas de la enzima (endotelial y testicular) son codificadas por dos formas de ARNm que difieren en longitud, 3.0 y 4.3 kilobases (kb) respectivamente. Mediante la técnica de "Southern blot" se ha confirmado que un solo gen codifica para ambos ARNm (21, 22, 25-28, 31). En humano el gen de ECA tiene 21 kilobases y comprende 26 exones separados por 25 intrones, observándose que el ARNm de 4.3

kb de longitud es transcrito del exón 1 al exón 26, con excepción del exón 13, y el ARNm de 3.0 kb es transcrito del exón 13 al 26, es decir que la ECA endotelial es codificada por 26 exones mientras que la ECA testicular solamente está codificada por 14 exones. Los exones 14 al 26 se presentan tanto en el ARNm que codifica para la enzima endotelial como en el ARNm de la enzima testicular, y el último de ellos codifica para un segmento de 17 aminoácidos que es el que se ancla a la membrana plasmática (21, 23, 25, 26, 27) (figura 2).

La determinación de la secuencia completa de aminoácidos ha esclarecido que la ECA endotelial está constituida por 1,307 residuos (27) y, mediante análisis de hidropatía, se ha encontrado que posee 2 segmentos hidrofóbicos, uno localizado en el extremo amino y el segundo cerca del extremo carboxilo (23, 26, 27) probablemente el segmento localizado en el extremo amino sea el péptido señal, dado que en la secuenciación del extremo amino de la proteína madura (constituida por 1,277 aminoácidos) no se identifica este segmento (25, 26, 27). Por otro lado, la ECA testicular está constituida por 732 aminoácidos, los primeros 87 incluyen posiblemente al péptido señal y los últimos 657 residuos son idénticos, a los del extremo carboxilo de la ECA endotelial.

D. COMPOSICION DE AMINOACIDOS. La enzima tiene un alto porcentaje de residuos ácidos (21-22%), contribuyendo en parte a su bajo punto isoeléctrico que se encuentra entre 4.3 y 5.2. La fracción de residuos hidrofóbicos es de 44% (18) sugiriendo un grado moderadamente alto de hidrofobicidad.

E. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS. Consisten de fucosa, manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, los cuales varían dependiendo de la especie y del tejido que se trate, entre un 26-30% (18), para la ECA de conejo, la ECA del riñón de humano contiene de 24-26% de carbohidratos (32), en conejo la enzima testicular contiene un 20% (20).

F. RESIDUOS DEL SITIO ACTIVO. En la ECA pulmonar de conejo, reacciones de modificación química han establecido la existencia, de cuatro residuos funcionales en o cerca del sitio activo: tirosil, arginil, glutamil y lisil (33). La tirosina también se ha implicado como un residuo funcional en el sitio activo de la ECA plasmática de equino (34); similarmente se ha identificado al glutamato como un residuo de sitio activo de la ECA pulmonar en bovino (35).

G. PROPIEDADES CATALITICAS. a. Especificidad de Sustratos. La ECA es un tipo de exopeptidasa que a) corta secuencialmente dipéptidos del extremo carboxilo terminal de sustratos peptídicos y b) desarrolla su actividad sobre un amplio rango de sustratos (11, 36-40).

Aunque la enzima es, en algunos aspectos, más bien no específica, trabajos realizados en los 70's (41-43) parecen

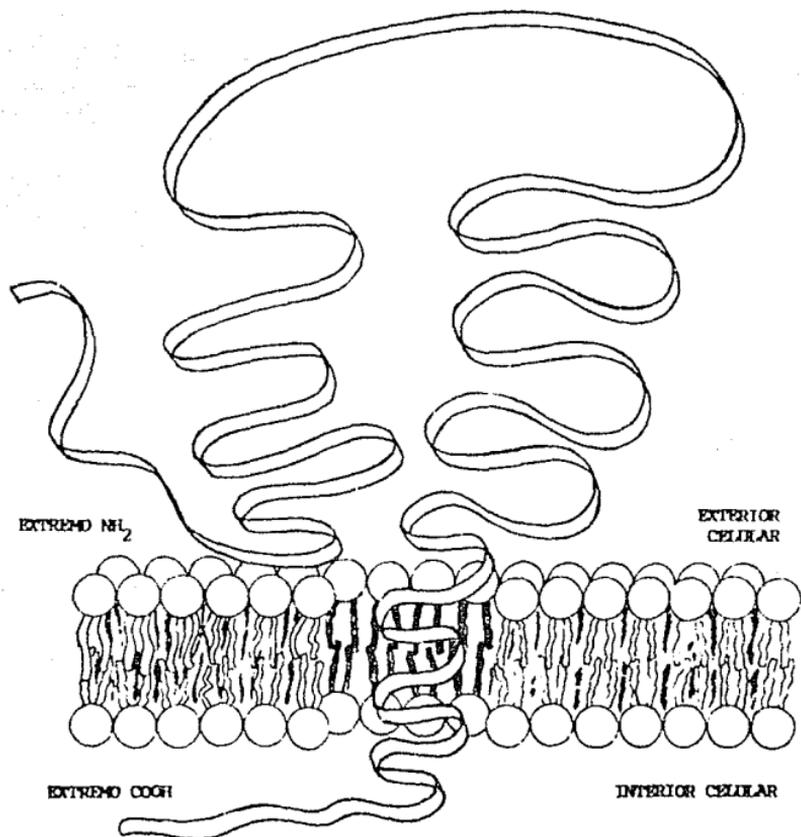


FIGURA 2. LOCALIZACION DE LA ECA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

indicar ciertos requerimientos para que el sustrato sea hidrolizado: i) un carboxilo terminal libre, ii) ausencia de un ácido dicarboxílico en el extremo carboxilo, y iii) ausencia de un penúltimo residuo de prolina (incapacidad para cortar uniones imida). La amplia actividad hidrolítica de esta peptidasa se demuestra en reportes donde se usa la ECA como herramienta en el análisis de secuencias C-terminal de polipéptidos (44, 45). Se ha demostrado que puede hidrolizar neuropeptidos amidados, como la sustancia P (46-49) y la sustancia K (49), algunos análogos de la colecistocinina y la gastrina (50), la luliberina (enzima liberadora de la hormona luteinizante), y a otras encefalinas amidadas (50). Además de otros sustratos con importancia biológica potencial, como por ejemplo, la neurotensina (51, 52).

Sin embargo, en tanto que existe la actividad a través de un amplio rango de sustratos, in vitro bajo condiciones no fisiológicas de altas concentraciones de sustrato y/o cloruro, no debe de confundirse con la verdadera especificidad de sustrato in vivo, la cual bajo condiciones fisiológicas, es mediada por una compleja combinación de afinidades al sustrato, dependencia de iones cloruro, velocidad hidrolítica y la concentración de sustratos biológicamente relevantes.

Para medir la actividad de la ECA, se han fabricado numerosos sustratos sintéticos tales como hipurato de histidil leucina (HHL) e hipurato de glicil glicina (HGG) (52).

b. Inhibidores. Inhibidores exógenos. Ya que la ECA es una metaloenzima, es inhibida por agentes quelantes (atrapadores de iones metálicos) tales como etilendinitrietacetato (EDTA), y o-fenantrolina (53). En los 60's (54), se descubrió que los venenos de algunas víboras no sólo son capaces de producir bradicinina, sino que además contienen factores que intensifican la respuesta a la misma. Estos elementos potenciadores son una familia de péptidos de 5 a 13 residuos de aminoácidos que inhiben la actividad de la ECA (llamada también cininasa II debido a que esta enzima inactiva a la bradicinina, una sustancia vasodilatadora). De estos inhibidores, el más estudiado es el nonapéptido teprotido (FPB9A), el cual actúa como un inhibidor competitivo de la ECA y cuya afinidad por ésta es mayor que la de All.

Los inhibidores de la ECA tienen los siguientes efectos: disminución del nivel de All, aumento en la concentración plasmática de All, aumento de la actividad plasmática de renina. Existen cientos de inhibidores sintéticos (como por ejemplo el captopril) que han sido aplicados en pacientes (55, 56) y no menos de 15 compuestos han tenido desarrollo comercial para usarse como agentes antihipertensivos. Los agentes inhibidores de la ECA se diseñaron para disociar la generación de All y la actividad de renina, es decir, bloquean la conversión de All a All. Otro efecto importante de estos inhibidores es la depresión de la secreción de

aldosterona.

c. Inhibidores endógenos. Existen compuestos presentes en la sangre y en los tejidos propios de cada organismo que funcionan como inhibidores endógenos. Hay una amplia variedad de estos compuestos presentes en la sangre como es el caso de los dipéptidos histidil-leucina y fenil-arginina, formados de la activación de bradicinina, respectivamente, que pueden prevenir la conversión de A1 y la hidrólisis de cininas (57).

La ECA también se inhibe por fragmentos peptídicos de la A11 (58), por el tripéptido glutatión (59), por la albúmina sérica bovina (60) y por la cadena B de la insulina (61).

d. Activación por aniones y pH. La propiedad más interesante y peculiar de la ECA es la dependencia de su mecanismo catalítico de la activación por aniones, lo cual fue notado por sus descubridores originales (4). En este caso depende de la concentración de iones cloruro, y el pH. De acuerdo a esto, los sustratos se han clasificado en 3:

i) Los sustratos de la clase I, cuyo extremo carboxilo o penúltimo residuo no está cargado positivamente (59), a pH 7.5 parecen ser hidrolizados por un mecanismo ordenado de doble reacción en el cual el anión debe unirse antes que el sustrato formando un complejo enzima-anión que luego se une al sustrato para efectuar la hidrólisis (14, 62, 63).

ii) Los sustratos de la clase II, cuyo extremo carboxilo o penúltimo residuo está cargado positivamente, tiene valores de K_a más bajos (4 mM) y todos son hidrolizados por un mecanismo activador no esencial.

iii) A la clase III pertenecen los sustratos cuya K_a se sitúa alrededor de 25 mM y su mecanismo de activación es igual a la de los sustratos de la clase II.

1.2.2. DISTRIBUCION, REGULACION Y PAPEL BIOLÓGICO DE LA ECA.

La ECA está virtualmente presente en casi todos los órganos y fluidos corporales de los mamíferos (11). Se ha encontrado que la ECA se encuentra en tres tipos de células: endoteliales, epiteliales y neuroepiteliales (27, 64), y evidencias recientes sugieren un cuarto tipo, endócrino. Es una peptidasa transmembranal, con un ancla peptídica hidrofóbica insertada dentro de la bicapa lipídica de la membrana plasmática.

ECA ENDOTELIAL.

Está presente en las capas vasculares de casi todos los órganos, donde se encuentra unida a la membrana plasmática de células endoteliales (65-67), esta forma de ECA es probablemente más abundante en capas vasculares de pulmón. Esta localización permite que la enzima esté yuxtapuesta a la circulación y así tenga un acceso efectivo a la AI y la bradisinina.

ECA EPITELIAL.

La ECA epitelial está presente en grandes cantidades en riñón, intestino, plexo corioideo, próstata, y epidídimo, donde está asociada con una superficie enorme y está en contacto con un efluente, así está idealmente localizada para actuar sobre sustratos en flujo (68).

a. RINON.

En humanos, se encuentran, niveles de ECA en riñón (69), donde se ha localizado en el borde en cepillo de las células del túbulo proximal (66, 68, 70), células endoteliales glomerulares (70), y células yuxtglomerulares (71). En rata también se ha reportado que ésta enzima tiene actividades en riñón, en el borde en cepillo principalmente (72).

La ECA renal puede tener una función en la reabsorción por la liberación de dipéptidos de los oligopéptidos filtrados y transportándolos hacia el citoplasma (68). Alternativamente la ECA puede jugar un papel regulatorio local, generando AII intrarrenal, la cual puede estar involucrada en la reabsorción de sodio y fluidos (73, 74), y/o vasoconstricción de los vasos aferentes y eferentes glomerulares, por lo tanto regula la velocidad de filtración glomerular (71).

b. INTESTINO.

Se encuentran niveles altos de ECA en el intestino delgado de humanos (69), y en este órgano la enzima se ha localizado en las microvellosidades (67, 68, 75). La ECA intestinal puede servir como enzima digestiva, liberando dipéptidos C-terminales de una variedad de sustratos (75); puede también estar involucrada en el transporte de dipéptidos en células de la mucosa (68). También puede actuar sobre AI, ya que se ha reportado que la AII incrementa la absorción de sodio y fluidos en sacos intestinales aislados (76).

c. PLEXO COROIDEO.

El plexo coroideo es particularmente rico en ECA (77), la cual está concentrada sobre la membrana apical de células epiteliales y está unida a la membrana luminal de las microvellosidades, las cuales están bañadas por fluido ventricular (78, 68, 79). Existe evidencia de que el SRA está normalmente presente en los ventrículos cerebrales, donde la AII puede ejercer efectos hipertensivos y dipsogénicos en los órganos circumventriculares.

d. PROSTATA Y EPIDIDIMO.

La próstata humana contiene altos niveles de actividad de ECA, la cual se incrementa en la hipertrofia prostática benigna (80), donde se ha localizado en el epitelio tubular y en el lumen, sugiriendo que las células epiteliales de próstata humana secretan ECA hacia el ducto prostático (81). Similarmente en el epidídimo se han encontrado altos niveles de ECA (72), donde se localiza en la superficie luminal de las células epiteliales y es probablemente también liberada hacia el lumen (82). La función de la enzima en el tracto genital masculino se desconoce.

e. PLACENTA.

Las microvellosidades del sincitiotrofoblasto placentar contienen ECA (68, 83). Presumiblemente, la enzima regula el paso de AI y otros péptidos en la interfase materno-fetal (83).

C. ECA NEURDEPITELIAL.

La enzima se encuentra en regiones restringidas en el cerebro, en el plexo coroideo y órgano subfornical (78, 87, 68, 84), con niveles intermedios en la pituitaria, sustancia nigra (68, 78, 84, 85), y los niveles bajos en el hipotálamo (68, 78, 84).

La ECA en el órgano subfornical está probablemente involucrada en la producción local de AII (84), ya que los receptores para AII están concentrados en esta región (86). Similarmente el núcleo magnocelular en el hipotálamo también contiene receptores para AII (86), y AII estimula la liberación de vasopresina por éstas células (87). En la pituitaria anterior la ECA está asociada con células endoteliales y puede estar involucrada en la producción de AII en la adenohipófisis a partir de AI en la circulación portal (84); la AII libera prolactina (88-90).

D. ECA ENDOCRINA.

a. GONADAS.

La enzima testicular ha sido localizada en las gotas citoplásmicas del espermatozoide (91, 92). Además la ECA se ha localizado en las células de Leydig (92, 93).

La ECA testicular está bajo control hormonal. La enzima está ausente en ratas inmaduras y se desarrolla con la pubertad (72, 82). La función de la enzima en esta zona se desconoce.

Muy poco se sabe respecto a la ECA en el tracto genital femenino, solo se ha localizado en la membrana plasmática de oocitos tubales y foliculares (92).

b. ADRENAL.

Está asociada con vasos sanguíneos en la corteza adrenal (66, 94), aunque en cantidades muy pequeñas (94), se piensa que juega un papel importante en la secreción de aldosterona (95). Por otra parte, se ha demostrado, que en la médula adrenal existe una alta densidad de ECA (94), la cual puede producir AII para interactuar con receptores de AII medulares (95), y así estimular la liberación de catecolaminas (96).

E. ECA EN SUERO.

Se piensa que la enzima sérica representa el desprendimiento de la ECA endotelial, y es de interés ya que se ha notado, que su concentración se incrementa en diferentes enfermedades como: silicosis, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, diabetes mellitus e hipertiroidismo (97), y se ha observado que la enzima está reducida en pacientes con cáncer pulmonar, tuberculosis, y fibrosis quística (citado en 52).

I.3. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA.

El riñón por su función depuradora es especialmente vulnerable a daño tóxico, ya que para realizarla recibe carga de un cuarto del gasto cardíaco, transporta y concentra una variedad de sustancias potencialmente tóxicas en el interior de su parénquima. Tanto las células glomerulares renales y las tubuloepiteliales son susceptibles a daño tóxico.

Las concentraciones tóxicas de los compuestos se alcanzan ya sea dentro o en la superficie de la célula tubular renal, debido a las propiedades de transporte de estas células. Adicionalmente, muchas toxinas circulan de manera inofensiva porque se encuentran unidas a una proteína, hasta que la célula activa a la toxina, disociándola de la proteína.

La insuficiencia renal aguda (IRA), es un síndrome común reversible, algunas toxinas y drogas pueden promover el desarrollo

de la IRA por procesos prerrenales, intrarrenales, u obstructivos:

1.3.1. IRA obstructiva es producida por el depósito luminal de cristales lo que causa daño celular.

1.3.2. IRA prerrenal es inducida por inhibidores de la síntesis de prostaglandinas.

1.3.3. IRA intrarrenal es inducida, por nefrotoxinas o por medios inmunológicos.

1.3.3. IRA INTRARRENAL.

Los procesos intrarrenales son los que más comúnmente producen IRA. Las drogas pueden producir IRA ya sea por un daño celular renal directo o por una reacción de hipersensibilidad aguda, siendo el camino patogénico más común el primero (98). El entendimiento de la patogénesis de la necrosis tubular aguda (NTA), reside en el entendimiento de las alteraciones bioquímicas responsables de la pérdida de la integridad celular renal. A continuación se considerarán los siguientes puntos: a) estructura subcelular en el cual el daño puede ocurrir, y b) principales eventos bioquímicos y mediadores del daño subcelular.

A. ESTRUCTURA SUBCELULAR

a. **MEMBRANA PLASMÁTICA.** La condición básica para la viabilidad celular es el mantenimiento continuo del espacio intracelular como un compartimento distinto con respecto al fluido extracelular, este proceso depende de la integridad funcional y estructural de la barrera de permeabilidad dada por la membrana plasmática. Esto permite una retención de macromoléculas citosólicas en la célula y restringe la permeabilidad iónica a grados compatibles con la capacidad de energía requerida por bombas de membrana tales como la ATPasa de Na-K y la ATPasa de calcio (98).

En particular, el área de superficie de la membrana plasmática es una de las características que determina la cantidad total de transporte transcelular, el cual puede ser promovido por el epitelio ya que, una consideración de mayor importancia en la función función específica que desempeña el túbulo renal. Además, la membrana plasmática es el sitio de numerosas reacciones enzimáticas (98).

Las nefrotoxinas pueden, por interacciones directas con los componentes de la membrana plasmática, alterar las propiedades de la estructura, la permeabilidad, o la actividad de bombas y canales importantes.

Los metales pesados, tales como el mercurio tienen efectos

prominentes sobre la permeabilidad de la membrana (99), estudios *in vitro* han demostrado que estos agentes pueden alterar la ATPasa de Na-K (100). Las toxinas pueden, potencialmente cambiar el área disponible para los procesos de transporte, esto puede deberse a internalización de membranas, a defectos en la producción de la membrana y en el reemplazamiento de pérdidas normales, o a la pérdida de membranas hacia el lumen del túbulo (101, 102).

b. MITOCONDRIA. Las células del túbulo renal, contienen abundantes mitocondrias necesarias para el metabolismo oxidativo controlado, que produce el ATP requerido para los mecanismos de transporte y otros procesos que consumen energía.

Después de una exposición *in vivo* a un número de nefrotoxinas y antes de la aparición de un daño celular letal se ha observado que los niveles de ATP en las células de la corteza renal se reducen (98).

Como resultado a la exposición a nefrotoxinas, se produce un incremento anormal de la permeabilidad de la membrana plasmática a cationes monovalentes como Na y K, esto produce hinchamiento celular y alteraciones en la tasa de respiración mitocondrial (98). Además la alteración en la función mitocondrial puede contribuir al daño celular por otros efectos, como por ejemplo: la producción de radicales libres (103).

c. LISOSOMA. Los lisosomas proveen un espacio ácido intracelular, en el cual numerosas enzimas hidrolíticas actúan para degradar macromoléculas así como orgánulos enteros (104). Los lisosomas son particularmente prominentes en el túbulo proximal, el cual muestra una actividad endocítica muy amplia, procesando materiales reabsorbidos del filtrado glomerular (105). Estos pueden actuar como sitio principal intracelular de depósito de toxinas, para de esta manera reducir la susceptibilidad de otros orgánulos al daño. Sin embargo, al mismo tiempo, los lisosomas pueden deteriorarse estructural y funcionalmente como un resultado de la acumulación de toxinas pudiendo liberarlas en cualquier momento y así servir potencialmente como una fuente intracelular de toxina.

Se ha demostrado que esta acumulación, da como resultado una inhibición de los procesos degradativos lisosomales para macromoléculas endocitadas (106). Además de que se inhiben fosfolipasas intralisosomales que resultan en la formación de lisosomas grandes y cuerpos mieloides prominentes (107).

d. RETICULO ENDOPLASMICO. El retículo endoplásmico funciona como sitio de síntesis de proteínas, sitio de secuestro de calcio y de variadas funciones de oxidación, las cuales son importantes en el metabolismo de drogas (108); esto da como resultado la formación de radicales libres los cuales causan daño local, y de ahí una de las formas de actuar de las nefrotoxinas.

B. PRINCIPALES MECANISMOS BIOQUIMICOS Y MEDIADORES DEL DAÑO SUBCELULAR.

a. **FOSFOLIPASAS.** Estas enzimas sirven como mediadores de daño celular, degradando fosfolípidos de membrana requeridos para la estructura y función normal y promoviendo la producción, (como un resultado de su degradación) de lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, los cuales pueden posteriormente alterar los procesos de membrana (109). Existe evidencia de que, durante la IRA se produce una activación de las fosfolipasas (110).

b. **OTROS PROCESOS DEGRADATIVOS ENZIMATICOS.** La actividad no regulada de varias proteasas, nucleasas y fosfatasas puede ser considerada como un mecanismo potencialmente importante de daño celular.

c. **PRODUCCION DE RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACION.** La lipoperoxidación es el deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados. Esto tiene grandes efectos bioquímicos, especialmente cuando ocurre en lípidos de membrana, como consecuencia se altera dramáticamente su estructura y función, debido a efectos destructores de pérdida de lípidos de membrana, producción de lípidos tóxicos, y daño peroxidativo a proteínas de membrana. Las membranas de mitocondria y retículo endoplásmico poseen grandes cantidades de ácidos grasos insaturados, por lo que éstos sistemas membranosos son altamente susceptibles al daño por lipoperoxidación, además de que los más potentes iniciadores de la formación de radicales libres incluyendo ferro y hemoproteínas, se encuentran en estas membranas (111).

d. **CALCIO.** La mayoría del calcio intracelular se encuentra secuestrado en la mitocondria y el retículo endoplásmico, entonces el calcio citosólico se mantiene en un rango submicromolar. Esto permite que el calcio sea utilizado como un mensajero en procesos intracelulares (112). El daño celular letal se caracteriza por un influjo de calcio al interior celular y su acumulación en la mitocondria (113). La captación de calcio por la mitocondria la daña, en gran parte por la activación de fosfolipasas de la membrana mitocondrial, la mitocondria pierde la capacidad de amortiguar los incrementos de niveles de calcio del ambiente que la rodea. Niveles anormalmente altos de calcio intracelular, pueden activar fosfolipasas que dañarán membranas subcelulares en adición a la mitocondrial, puede alterar estructuras citoesqueléticas, y puede interferir con otros procesos celulares en los que el calcio normalmente ayuda a regular (113).

II. ANTECEDENTES

La proteinuria es una característica de muchas enfermedades renales, su determinación juega un papel importante en el repertorio diagnóstico de los nefrólogos (114). El aumento de proteínas de alto y bajo peso molecular en la orina de humanos son indicadores de alteración en la función del filtrado glomerular y/o de la capacidad de resorción tubular (115). Además de la identificación inmunológica y cuantificación de proteínas en la orina, se han empleado una variedad de métodos analíticos para estudiar la composición fisiológica y patológica de las proteínas urinarias, tales como cromatografía de columna, electroforesis en geles de agarosa o en geles de poliacrilamida (114).

La proteinuria se define como un incremento anormal en la excreción urinaria de proteínas. La composición normal de proteínas urinarias es la siguiente: 40% de albúmina, 8% de IgG, 8% de otras proteínas plasmáticas, 2% IgA y 42% de proteínas de los túbulos y tracto urinario inferior.

Las proteínas séricas de bajo peso molecular (menos de 50 Kd como: glicoproteína ácida alfa-1, microglobulina alfa-1, lisozima beta-2 microglobulina) que se filtran libremente por el glomérulo renal en individuos normales son reabsorbidas casi completamente por el túbulo proximal, por lo que menos del 1% de la carga filtrada de estas proteínas aparecen en la orina. El glomérulo impide el paso de proteínas plasmáticas de alto peso molecular, por lo tanto si existe daño glomerular significativo hay una excesiva filtración glomerular de macromoléculas a una velocidad tal que excede la reabsorción tubular y por lo tanto aparecen en la orina y cuando existe daño tubular la proteinuria se caracteriza por la aparición en orina de proteínas plasmáticas de un peso molecular menor al de la albúmina, estas no se reabsorben normalmente por los túbulos y su excreción es como consecuencia del deterioro de esta función (Figura 3).

Según Bernard y cols. (116), las proteínas en orina pueden clasificarse en seis categorías de acuerdo con su origen:

1. Proteínas plasmáticas: Esta categoría incluye proteínas que son constituyentes normales del plasma y las cuales son eliminadas en la orina por el filtrado glomerular. Dependiendo de su tamaño pueden servir como indicadores de cambios funcionales y/o morfológicos que afectan la parte glomerular o tubular de la nefrona. Pertenecen a varios grupos bioquímicos tales como anticuerpos, enzimas, hormonas, antígenos celulares, proteínas acarreadoras, inhibidores etc.

2. Proteínas derivadas del riñón: Estas pueden ser detectadas en la orina como consecuencia normal del recambio y metabolismo

celular. La liberación de estas proteínas se puede incrementar ya sea por daño al tejido por recambio celular anormal o por alteraciones funcionales. La mayoría de las enzimas urinarias con un peso molecular mayor que la albúmina tienen un origen renal. Las enzimas tienen diferente distribución a lo largo de la nefrona y en el riñón, el patrón de proteinuria puede ayudar a localizar lesiones renales. Como una regla general, la actividad enzimática es mayor en la corteza (túbulos proximales) y menor en la papila y médula intermedia. Esto significa que la enzimuria es particularmente sensible al daño en el túbulo proximal.

3. Proteínas del tracto urogenital: Estas pueden derivar del epitelio del tracto urogenital (ureter, vejiga, uretra), de glándulas accesorias masculinas, o de secreciones vaginales.

4. Proteínas liberadas de tejidos diferentes del tracto urogenital: Liberadas de tejidos dañados o enfermos con tamaño suficientemente pequeño para cruzar el glomérulo (ej. la mioglobina).

5. Proteínas asociadas al embarazo: Antígenos de tejido placentar o de origen fetal, que pueden detectarse en la orina de mujeres embarazadas.

6. Proteínas derivadas de tumores: La orina de pacientes con cáncer puede contener altas cantidades de proteínas, las cuales se utilizan como marcadores de tumor. (ej. antígeno carcinoembrionario).

También como se mencionó anteriormente la proteinuria puede ser clasificada en dos tipos de acuerdo con el tamaño de las partículas: de alto (APM) y de bajo peso molecular (BPM), la de APM está asociada con un incremento de la permeabilidad glomerular y la de BPM predominantemente con daño en la resorción tubular, lo que se observa con un incremento en la excreción de enzimas, en el caso tubular: de BPM como lisosima, ribonucleasa, amilasa, tripsinógeno, lipasa, pepsinógeno A. Otras enzimas urinarias importantes en la diagnóstico de la integridad del túbulo proximal de acuerdo a su origen son: a) Borde en cepillo: alanina aminopeptidasa (AAP), gamma-glutamyltransferasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP), alfa-glucosidasa, fosfatasa ácida, trohalasa, dipeptidilaminopeptidasa IV (DAP); b) Lisosomas: β -glucoronidasa (GRS), N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), β -galactosidasa (GAL), fosfatasa ácida, y c) Citosol: Lactato deshidrogenasa (LDH), leucina aminopeptidasa, ligandina y β -glucosidasa (117).

La liberación de enzimas a la orina se debe a múltiples efectos en las células tubulares (Figuras 4 y 5) y los cambios en la excreción de enzimas urinarias representa un indicador sensible de daño renal, aunque existen algunas que se pueden detectar antes que otras, lo que contrasta con los marcadores más comúnmente utilizados: microscopía de luz y pruebas de función renal las cuales son relativamente insensibles, por lo tanto no funcionan

para detectar lesiones tempranas (117).

En los modelos experimentales de cloruro de mercurio y dicromato de potasio se han registrado los cambios en la excreción de algunas enzimas: las sales de cromato ya sea de potasio o de sodio, afectan selectivamente la porción contorneada del túbulo proximal. Experimentos animales reportados se han realizado en ratas con la administración parenteral de cromato en una sola dosis que varía de 1 a 30 mg/Kg, muestra que a dosis mayores de 10 mg/Kg hay incrementos en la liberación de enzimas del borde en cepillo (AAP, GGT, ALP y maltasa); lisosomales (ACP, GAL, GRS) y citosólicas (LDH) así como lisosima con un máximo de excreción en los primeros dos días después de la inyección (118).

El cloruro de mercurio se ha usado ampliamente como un compuesto para inducir insuficiencia renal aguda, el cual se caracteriza por la excreción urinaria de enzimas después de la administración de la nefrotóxina, la intoxicación se caracteriza por un incremento de la liberación de muchas de las enzimas, especialmente en el primer día después de la inyección (118). Se ha informado la excreción de un gran número de enzimas localizadas en el borde en cepillo, citosólicas, lisosomales y mitocondriales así como de origen sérico (117).

Kokubu y cols. (119) demostraron que la ECA aparece en la orina de sujetos normales. De acuerdo con los trabajos de Baggio y cols. (120) la actividad de esta enzima se incrementa en humanos con nefrolitiasis y pielonefritis crónica, por lo que sugieren que la excreción de la ECA principalmente depende del daño tubular ya que cuando no existe alteración de la permeabilidad de la membrana basal glomerular, las células tubulares renales son la principal fuente de enzimas urinarias con un peso molecular mayor a 70,000 d., como es el caso de la ECA. Como resultado de estos estudios proponen que la determinación de la actividad de la ECA en la orina puede utilizarse como un marcador ideal de daño al túbulo proximal. También Hosojima y cols. (121) examinaron esta posibilidad estudiando la excreción de la ECA en pacientes con diabetes no dependiente de insulina la cual se incrementó probablemente como reflejo al daño tubular. Otro trabajo que reporta un incremento de la actividad urinaria de la ECA es el de Pitotti y cols. (122) en pacientes que presentaron rechazo agudo al trasplante renal, apoyando que la actividad urinaria de ECA deriva del túbulo renal.

En dos estudios previos en este laboratorio se caracterizaron los cambios en la actividad de ECA urinaria, en dos modelos experimentales en ratas: síndrome nefrótico (SN) o intoxicación con tetracloruro de carbono (CCl_4). En ambos modelos, la ECA urinaria aumentó. El aumento en la ECA urinaria en el SN parece ser secundaria a pérdida de la ECA circulante (123), mientras que en las ratas tratadas con CCl_4 parece deberse a la liberación de la ECA tubular debido al daño del túbulo proximal producido por este solvente (124). Sin embargo, actualmente no se conocen los cambios en la ECA urinaria en otros modelos de insuficiencia renal aguda experimental, la cual puede inducirse con nefrotóxicas que producen necrosis en el túbulo proximal tales como dicromato de potasio (125) y cloruro de mercurio (126). Estas nefrotóxicas tienen

interacción directa con la membrana de las células de los túbulos proximales, lo que altera tanto la función enzimática como la permeabilidad dañando a los organitos celulares y como resultado necrosis que viene seguida de obstrucción intratubular y disminución en la velocidad de filtración glomerular.

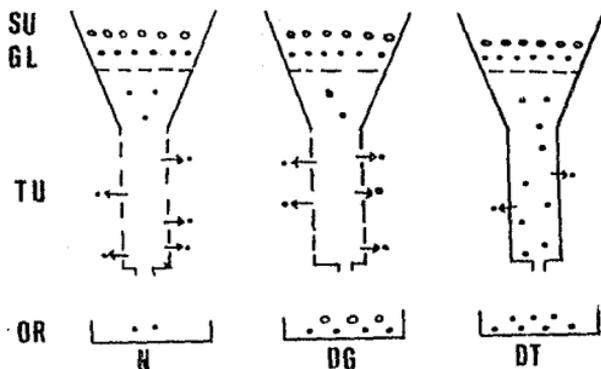


Figura 3. Manejo de proteínas de alto (°) y bajo (•) peso molecular, SU-Suero, GL-Glomérulo, TU-Túbulo, OR-Orina.

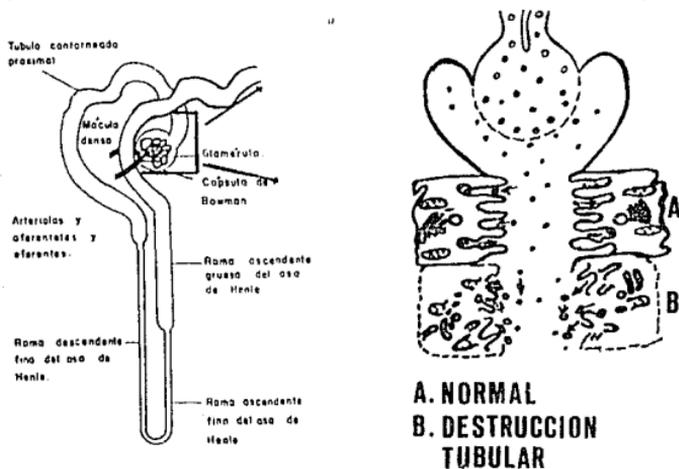


Figura 4. Mecanismos de excreción enzimática normal y alterada, A. Condiciones normales, B. Destrucción de célula tubular.



Figura 5. Diferentes estados de liberación de proteínas tubulares bajo condiciones patológicas 1) Liberación de proteínas de la superficie de la membrana, 2) Liberación de proteínas integrales, enzimas del borde en cepillo y vacuolas, 3) Vacuolización severa y pérdida del material del borde en cepillo.

III. HIPOTESIS

La excreción urinaria de la enzima convertidora de angiotensina puede aumentar cuando hay lesión en el túbulo proximal producida por nefrotoxinas que causan insuficiencia renal aguda.

IV. OBJETIVOS

Demostrar en dos modelos experimentales de insuficiencia renal aguda, inducida con dosis únicas de cloruro de mercurio y con dicromato de potasio, que se produce lesión en el túbulo proximal de la nefrona y con ello aumenta el índice de excreción urinaria de ECA.

Demostrar si se modifican los niveles de ECA sérica, renal y urinaria.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1. REACTIVOS.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) se obtuvieron los siguientes reactivos: Hipurato de histidil-L-leucine (HHL), Nonidet P-40, Tris HCl, albúmina sérica bovina (ASB), reactivo de Folin & Ciocalteu, Gli-Pro-p-Nitroanilida, glicina, p-Nitroanilina, p-nitrofenol, p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminide, cloruro de mercurio y dicromato de potasio; el HHL radiactivo se obtuvo de Dupont, New England (Boston, MA, USA); de JT Baker: acetato de sodio, citrato y carbonato de sodio. Los demás reactivos fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

V.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

V.2.1. ESTUDIO SECUENCIAL. Este experimento se realizó para analizar el curso del daño producido y la fase regenerativa del túbulo contorneado proximal.

Se usaron 30 ratas macho (cepa Wistar) con un peso de 300-400 g (dos ratas por cada tiempo). Las ratas control sólo se inyectaron con vehículo.

La insuficiencia renal aguda (IRA) se indujo de la siguiente manera:

A) con una sola inyección subcutánea de una solución de dicromato de potasio en solución salina estéril a una dosis de 15 mg/Kg (125).

B) una sola inyección intraperitoneal de cloruro de mercurio en solución salina estéril a una dosis de 1.4 mg/Kg (126, 127). Los animales control recibieron el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril).

Las ratas (n=2 por tiempo) se mantuvieron en jaulas metabólicas durante el estudio para recolectar su orina de 24 h; se sacrificaron por decapitación después de la inyección de cloruro de mercurio o del vehículo a las 16, 24 y 48 h; 3, 5, 7, 9, 15, 22, y 28 días. Para el estudio secuencial de dicromato de potasio, las ratas se sacrificaron los días 1, 3, 5, 7, 9. En estos días se obtuvo sangre, orina y secciones de riñón para microscopía de luz. El suero y la orina se congelaron a -70°C , y el tejido se congeló en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. En suero y orina se realizaron las siguientes determinaciones: ECA, proteínas totales, sodio, y creatinina. En suero: se midió urea y sodio. La IRA se evaluó con la depuración de creatinina, el índice de insuficiencia renal, la relación CrO/CrS (O/S), la creatinina y la urea en suero.

Se realizaron estudios con microscopía de luz de las muestras renales para evaluar la alteración histológica celular.

V.2.2 ESTUDIO DE 24 Y 48 HORAS.

Una vez realizado el estudio secuencial, se determinó el periodo de tiempo que representaba el inicio del daño producido por la IRA inducida experimentalmente, por lo que se trabajó específicamente en los tiempos de 24 y 48 h.

Se utilizaron 180 ratas macho (cepa Wistar) con un peso de 300-400 g (30 animales por modelo), las cuales se mantuvieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 y 48 h, se sacrificaron por decapitación, unas a las 24 h y otras a las 48 h, para la obtención del suero sanguíneo y los riñones, el suero y la orina se congelaron a -70°C y los riñones en nitrógeno líquido hasta su procesamiento como se indicó en el estudio secuencial. En estos modelos se adicionaron estudios de microscopía electrónica y la determinación de ECA y proteínas totales en riñón.

V.3. TECNICAS ANALITICAS.

V.3.1. DETERMINACION DE PROTEINAS. Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry (128), para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

- * Solución A: carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%.
- * Solución B: sulfato de cobre al 0.5%.
- * Solución C: Una mezcla de 50 ml de solución A más 1 ml de solución B (se prepara al momento de usarse).
- * Solución D: Reactivo de Folin & Ciocalteu 1 N. Se prepara a partir de la solución concentrada 2 N.
- * Solución E: Albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 mg/ml. Se prepara una curva patrón con esta solución de 5 hasta 50 μg .

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

Antes de cuantificar las proteínas urinarias, estas recibieron el siguiente tratamiento: se precipitaron y se lavaron con ácido tricloroacético (ATA) al 10%, mezclando 0.1 ml de orina y 0.9 ml de ATA, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos, se decantó y se volvió a repetir esta misma operación 2 o 3 veces, hasta que el sobrenadante quedó transparente, finalmente se decantó y el

precipitado se resuspendió en 2 ml de NaOH 0.1 M.

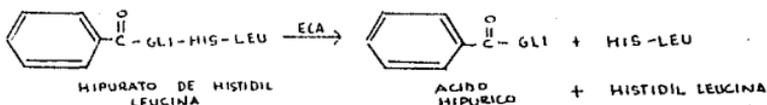
A los sueros se les hizo una dilución 1:400, de esta dilución se tomaron 0.2 ml para la determinación de proteínas. Los resultados se expresaron en: mg/24 h (orinal, en: mg/dl (suero) y en: mg/ml (tejido).

V.3.2. ELECTROFORESIS: Para analizar los patrones de proteinuria la técnica que se realizó fué la descrita por Laemmli y cols. (129), con geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Se utilizó un kit con marcadores de peso molecular como estándar de Sigma Chemical Company para pesos moleculares entre 14,000-70,000 d con las siguientes proteínas: albúmina bovina: 66,000 d; ovalbúmina: 45,000 d; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa: 36,000 d; anhidrasa carbónica: 29,000 d; tripsinógeno: 24,000 d; inhibidor de tripsina: 20,100 d; lactalbúmina: 14,200 d; para pesos moleculares entre 30,000-200,000 d: anhidrasa carbónica: 29,000 d; ovalbúmina: 45,000 d; albúmina bovina: 66,000 d; fosforilasa b: 97,400 d; galactosidasa: 116,000 d y miosina: 205,000 d. Los geles se tiñieron con azul de Coomassie. Posteriormente se realizó la densitometría de las bandas, con un densitómetro de Hooper Scientific (San Francisco CA).

V.3.3. DETERMINACION DE UREA, CREATININA Y ELECTROLITOS. La urea y la creatinina se midieron utilizando autoanalizadores (Creatinine analyzer 2, BUN analyzer 2, Beckman Instruments Inc. Fullerton, CA, USA) y el sodio se midió por flammometría (Fotómetro de Flama IL 433, Instrumentation Laboratory Lexington MA). Con estos datos se realizaron los siguientes cálculos: relación O/S (Creatinina en orina/ creatinina en suero), índice de insuficiencia renal (IIR)= sodio urinario/relación O/S, Depuración de creatinina= creatinina urinaria/creatinina sérica x flujo urinario.

V.3.4. EXTRACCION DE ECA EN RINON. La ECA unida a la membrana se extrajo utilizando Nonidet P-40 0.5% (123, 124, 130, 131) el tejido se descongeló y se homogenizó (en 5 ml) durante 30 segundos con un homogenizador de tejidos (Politrón) en una solución amortiguadora con la siguiente composición: Tris-HCl 0.1 M pH 7.8, KCl 30 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 0.25 M y Nonidet P-40 0.5%, se dejó reposar toda la noche a 4°C; y se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 minutos a 4°C; el sobrenadante se separó en tres alcuotas para determinar proteínas y ECA.

V.3.5. DETERMINACION DE ECA. E.C. 3.4.15.1. La actividad de la ECA, se midió usando como sustrato hipurato de histidil leucina (HHL) (121, 122), con un método radioquímico (132), en este ensayo se emplea una mezcla de HHL radiactivo y HHL no radiactivo; el HHL radiactivo está marcado con ¹⁴C, la ECA hidroliza al HHL en histidil-leucina y en ácido hipúrico (AH). Como se muestra a continuación:



El AH radiactivo liberado se extrae con acetato de etilo y se cuenta en un contador de radiaciones beta.

Inmediatamente antes del ensayo se mezclaron 3.5 μl de HHL 14-C (3 mCi/mmol; 0.0177 nmoles, 77,000 desintegraciones por minuto (dpm)) y 3.5 μl de HHL no radiactivo 88.1 mM (preparado en etanol:agua 6:4) por cada tubo del ensayo. La concentración final de HHL fue de 5 mM.

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

Para cada muestra se utilizaron cuatro tubos, dos para el blanco y dos para el problema.

A todos los tubos se les agregó la muestra en un volumen máximo de 10 μl de la muestra como máximo.

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

A todos los tubos se les agregó 40 μl de sustrato disuelto en amortiguador.

Se incubó a 37°C en un baño de incubación.

Al final de la incubación se adicionaron 50 μl de HCl 1 M a los tubos problema.

Se agregaron 300 μl de acetato de etilo con un repipeteador a todos los tubos, empezando por los que contienen el blanco.

Se agitaron vigorosamente en un vortex por 15 segundos.

Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente por 15 minutos a 2500 rpm.

Se separaron 200 μl de la fase orgánica (superior) y se mezclaron con 5 ml de líquido de cetilleo en un frasco para contar radiaciones beta.

Los frascos se contaron en un contador de radiaciones beta y la actividad de la ECA se calculó restando las dpm del blanco a las dpm del problema, utilizando la siguiente fórmula (132):

$$\text{mU/ml} = \frac{\text{dpm problema} - \text{dpm blanco}}{\text{AE} \times 0.91 \times 0.61 \times t \times v} = \text{nmoles de AH/ml/min}$$

Donde:

AH = Acido hipúrico.

AE = Actividad específica (310.5 dpm/nmol).

0.91 = Recuperación de AH.

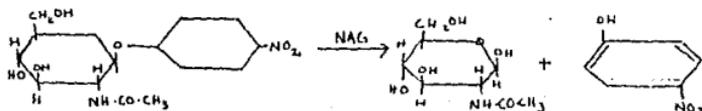
0.61 = Fracción contada de AH.

t = Tiempo de incubación (en minutos).

v = Volumen de incubación (en ml).

Una unidad de ECA es la cantidad de enzima que produce un μmol de AH/ml/min de incubación a 37°C.

V.3.6. DETERMINACION DE N-ACETIL-B-GLUCOSAMINIDASA (NAG) (EC 3.2.1.30). La determinación de NAG (133, 134) tiene el siguiente fundamento: la NAG libera al p-nitrofenol del sustrato p-nitrofenil-N-acetil-B-D-glucosaminide. la actividad de la NAG es proporcional a la cantidad de p-nitrofenol liberado el cual se lee a 405nm.



Reactivos: amortiguador de citrato 0.1 M pH 4.4 (congelado en alícuotas a -25°C), carbonato de sodio 0.2 M, pH 10.4 (4°C), p-nitrofenol 0.6 mM (4°C), p-nitrofenil-N-acetil-B-glucosaminide 10 mM (congelado a -25°C).

Muestra de orina: Se puede medir en orina de 24 h o en muestras de orina obtenidas en menor tiempo.

Método:

1. Mezclar:

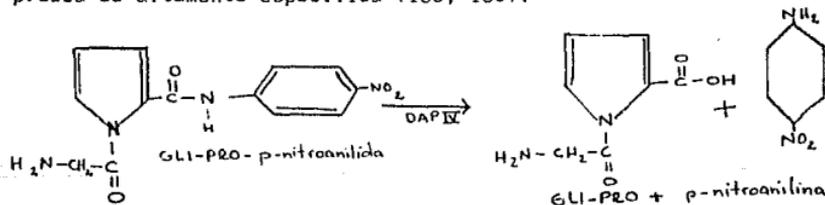
	TUBO BLANCO	TUBO PROBLEMA
Orina o suero	0.1 ml	0.1 ml
Amortiguador de citrato	1.25 ml	1.50 ml
Sustrato	0.25 ml	-----

2. Incubar a 37°C durante 15 min.
3. Adicionar 1.5 ml de carbonato de sodio 0.2 M pH 10.4 para parar la reacción.
4. Leer la absorbencia a 405 nm.

Cálculos: Se hizo una curva de calibración con diluciones crecientes se una solución 0.6 mM de p-nitrofenol.

Para realizar la curva de calibración se preparó una solución 0.6 mM de p-nitrofenol, se ajustó el pH a 10-12 con NaOH y se realizaron diluciones seriadas por duplicado (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) con agua. Se colocaron 250 µl de estas diluciones en un ensayo, lo cual equivale a 150, 75, 37.5, 18.75, 9.37, 4.68, nmoles de p-nitrofenol. Estos valores se graficaron contra las absorbencias para trazar la curva patrón. Los valores se expresaron en mU/mg de creatinina.

V.3.7. DETERMINACION DE DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA IV (DAP IV) EC 3.4.14.5. Fundamento: la enzima libera p-nitroanilina del sustrato Gli-Pro-p-nitroanilida. La DAP IV tiene una alta especificidad por este sustrato, lo cual hace que esta prueba se altamente especifica (135, 136).



Se usó Gli-prolina p-nitroanilida como sustrato, sin embargo, cualquier X-prolina p-nitroanilida puede funcionar. Este se disolvió en una solución acuosa de Tritón X-100 al 2% a una concentración final de 3 mM (4°C). Este detergente no afecta la actividad de la enzima en una concentración final de 1%. Se puede usar Nikkol al 2% o Tween 20.

Recolección de la muestra: La orina se recolectó sin conservador, se centrifugó a 2000 x g durante 15 min. y el sobrenadante se almacenó a 4°C.

Reactivos:

- a) Sustrato: Gli-Pro-p-Nitroanilida 3 mM en Tritón X-100 al 2% (estable 7 días a 4°C).
- b) Tritón X-100 al 2% (temperatura ambiente).

- c) Amortiguador glicina-NaOH 0.5 M pH 8.7.
- d) Estándar de p-Nitroanilina 750 mM.
- e) Amortiguador de acetatos 1 M, pH 4.2.

Técnica:

Los tubos experimentales contienen las siguientes cantidades:

-75 μ moles de Glicina NaOH, pH 8.7.

-1.5 μ mol de Gli-Pro-p-nitroanilida, la enzima y agua para tener un volumen final de 1.05 ml.

- Los tubos blanco y los estándar contienen agua y 150 nmol de p-nitroanilina, respectivamente. Los tubos control no contienen la muestra (enzima).

Todos los tubos deben contener:

	BLANCO	ESTANDAR	CONTROL	PROBLEMA
BUFFER GLICINA 0.5 M	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
SUSTRATO 3.5 mM	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
MUESTRA	----	----	----	100 μ l
AGUA	400 μ l	200 μ l	300 μ l	300 μ l
ESTANDAR 750 mM	----	200 μ l	----	----

INCUBACION A 37°C por 30 min.

BUFFER DE ACETATOS 1 M	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml
MUESTRA	----	----	100 μ l	----

Se agitan para homogenizarlos. El espectrofotómetro se ajusta a 0 con el blanco, las absorbencias del experimental, control, y estándar se leen a 385 nm en celdas de vidrio de 3 ml.

Cálculos:

Los cálculos de la reacción enzimática en la liberación de p-nitroanilina se obtienen de la siguiente manera:

$$\frac{E-C}{S} \times 150 \text{ nmol} \times \frac{1}{30} = \frac{5(E-C)}{S} \text{ nmol/min}$$

- E = D.O. Problema (experimental).
- C = D.O. Control.
- S = D.O. Estándar.

Los datos están expresados en mU/mg de creatinina.

V.4. ESTUDIOS MORFOLOGICOS Y EVALUACION DEL DAÑO HISTOLOGICO. Para microscopía de luz (ML), las rebanadas de riñón que incluyan corteza y médula se fijaron por inmersión en alcohol absoluto durante 2 h, se deshidrataron e incluyeron en parafina, posteriormente se cortaron (6 μ m).

Para microscopía electrónica (ME), se obtuvieron muestras de tejido de la corteza, corteza yuxtamedular, médula y cálices. Los cortes se fijaron inmediatamente por inmersión en paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de Sorensen pH 7.4 por 2 h a 4°C. Después del lavado, los grupos aldehídos libres se bloquearon en NH₄Cl 0.5 M en fosfato por 1 h. Las muestras se deshidrataron en alcohol etílico y se incluyeron en resina hidrosoluble LR-White. Las secciones ultrafinas se colocaron en rejillas de níquel con formvar, las cuales se contrastaron con sales de uranio y se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 10.

Se evaluó el daño histológico designando valores numéricos a las siguientes características celulares: la presencia o ausencia de vellosidades apicales (0-1), de vacuolación citoplásmica (0-1), edema intersticial (0-1), incremento del volumen celular (0-1-2) y el grado de necrosis (1=50% 2=100%), se observaron con un objetivo de 100x, 20 túbulos por cada riñón de rata, por cada campo se eligieron 3 túbulos que ocupaban la parte central del campo, una vez evaluados se elige otro campo al azar hasta sumar los 20, posteriormente se realizó una suma promedio y un análisis de varianza, así se visualizó de manera más objetiva el daño causado por la nefrotóxina. Este análisis se realizó en base a los estudios realizados por Paller y cols. (137).

V.5. ANALISIS ESTADISTICO. Se hicieron pruebas de Bartlett para analizar la homogeneidad de las varianzas. Para varianzas homogéneas se realizó análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y posteriormente comparaciones múltiples con el método de Bonferroni. Para varianzas no homogéneas se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron con el método de Dunn. El análisis se llevó a cabo con el programa "True Epistat". Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Una $p < 0.05$ se consideró significativo.

VI RESULTADOS

VI.1 ESTUDIO SECUENCIAL: Mercurio.

Este estudio se realizó para determinar los tiempos que mejor representaban a la IRA experimental inducida con la administración de cloruro de mercurio en una sola dosis de 1.5 mg/Kg. Con los estudios funcionales renales se comprobó que existía daño renal. El volumen urinario se incrementó a partir de las 24 h después de la inyección de la nefrotoxina, y disminuyó a los 5 días (fig.6). La urea sérica, se incrementó a las 16 h, alcanzó un máximo a los 3 días y regresó a valores normales a los 5 días (fig.7). También la creatinina sérica se incrementó el día 3, y disminuyó el día 5 (fig.8). Por otra parte la depuración de creatinina disminuyó a partir de las 16 h, con un mínimo a los 3 días y una recuperación a los 5 días (fig.9).

Para determinar la función tubular se utilizaron dos parámetros: la relación creatinina urinaria/creatinina sérica, la cual disminuyó marcadamente a partir de las 16 h, alcanzó un mínimo a los 3 días y regresó a valores control el día 5 (fig.10), y el IIR que al contrario se incrementó a las 16 h después de la inyección, alcanzó un máximo a los 3 días y disminuyó a valores basales a los 5 días (fig.11), ambos muestran alteración en la reabsorción tubular.

El mercurio produjo un incremento en la excreción urinaria de proteínas a las 24 h, el cual alcanzó un pico a las 48 h, disminuyó a partir del día 3 y regresó a valores normales el día 5 (fig.12). También la excreción de la ECA urinaria se incrementó a partir de las 16 h después de la inyección de la nefrotoxina, alcanzó un máximo a las 48 h y disminuyó a los 5 días, pero se mantuvo alta hasta el final del estudio (fig.13).

VOLUMEN URINARIO

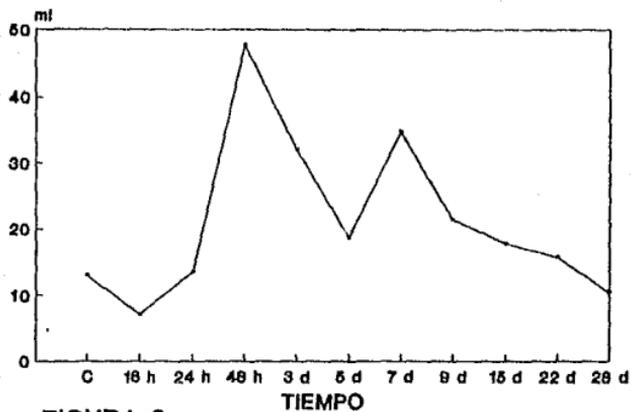


FIGURA 6.

UREA SERICA

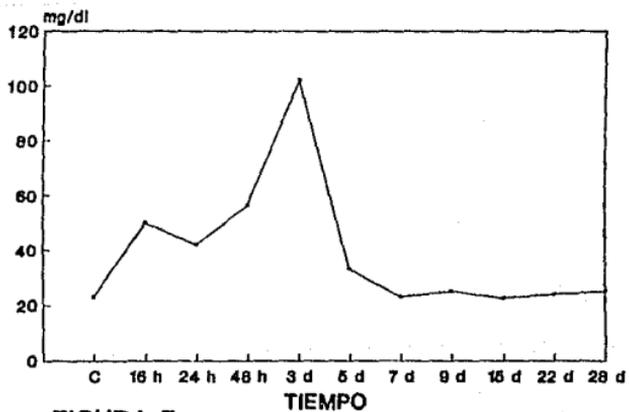


FIGURA 7.

CREATININA SERICA

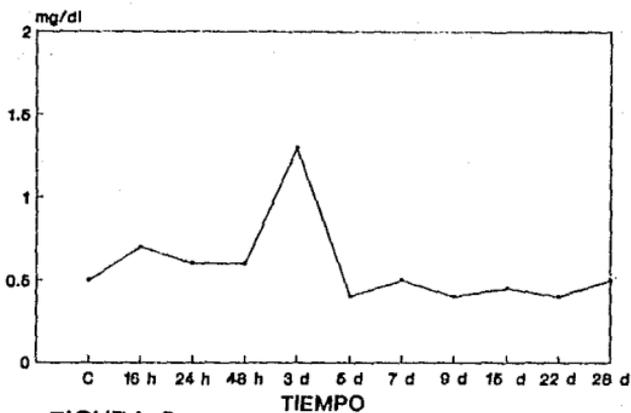


FIGURA 8.

DEPURACION DE CREATININA

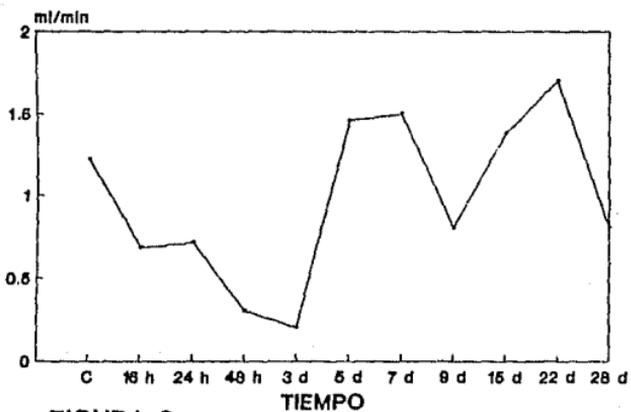


FIGURA 9.

RELACION CrO/CrS

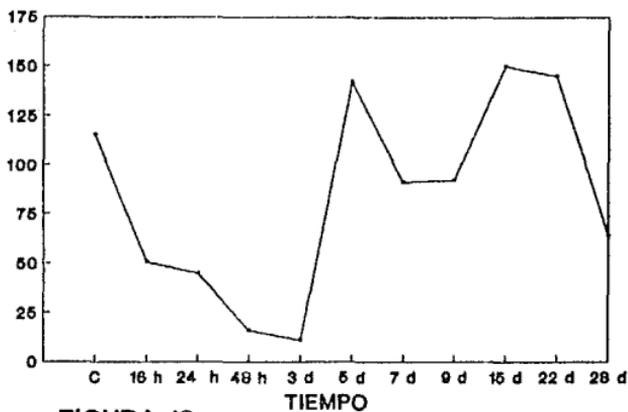


FIGURA 10.

INDICE DE INSUFICIENCIA RENAL

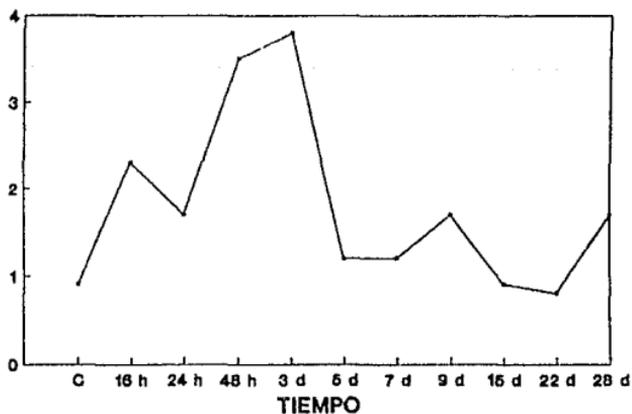


FIGURA 11.

PROTEINAS URINARIAS

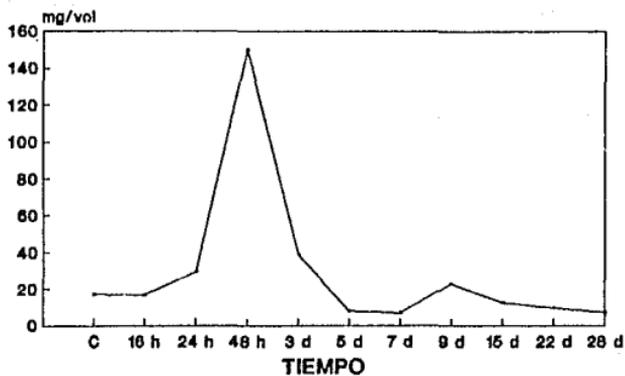


FIGURA 12.

ECA URINARIA

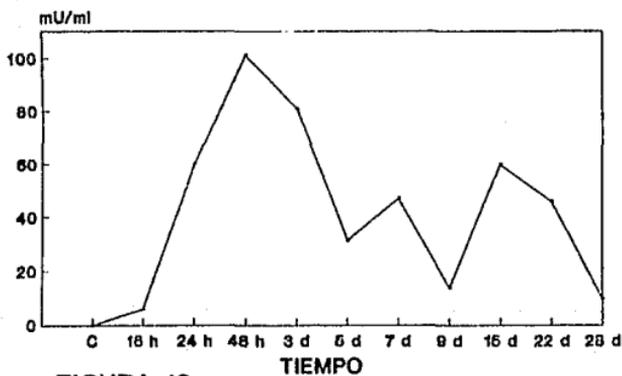


FIGURA 13.

VI.2. ESTUDIO SECUENCIAL: Dicromato.

Para este estudio se utilizó una dosis única de 15 mg/Kg de dicromato de potasio los parámetros funcionales nuevamente mostraron alteración funcional renal: Se incrementó el volumen urinario a partir del día 1 y regresó a valores basales a los 9 días (fig.14). Los niveles de urea se modificaron a partir del día 1, incrementándose al máximo en el día 3 y recuperándose a valores controles después del día 7 (fig.15). También la creatinina se incrementó a partir del día 3, con un máximo en el día 5, y regresó a valores basales el día 9 (fig.16). La depuración de creatinina en este modelo secuencial disminuyó a partir del día 3, alcanzó un mínimo el día 5 y regresó a valores basales el día 9 (fig.17). La reabsorción tubular del agua se modificó ya que en la relación Cr urinaria / Cr sérica se presentó una marcada disminución a partir del día 1, la cual regresó a valores basales para el día 9 (fig.18). El IIR, se incrementó a partir del día 1, alcanzó un máximo el día 7 y disminuyeron en el día 9 (fig.19).

Con esta dosis de dicromato las proteínas se incrementaron después del día 1 y regresaron a valores basales para el día 9 (fig.20).

Ya se tenía referencias de un incremento de la ECA urinaria cuando existe daño renal, los resultados lo comprueban ya que la actividad de la ECA, presentó un incremento en el día 1 con una máximo para el día 3, y regresó a valores basales en el día 5 (fig. 21).

VOLUMEN URINARIO

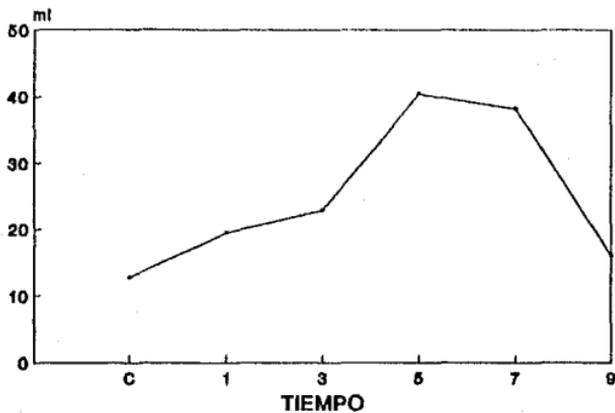


FIGURA 14.

UREA SERICA

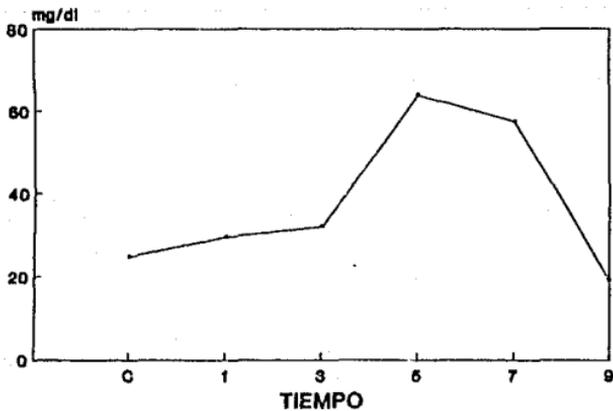


FIGURA 15.

CREATININA SERICA

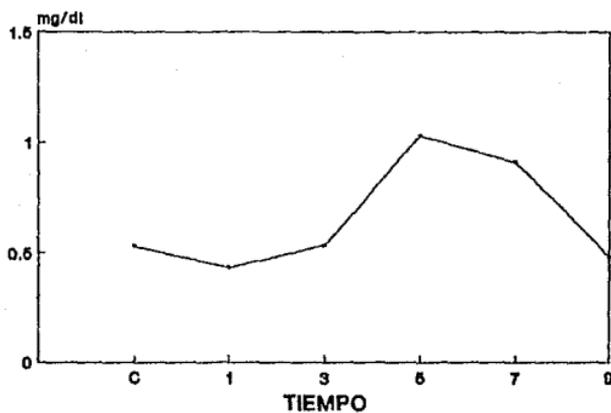


FIGURA 16.

DEPURACION DE CREATININA

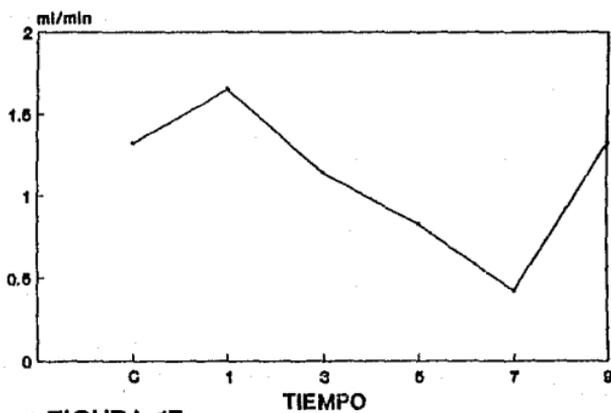


FIGURA 17.

RELACION CrO/CrS

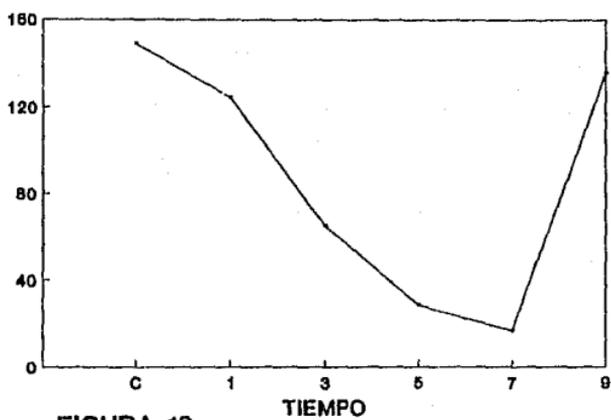


FIGURA 18.

INDICE DE INSUFICIENCIA RENAL

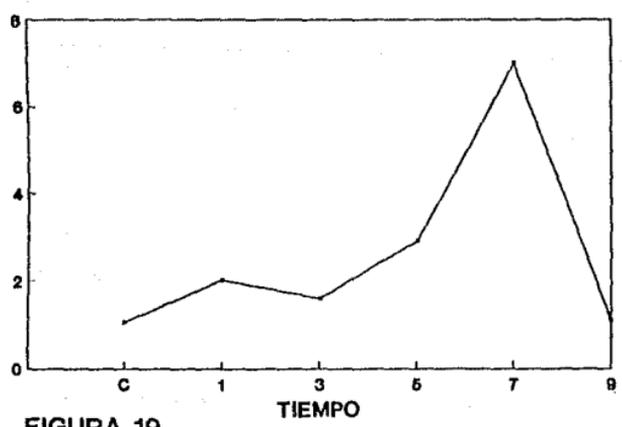


FIGURA 19.

PROTEINAS URINARIAS

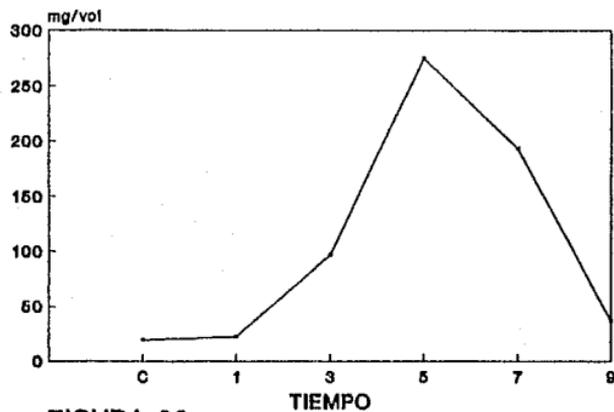


FIGURA 20.

ECA URINARIA

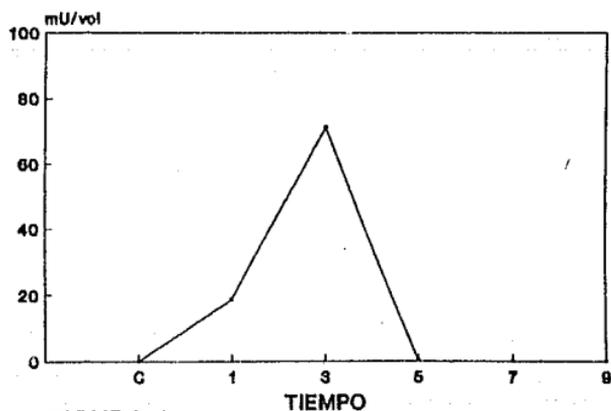


FIGURA 21.

VOLUMEN URINARIO

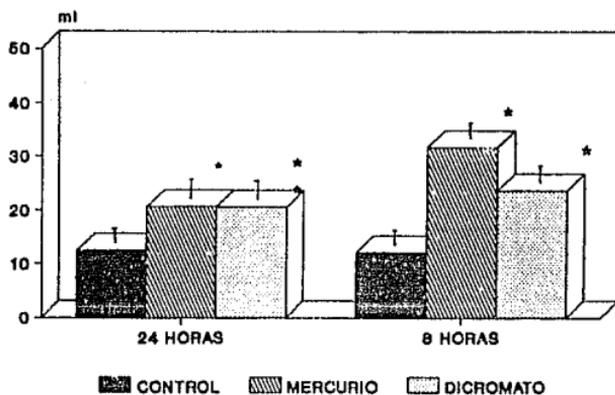


FIGURA 22. $p < 0.05$

UREA

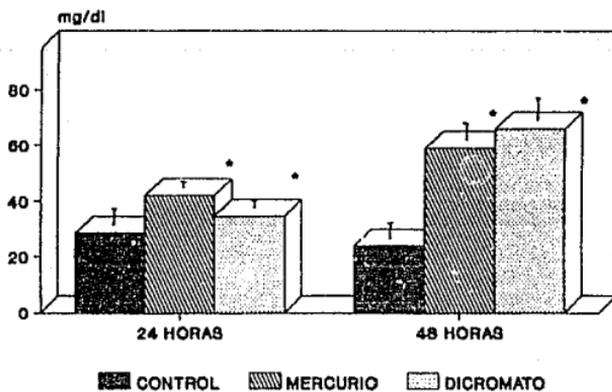


FIGURA 23. $p < 0.05$

V.3. ESTUDIO DE 24 Y 48 HORAS.

Los resultados del estudio secuencial claramente demostraron que los tiempos más representativos de la IRA experimental eran los dos primeros días, a raíz de esto se tomaron los tiempos de 24 y 48 h para realizar un estudio más detallado.

Los datos funcionales demuestran que a dosis únicas de dicromato de potasio y de cloruro de mercurio se produce IRA y marcados cambios en la ECA urinaria y renal. El volumen se incrementó significativamente, en los dos modelos experimentales a las 24 h el incremento fué el doble, pero a las 48 h el incremento en el modelo de mercurio fué casi tres veces el control (fig.22). La urea sérica, también aumentó significativamente a las 24 h y a las 48 h para ambos modelos, al doble del valor control (fig.23).

La creatinina se incrementó significativamente, tanto para el grupo de dicromato como para el de mercurio, desde las 24 h el aumento fué del doble del valor basal (fig.24). Como se esperaba, la depuración de creatinina, disminuyó significativamente en ambos modelos al 50% a las 24 h y a más del 50% a las 48 h (fig.25). Para la relación Cr urinaria/ Cr sérica, se observó una disminución significativa tanto para las ratas tratadas con mercurio como con las tratadas con dicromato a las 24 h la disminución fué de 70% y para las 48 h la disminución fué mayor (80%) (fig.26). El índice de insuficiencia renal aumentó significativamente a las 24 h, solo para el modelo de dicromato (incrementó al triple del valor control), pero a las 48 h se presentó un incremento con ambas nefrotoxinas (el doble para el modelo de dicromato y más del triple para el modelo de mercurio) (fig.26a), lo que demuestra alteración en la función del túbulo proximal.

A las 24 y 48 h de la inyección de ambas toxinas se observó un incremento significativo en la excreción urinaria de proteínas, tres veces el valor control para las 24 h y a las 48 h el aumento en el mercurio se mantuvo al triple del valor control y en el modelo del dicromato el incremento fué más de cuatro veces el valor basal (fig.27).

La ECA urinaria para mostró un incremento significativo en ambos grupos a las 24 y 48 h (fig.28). La ECA sérica aumentó significativamente a las 24 y 48 h en ambos modelos (fig.29). La ECA renal mostró una disminución significativa después de la inyección de mercurio y de dicromato (fig.30) lo que correlaciona con el incremento de la ECA urinaria.

A diferencia de la ECA, la actividad de la NAG que se determinó a las 24 h no se incrementó significativamente, pero a las 48 h aumentó drásticamente (fig.31). En lo que se refiere a la DAP también se incrementó significativamente hasta las 48 h en ambos modelos experimentales (fig.32).

CREATININA SERICA

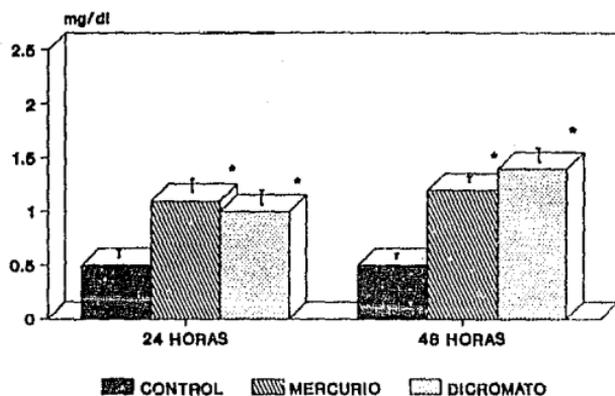


FIGURA 24. $p < 0.05$

DEPURACION DE CREATININA

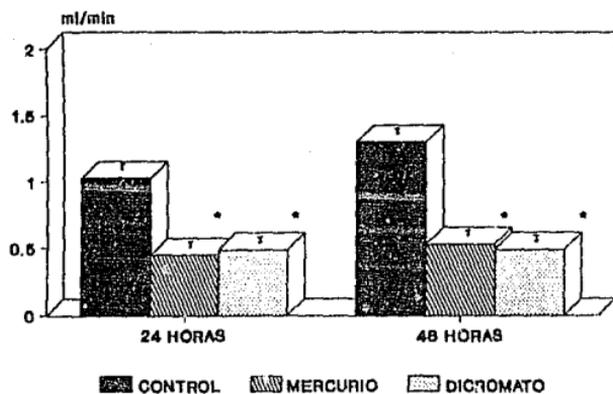


FIGURA 25. $p < 0.05$

RELACION CrO/CrS

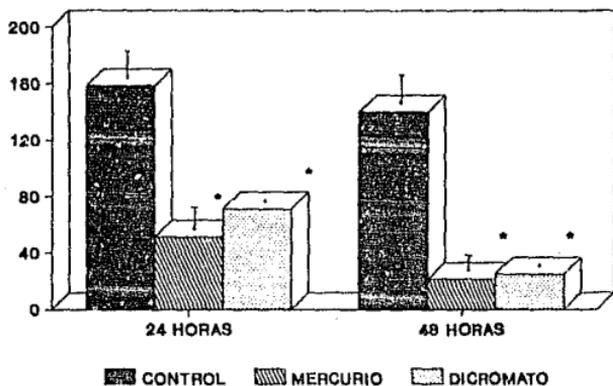


FIGURA 26. $p < 0.05$

INDICE DE INSUFICIENCIA RENAL

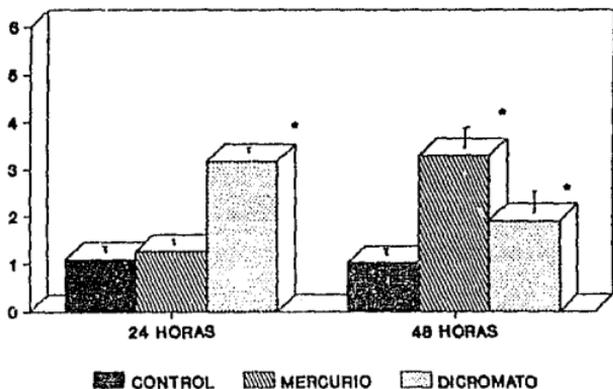


FIGURA 26a. $p < 0.05$

PROTEINAS URINARIAS

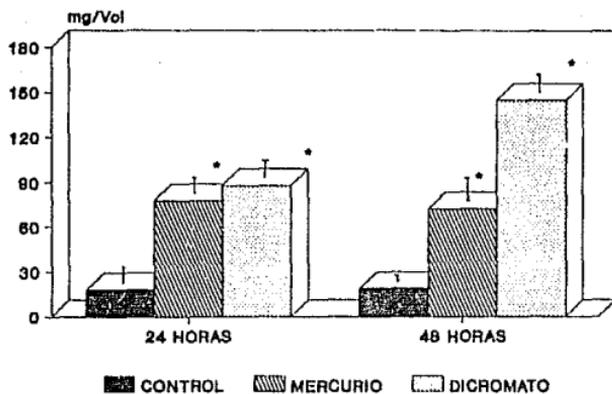


FIGURA 27. $P < 0.05$

ECA URINARIA

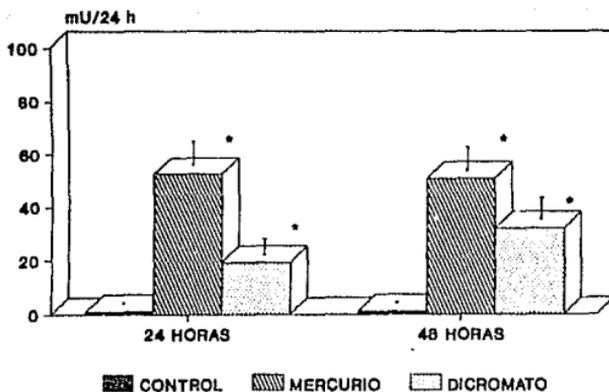


FIGURA 28. $p < 0.05$

ECA SUERO

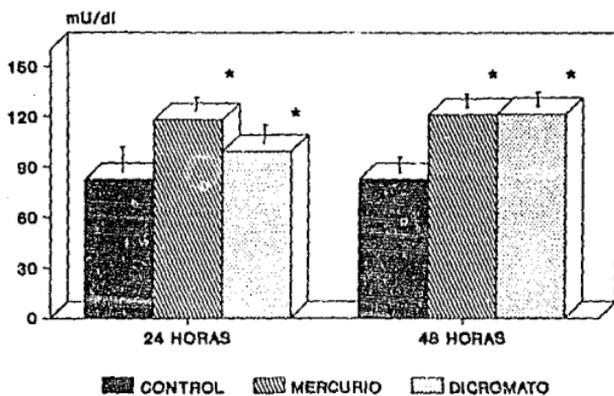


FIGURA 29. $p < 0.05$

ECA RIÑON

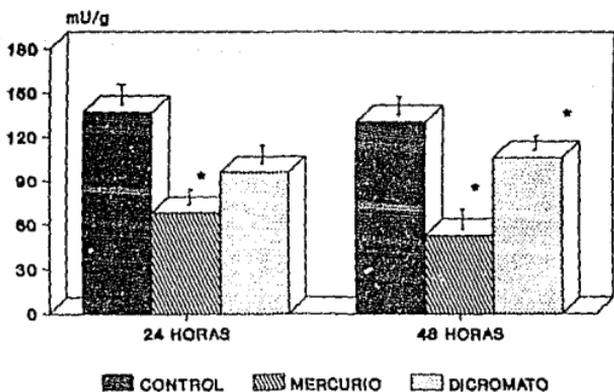


FIGURA.30 $P < 0.05$

NAG

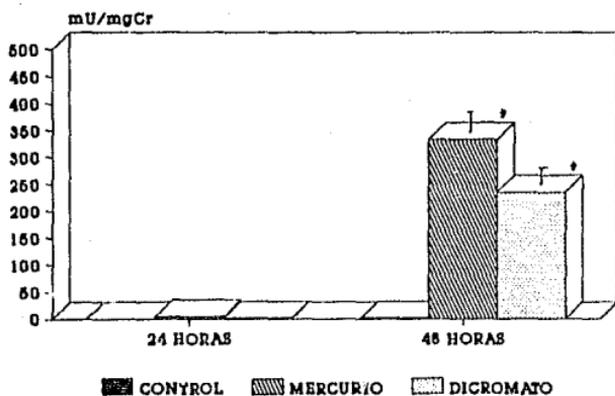


FIGURA 31 $p < 0.05$

DAP

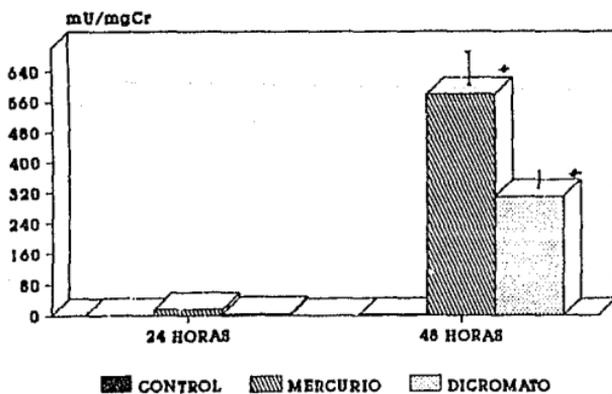


FIGURA 32. $p < 0.05$

PROTEINAS SERICAS

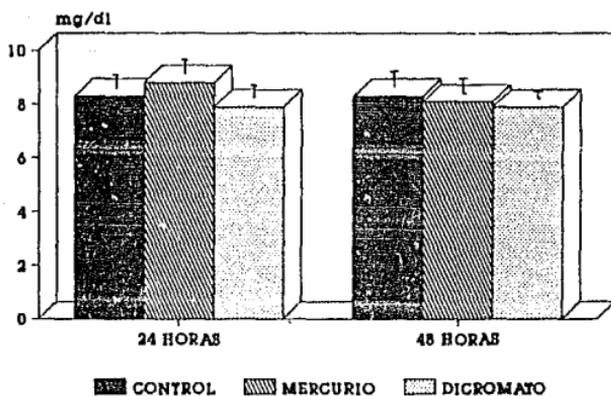


FIGURA 33.

ACTIVIDAD ENZIMATICA Y FUNCION RENAL EN RATAS CONTROL Y EXPERIMENTALES 24 Y 48 HORAS.

		CONTROL		MERCURIO	DICROMATO
ECAo	24 h	0.9	± 0.44	52.4 ± 10.3*	19.2 ± 5.3*
ECAo	48 h	0.9	± 0.44	50.6 ± 11.9*	31.8 ± 6.8*
ECA _B	24 h	82.3	± 23	118 ± 16*	99.2 ± 22*
ECA _B	48 h	82.4	± 23	121 ± 28.4*	121.6 ± 9.8*
ECA _r	24 h	136.6	± 28	68.1 ± 17.5*	95.8 ± 40
ECA _r	48 h	130.4	± 22	52.5 ± 17.7*	106 ± 16*
Prot	24 h	18	± 4.9	77.6 ± 14.7*	87.8 ± 9.6*
Prot	48 h	18.5	± 4.7	72 ± 13.9*	145 ± 12*
Cr	24 h	0.5	± 0.5	1.1 ± 1*	1 ± 1*
Cr	48 h	0.5	± 0.5	1.2 ± 1*	1.4 ± 1*
DepCr	24 h	1.03	± 0.41	0.45 ± 0.17*	0.49 ± 0.22*
DepCr	48 h	1.03	± 0.41	0.53 ± 0.2*	0.49 ± 0.2*
Vol	24 h	12.4	± 3	20.6 ± 4.9*	20.5 ± 3.16*
Vol	48 h	12	± 3.1	31.7 ± 5.7*	23.6 ± 5.9*
Urea	24 h	24.6	± 9.17	42.1 ± 6.3*	34.6 ± 8.2*
Urea	48 h	24	± 5.6	59 ± 7.4*	66 ± 11.7*
O/S	24 h	158.5	± 51	51.4 ± 28*	71.2 ± 35*
O/S	48 h	140	± 13	21.2 ± 6.9*	24.7 ± 6.1*
IIR	24 h	1.14	± 0.3	1.26 ± 0.2	3.17 ± 0.1*
IIR	48 h	1.01	± 1	3.3 ± 2.7*	1.9 ± 1.6*
NAG	24 h	0		3.9 ± 0.92	1.22
NAG	48 h	1.1	± 0.1	334 ± 82*	235 ± 74*
DAPIV	24 h	0.81		15.1 ± 47	3.9 ± 1
DAPIV	48 h	1.74		579 ± 157*	309 ± 66*

Los datos están como la media ± DS. *p < 0.05.

V.4 ESTUDIO DE MICROSCOPIA DE LUZ: MODELO SECUENCIAL. Mercurio y Dicromato

Con microscopía de luz se realizaron observaciones a diferentes tiempos del modelo secuencial: a las 4 h de la inyección de cloruro de mercurio se observó la estructura histológica normal, del componente medular y cortical (figura 34). A las 16 h, la imagen histológica mostró tanto en el componente cortical como medular con necrosis celular caracterizada con esfacelación y células en el componente luminal de los túbulos (figura 35). También a las 16 h, se observaron múltiples túbulos con células necróticas en la corteza, caracterizadas por núcleos picnóticos y desprendidas hacia las luces de los lúmenes tubulares (Figura 36).

A las 24 h, se observó extensión de la lesión tubular, las células necróticas se extienden hacia la porción mesocortical y la imagen histológica es similar a las previas, esto es, células necróticas desprendidas en los lúmenes tubulares (figura 37).

En la corteza renal se observó lesión necrótica de los elementos tubulares a las 48 h, fundamentalmente de los túbulos contorneados proximales que se ha extendido abarcando prácticamente la totalidad de la corteza, la lesión se caracterizó por la presencia de múltiples células de revestimiento con núcleos picnóticos y citoplasma acidófilo (figura 38), con un mayor aumento (20x), la imagen histológica muestra múltiples túbulos corticales, con la lesión necrótica característica: esto es, células con núcleos picnóticos, citoplasmas homogéneos acidófilos, muchas de las cuales se encuentran desprendidas en los lúmenes tubulares (figura 39).

En la estructura histológica de la corteza renal a los 3 días, existen aún células necróticas libres en los lúmenes tubulares pero hay también ya actividad regenerativa, caracterizada por la presencia de células cuboides, con núcleos grandes hiper cromáticos y con algunas figuras de mitosis (figura 40).

Con 5 días de evolución después de la inyección, existen algunos fragmentos celulares necróticos en lúmenes tubulares, la mayor parte de los túbulos se encuentran ya revestidos por un epitelio cuboide o cilíndrico (figura 41). En la corteza renal a los 7 días de intoxicación, las estructuras histológicas están completamente regeneradas, existen tan solo algunos túbulos con fragmentos o detritos celulares en los lúmenes (figura 42). Con 15 días de evolución, en la corteza renal se observa regeneración total, los túbulos contorneados se encuentran revestidos por células epiteliales cuboides, y existen en algunos túbulos fragmentos celulares en el lumen, es el tiempo final de regeneración (figura 43).

En la figura 44 se puede observar corteza de riñón que ha sido dañada por dicromato de potasio, el epitelio tubular está alterado, hay hinchamiento, vacuolización y desprendimiento celular.

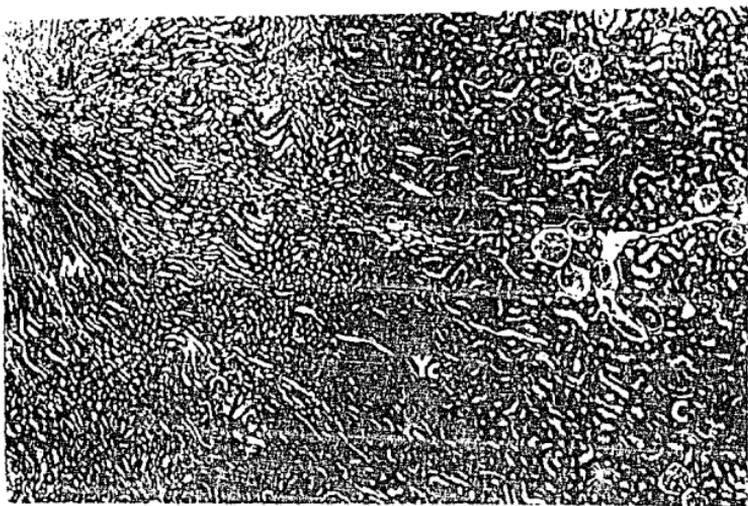


FIGURA 34. Componente medular cortical, estructura histológica normal, M-médula, G-glomérulo, C-corteza, Yc-componente yuxtacortical (4 h) 4x



FIGURA 35. Componente yuxtacortical (Yc), se observa necrosis celular (nc) y células en el componente luminal de los túbulos C-corteza, G-Glomerulo (16 h) 10x.

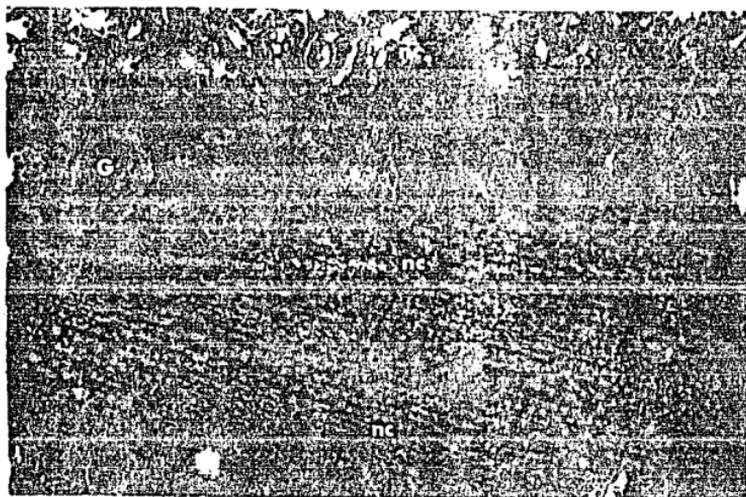


FIGURA 36. Corteza de riñon, túbulos con células necróticas (nc), con núcleos picnóticos (.), G-glomérulo (16 h) 20x.

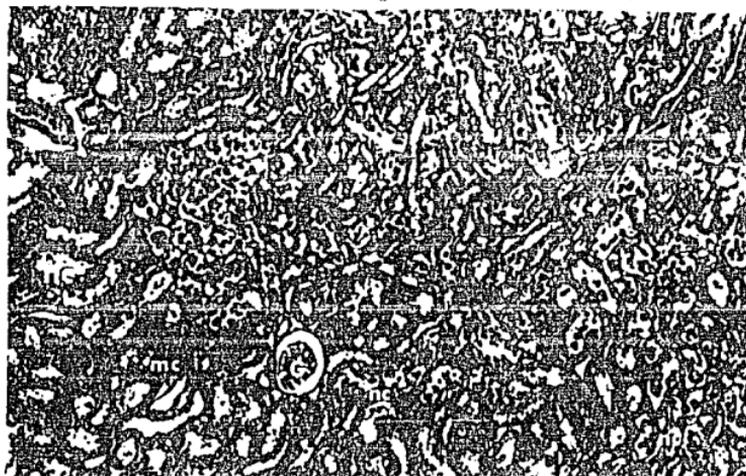


FIGURA 37. Componente cortical, en él se observa extensión de la lesión tubular, las células necróticas se extienden hacia la porción, mesocortical (mc) y con células necróticas (nc) en los lúmenes tubulares, G-glomérulo (24 h) 10x.

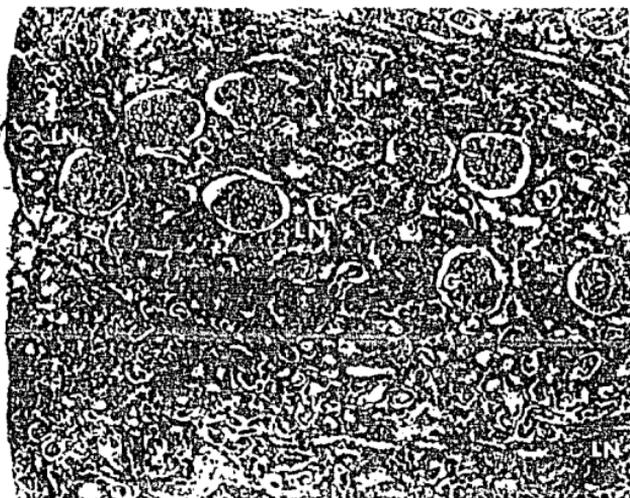


FIGURA 38. Corteza renal. Lesión necrótica (LN) de los elementos tubulares se ha extendido a la corteza, hay presencia de múltiples células de revestimiento y citoplasma acidófilo, G-glomérulo (48 h) 10x.

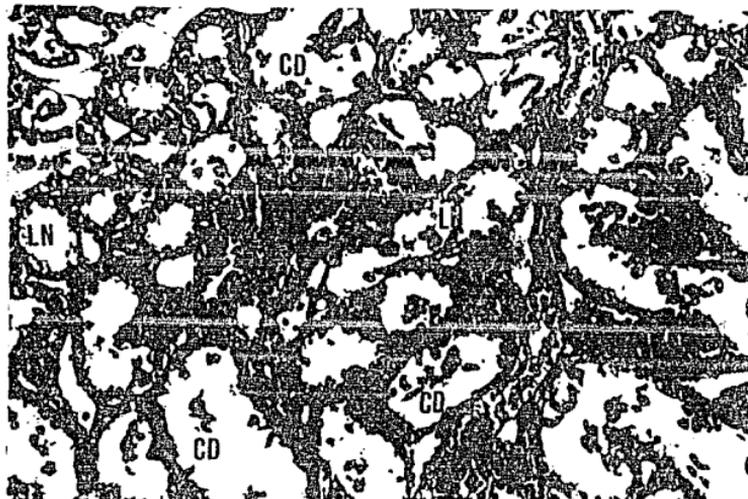


FIGURA 39. Túbulos corticales, células con núcleos picnóticos (<), citoplasmas homogéneos acidófilos muchas de las cuales están desprendidas en los lúmenes tubulares (CD), LN-lesión necrótica (48h) 20x.



FIGURA 40. Corteza renal. Existen aún células necróticas (nc) libres en los lúmenes tubulares pero ya hay actividad regenerativa, con células cuboides (*), con núcleos grandes hiperromáticos y con algunas figuras de mitosis, LT-lúmen tubular (3 días) 40x.

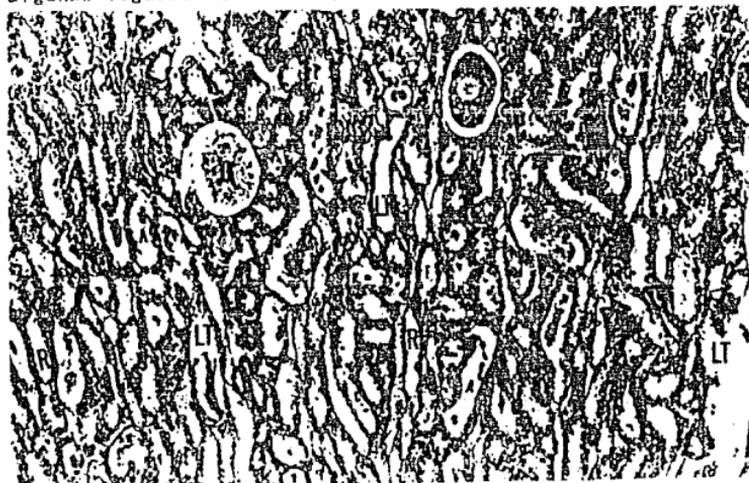


FIGURA 41. Corteza renal, con algunos fragmentos celulares necróticos en lúmenes tubulares (<), hay revestimiento con células cuboides (R), LT-lumen tubular (5 d) 10x.



FIGURA 42. Corteza renal, estructuras histológicas completamente regeneradas (R), G-glomérulo (7 d) 10x.

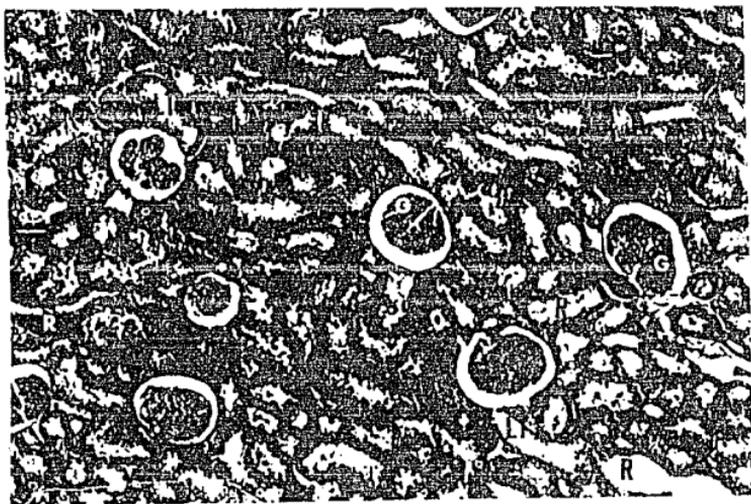


FIGURA 43. Corteza renal, regeneración total (R), G-glomérulo, LT-lúmen tubular (15d) 20x.



FIGURA 44. Corteza de riñón. Epitelio de túbulo proximal dañado con dicromato de potasio, se observa hinchamiento (h), vacuolización en la porción apical (v) necrosis (nc) y desprendimiento celular (dc) (48h) 40x.

V.5 Microscopía Electrónica del túbulo contorneado proximal en el modelo de dicromato a 48 h.

Se observaron células cuya estructura subcelular mostró numerosas vesículas limitadas por membranas y de aspecto vacío con una localización supranuclear, numerosas mitocondrias que muestran hinchamiento de las crestas e incremento de la densidad de la matriz (figura 45). Además numerosas vesículas de diámetros diversos limitadas por membrana y de aspecto vacío, mitocondrias con múltiples alteraciones: hinchamiento, dilatación y ruptura de crestas con precipitados electrón densos en la matriz, y presencia de cuerpos lisosomales de tamaño diverso (figura 46).

V.6 Microscopía Electrónica del túbulo contorneado proximal en el modelo de mercurio a 48 h.

Con mercurio los túbulos presentaban alteraciones estructurales como: el borde en cepillo destruido, el intersticio con células en respuesta inflamatoria polimorfonucleares, linfocitos, y monocitos (figura 47), la porción basal del túbulo proximal con mayor daño, con vesículas de retículo endoplásmico hinchado y ribosomas separados, mitocondrias que han perdido su morfología (figura 48) hinchadas, con ruptura de crestas, precipitados electrón densos y vacuolación (figura 49).

7

V.7 Microscopía Electrónica del túbulo contorneado proximal en el modelo control a 48 h.

Células normales, se observó el núcleo, los pliegues basales, invaginación de la membrana y vesículas de retículo endoplásmico, mitocondrias, etc. (figura 50).



FIGURA 45. Tres células (1, 2 y 3), que muestran numerosas vacuolas limitadas por membranas (v) y de aspecto vacio, numerosas mitocondrias hinchadas y densas (MI), n-núcleo, BC-borde en capillo (48 h).

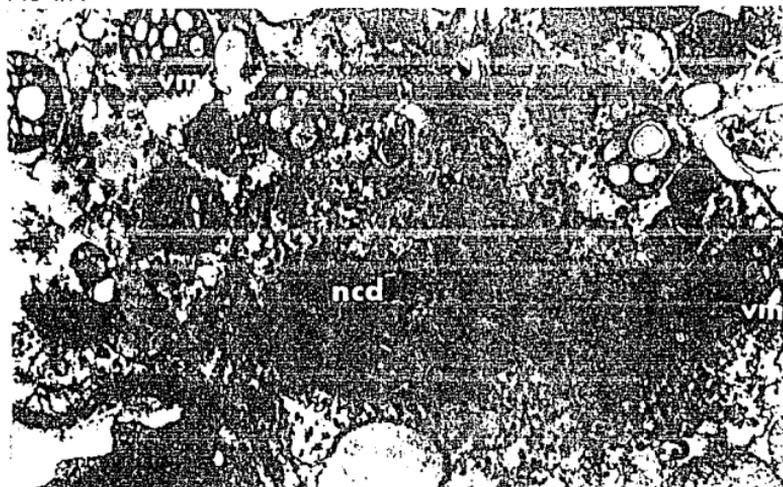


FIGURA 46. Célula que muestra vacuolación extensa del componente citoplásmico (vc), mitocondrias amorfas que presentan precipitados electrón densos (Pa), vm-vacuolización intramitocondrial, ncd-núcleo con cromatina dispersa (48 h).



FIGURA 47. Imagen que muestra tres túbulos (1,2 y 3), uno está destruido (1), el borde en capillo destruido, con polimorfonucleares (PN), linfocito (LI) y monocito (MO) en el intersticio, m-mitochondria, n-núcleo (48).



FIGURA 48. Porción basal del túbulo proximal con mayor daño, se observan vesículas de retículo endoplásmico hinchado (vrc) y ribosomas separados, mitocondrias amorfas (ma), vesículas citoplásmicas (vc), y precipitados electrón denso (Pe) (48 h).

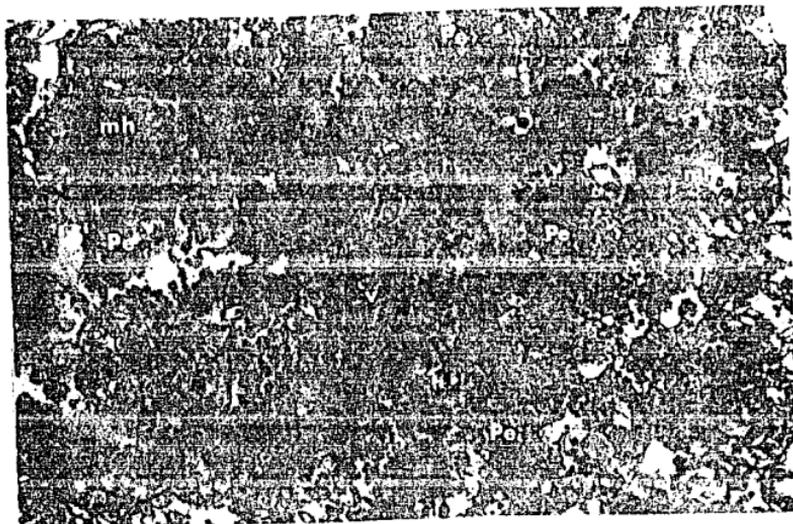


FIGURA 49. Túbulo contorneado proximal con daño extremo, mitocondrias hinchadas (mh), ruptura de crestas mitocondriales, precipitados electrón densos (Pe) y vacuolización (v) (48 h).

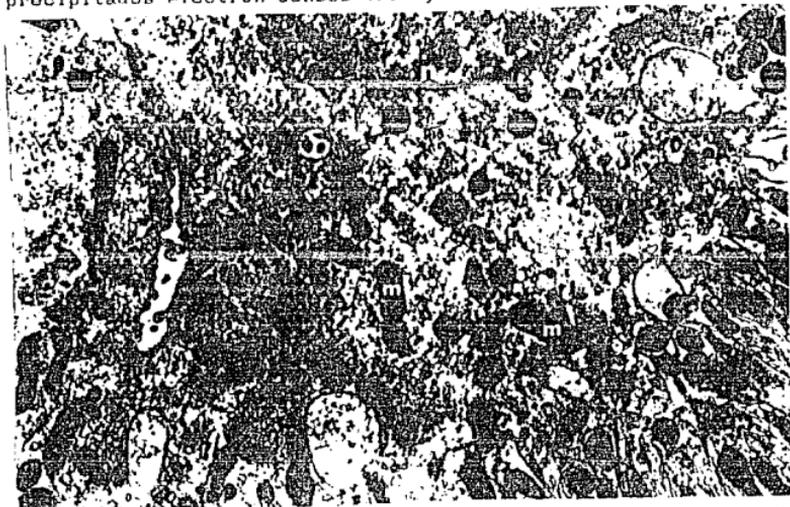


FIGURA 50. Célula normal de una rata control, se observa el núcleo (n), los pliegues basales, invaginación de la membrana (im) y vesículas de retículo endoplásmico (vre) (48 h).

V.8 Evaluación semicuantitativa del daño histológico.

Los resultados del daño histológico muestran que el cloruro de mercurio produce un daño mayor con respecto al daño que produce el dicromato de potasio.

	CONTROL	MERCURIO	DICROMATO
	.8	6.6	5.4
	.6	8	5
	1.8	7.8	4
	1.4	8.4	5.5
	.8	8.4	4.8
	1.4	8.2	4.8
	2.2	7.4	5.4
	1	8.4	5
PROMEDIO	1.2 ± 0.5	7.9 ± 0.6	4.9 ± 0.4

V.9 Electroforesis de proteínas urinarias.

El análisis de la proteinuria con electroforesis en estos modelos experimentales muestran un patrón proteico de bajo peso molecular, como se ve en la densitometría existe un incremento en la albúmina y en proteínas de menor peso indicando una alteración en el manejo de las proteínas por el túbulo proximal, o sea una disminución en la resorción tubular debido a daño en el epitelio túbular que incrementa la cantidad de estas enzimas (figs. 51 y 52).

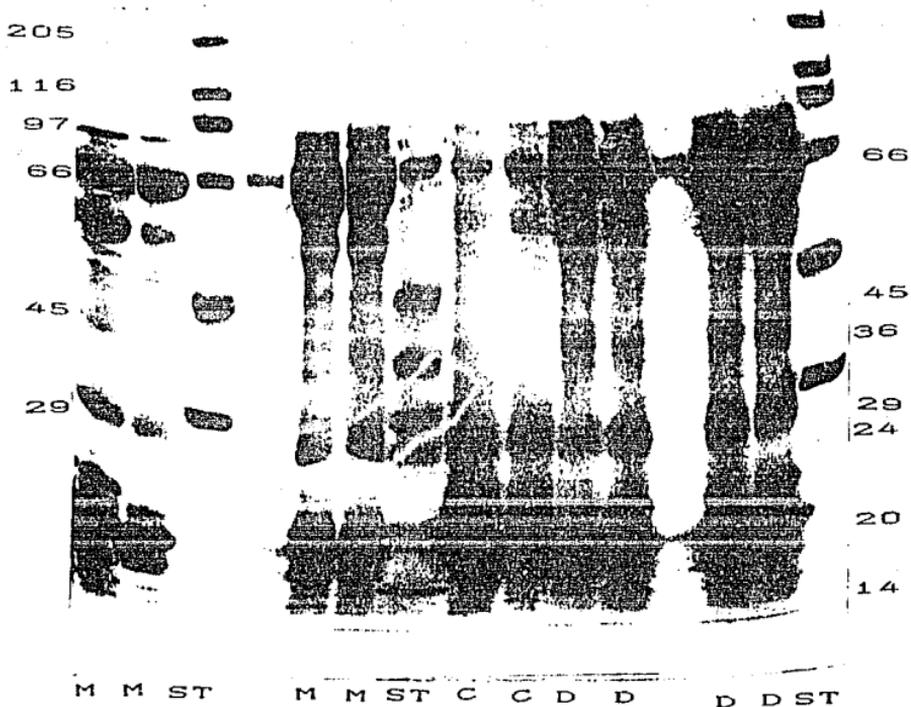


Figura 51. Análisis electroforético de la proteinuria de los modelos control, mercurio y dicromato. ST-estándar, D-dicromato, M-mercurio, C-control.

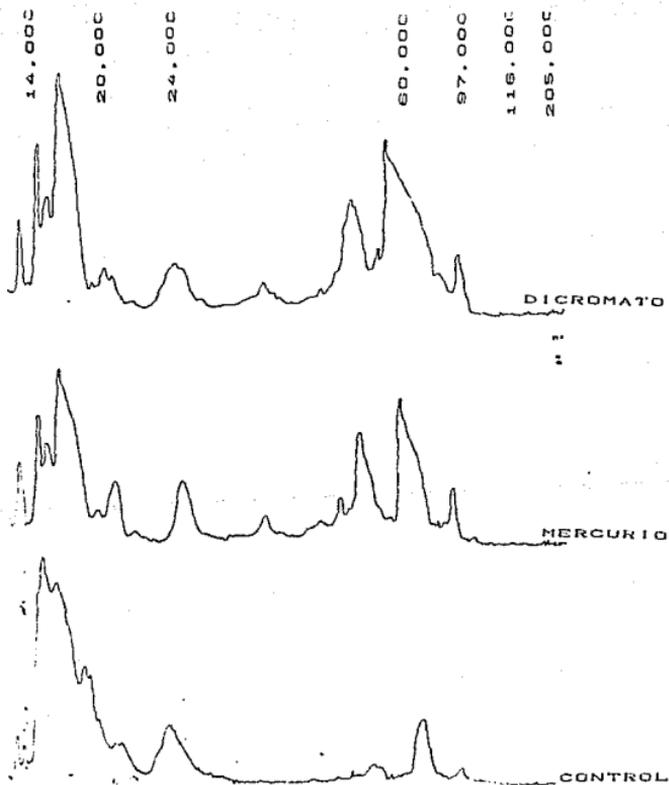


Figura 52. Densitometria que muestra una comparación de la composición proteica de la orina de ratas tratadas con mercurio y dicromato a las 48 h de la inyección.

VII. DISCUSION

Durante las últimas décadas ha existido un considerable avance en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos productores de proteinuria. Una gran variedad de mecanismos hemodinámicos o bioquímicos, juegan un papel que manifiesta la complejidad de los procesos que regulan la excreción urinaria de las proteínas.

Una observación interesante es que el patrón de excreción proteica varía cualitativa y cuantitativamente con el sitio y la severidad del daño renal, la enzimuria de alto peso molecular (APM) está asociada con un incremento de la permeabilidad glomerular y la de bajo peso molecular (BPM) con daño en la resorción tubular, un incremento en la de BPM (<70,000), como lisozima, ribonucleasa, amilasa, tripsinógeno, lipasa, pepsinógeno A, beta-2 microglobulina. Además existen enzimas urinarias importantes en el diagnóstico de la integridad del túbulo de acuerdo a su origen: Borde en cepillo: AAP, GGT, DAP, fosfatasa alcalina, trehalosa; Lisosomas: Beta-glucoronidasa, NAG, Beta-galactosidasa, fosfatasa ácida; Citosol: Lactato deshidrogenasa, leucina aminopeptidasa, ligandina, Beta-glucosidasa. Para poder localizar el daño renal se han desarrollado muchos protocolos para la identificación y cuantificación de las proteínas urinarias, en poblaciones con riesgo de daño renal (118). El riñón es especialmente vulnerable a daño tóxico por transportar y concentrar una variedad de sustancias en su parénquima, no es sorprendente que estos métodos han sido extensamente utilizados por toxicólogos en estudios experimentales diseñados para identificar los sitios y/o los mecanismos de acción de químicos o en estudios epidemiológicos en las relaciones dosis-efecto/dosis-respuesta de nefrotoxinas. El análisis urinario frecuentemente representa el único método práctico para monitorear poblaciones expuestas a químicos potencialmente nefrotóxicos. La proteinuria es así, una característica importante de las enfermedades renales, su análisis es clave para el diagnóstico y esto se realiza ya sea con pruebas específicas o con la separación por tamaño molecular (115).

En la IRA es importante establecer no solo un diagnóstico correcto sino también identificar un proceso de prevención y para eliminar la necesidad de procedimientos diagnósticos invasivos como una arteriografía o una biopsia renal (98).

En el presente trabajo se produjo el desarrollo de IRA por un proceso intrarrenal en el que se involucraron eventos tóxicos, que se caracterizaron por daño directo a las células epiteliales renales. El camino patogénico para el desarrollo de la IRA es el daño epitelial celular, y los componentes del borde en cepillo del túbulo proximal son altamente susceptibles a este daño. En estudios ampliamente documentados se han reportado los cambios que existen después de la administración de una sola dosis de cloruro de

mercurio y de dicromato de potasio (118) daño que está restringido principalmente a la porción contorneada del túbulo proximal, los resultados indican un patrón característico de enzimuria que varía dependiendo de las condiciones experimentales (cambiando la dosis de la nefrotoxina o el sexo de los animales utilizados) y lesiones histológicas como necrosis de los túbulos proximales, células despegadas de la membrana basal, gotas eosinofílicas en el citoplasma, infiltración intersticial, mitocondrias amorfas y vacuolización (118).

En condiciones normales la ECA se encuentra presente en la orina de humanos (119) derivada probablemente como resultado del intercambio de membranas de las células endoteliales por división proteolítica de su ancla peptídica o por la pérdida pasiva de la enzima unida a la membrana (18). De tal forma, que cuando existen enfermedades asociadas con daño al túbulo proximal como infecciones del tracto urinario superior (136), nefrolitiasis (136, 137), rechazo al trasplante renal (138) y diabetes melitus no dependiente de insulina (120), los valores normales de la enzima se incrementan con lo que se ha propuesto que la excreción de la ECA urinaria principalmente depende del daño tubular ya que cuando no existe alteración de la permeabilidad de la membrana basal glomerular, las células del túbulo proximal renal son la principal fuente de enzimas urinarias con un peso molecular mayor a 70,000 d. como es el caso de la ECA.

Aquí se reportan los cambios en la ECA producidos durante la IRA experimental en un estudio de 24 y 48 horas, después de una dosis de las nefrotoxinas cloruro de mercurio y de dicromato de potasio, que interaccionaron directamente con los componentes de membrana de las células de los túbulos proximales, y alteraron la integridad celular.

Después de 24 y 48 h de la administración de las nefrotoxinas, los resultados en este trabajo confirman que una dosis de las toxinas utilizadas produce cambios en el túbulo proximal renal, (lo que se corroboró con la electroforesis que mostró un patrón de proteinuria tubular) alteración que puede liberar la ECA, explicando así el incremento de la excreción de la ECA urinaria y la consecuente disminución de la misma en el tejido renal. Por lo tanto en estos modelos de IRA experimental la fuente de ECA urinaria es de los túbulos proximales renales, lo que está de acuerdo con los datos en pacientes que presentan daño tubular (120, 136-138) y apoyan la idea de que la excreción de ECA urinaria puede ser un marcador útil de daño temprano al túbulo renal. La determinación de la ECA es un indicador muy sensible de daño túbulo proximal, que detecta cambios antes que otras enzimas que comúnmente se utilizan como determinaciones diagnósticas, como la NAG (139) y la DAP (140) que se han utilizado como marcadores para monitorear cambios en el túbulo proximal de riñón de ratas dañado con nefrotoxinas. Con los trabajos de las enzimas NAG y DAP se ha observado que existe un incremento en la excreción de ambas en

modelos de nefrotoxicidad tubular. En esta investigación los resultados de la determinación de estas enzimas, presentaron un incremento hasta las 48 h de la inyección de las nefrotoxinas, a diferencia de la ECA que mostró cambios desde las 24 h. La utilidad del incremento en la excreción de la ECA como un marcador temprano se investigó, ya que es muy importante detectar el daño renal a tiempo, antes de que sea irreversible, esta advertencia temprana y sensible del incremento en la actividad de la ECA se presenta antes de que el daño sea detectado por métodos convencionales como microscopía de luz y pruebas de función renal, incluso con otras enzimas como la NAG y DAP.

Los hallazgos morfológicos encontrados, demuestran pérdida de la integridad celular en túbulo proximal renal, en los grupos tratados con las nefrotoxinas, no se observó daño a nivel glomerular, resultados que están de acuerdo con los datos presentados por Ellis y cols. (141) y Houser y cols. (142) que muestran que no hay ninguna anomalía estructural glomerular en modelos de daño tubular renal agudo con mercurio y ácido maleico, aunque el cloruro de mercurio se una transitoriamente a la membrana basal glomerular (30s-4min.) con una dosis alta (3mg/Kg). Es preferencialmente liberado y almacenado en el túbulo proximal cuando no existe una alteración glomerular. Las células tubulares renales son la fuente principal de enzimas urinarias, además los resultados de sus estudios sugieren que la albuminuria producida por las nefrotoxinas es un indicador muy sensible de daño tubular renal, observaciones que concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo con el incremento de albúmina que se presentó en los modelos experimentales.

Un dato de gran utilidad fue la evaluación del daño histológico la cual se realizó tomando como principal criterio la presencia o ausencia de vellosidades apicales, de vacuolización citoplásmica, edema intersticial, incremento del volumen celular y el grado de necrosis. A estas características se les asignó un valor numérico para poder visualizar de manera más objetiva el daño causado por la toxina; el establecimiento del criterio tomado para la designación de los valores correspondientes se basó en estudios realizados por Paller y cols. (135). Estos resultados concuerdan con los estudios de Gritzky y cols. (143) y Evan y cols. (144) quienes encontraron alteraciones ultraestructurales después de la exposición con cloruro de mercurio y cromato, como: 1) hinchamiento y pérdida de microvellosidades, 2) formación de vacuolas intracelulares de tamaño variado, 3) mitocondrias hinchadas y redondeadas, 4) núcleos picnóticos, 5) licuefacción citoplásmica y descamación. También Kirschbaum y cols. (145) proporcionaron evidencias experimentales de anomalías en los estudios funcionales, como una disminución en la filtración glomerular, transporte tubular de sales orgánicas y solutos, y además de alteraciones en células epiteliales como desgarramiento de la membrana del borde en cepillo de la superficie luminal de la células que provoca que las enzimas localizadas en este sitio sean

excretadas en exceso.

Venkatachalam y cols. (102) también sugieren que el borde en cepillo del túbulo proximal es más susceptible a daño que otros componentes de la célula epitelial, lo que produce cambios en la capacidad reabsortiva del túbulo proximal.

Los resultados de este estudio muestran que el incremento en la excreción de la ECA está asociado con el cambio en la integridad morfológica funcional y del túbulo contorneado proximal causado por las nefrotoxinas y que el incremento de esta enzima en orina puede ocurrir antes de que otros marcadores de daño aparezcan en la orina, apoyando la hipótesis de que la determinación de la actividad de la ECA puede ser un marcador útil de daño tubular.

CONCLUSIONES.

- La ECA urinaria aumenta con el daño tubular agudo.
- La disminución de la ECA en riñón explicar el incremento de la ECA urinaria por daño tubular y no glomerular.
- La determinación de la ECA es un indicador temprano de daño túbulo proximal muy sensible.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Vallotton M.B.: The renin angiotensin system. Trends Pharmacol. Sci. 8:69-74, 1987.
2. Skeggs L.T., Dorer F.E., Kahn J., Lentz K., Levin M.: The biochemistry of renin angiotensin system and its role in hypertension. Am. J. Med. 60: 737-748, 1976.
3. Ballerman B.J., Levenson D.J., Brenner B.M.: Renin, angiotensin kinins, prostaglandins and leukotriens. En: Brenner B.M. y Rector F.C. Jr: The Kidney. Tercera Edición W. B. Saunders Co. Philadelphia. pp. 261-300, 1986.
4. Skeggs L.T., Marsh W.H., Kahn J.R., Shumway N.P.: The existence of two forms of hypertensin. J. Exp. Med. 99:275-282, 1954.
5. Skeggs L.T., Marsh W.H., Kahn J.R., Shumway N.P.: The purification of hypertensin I. J. Exp. Med. 100:363-370, 1954.
6. Skeggs L.T., Kahn J.R., Shumway N.P.: The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. J. Exp. Med. 103:295-299, 1956.
7. Skeggs L.T., Kahn J.R., Shumway N.P.: The purification of hypertensin II. J. Exp. Med. 103:301-307, 1956.
8. Skeggs L.T., Lentz K.E., Kahn J.R., Shumway N.P., Woods K.P.: The amino acid sequence of hypertensin II. J. Exp. Med. 104:193-197, 1956.
9. Lentz K.E., Skeggs L.T., Woods K.P., Kahn J.R., Shumway N.P.: The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin. J. Exp. Med. 105:183-191, 1956.
10. International Union of Biochemistry, Enzyme Nomenclature. Academic Press Inc, N. Y. USA. p.606, 1978.
11. Soffer R.L.: Angiotensin-converting enzyme. En: Soffer R.L. ed. Biochemical regulation of blood pressure. New York: John Wiley & Sons, pp 153-164, 1981.
12. Sweet C.S., Blaine E.H.: Angiotensin-converting enzyme and renin inhibitors. En: Cardiovascular Pharmacology. New York: M. Antonaccio, Raven Press 119-154, 1984.
13. Bunning P., Riordan J.F.: The functional role of zinc in angiotensin-converting enzyme: implications of the enzyme mechanisms. J. Inorg. Biochem. 24:183-198, 1985.
14. Bunning P., Riordan J.F.: The role of zinc in angiotensin-

converting enzyme. *Isr. J. Chem.* 21:43-47, 1981.

15. Kleemann S.G., Keung W.M., Riordan J.F.: Metal binding to angiotensin-converting enzyme: implications for the metal binding site. *J. Inorg. Biochem.* 26:93-106, 1986.

16. Andrews P.: The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96:595-606, 1965.

17. Lanzillo J.J., Fanburg B.L.: The estimation and comparison of molecular weight of angiotensin I converting enzyme by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 439:125-132, 1976.

18. Das M., Soffer R.L.: Pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 250:6762-6768, 1975.

19. Lanzillo J.J., Stevens J., Dasarathy Y., Yostumoto H., Fanburg B.L.: Angiotensin-converting enzyme from human tissues. *J. Biol. Chem.* 260:14938-14944, 1985.

20. El-Dorry H.A., Bull H.G., Iwata K., Thornberry N.A., Cordes E.H.: Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 254:14128-14233, 1982.

21. Hubert C., Houot A. M., Corvol P., Soubrier F.: Structure of the angiotensin-converting enzyme gene. *J. Biol. Chem.* 23:15377-15383, 1991.

22. Bernatein K.E., Martin B.M., Bernatein E.A., Linton J., Striker L., Striker G.: The isolation of angiotensin-converting enzyme cDNA. *J. Biol. Chem.* 263:11021-11024, 1988.

23. Alhenc-Gelas F., Soubrier F., Hubert C., Allegrini J., Corvol P.: The peculiar characteristics of the amino acid sequence of ACE is determined by cDNA cloning of the human endothelial enzyme. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14(Supl. 4):S6-S9, 1989.

24. Ehlers M.R.W., Fox E.A., Strydom D.G., Riordan J.F.: Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial ACE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7741-7745, 1989.

25. Lattion A., Soubrier F., Allegrini F., Hubert C., Corvol P., Alhenc-Gelas F.: The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett* 252:99-104, 1989.

26. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., Johon M., Tregear G., Corvol P.: Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9386-9390, 1988.

27. Wei L., Alhenc-Gelas F., Soubrier F., Michaud A., Corvol P., Clauser E.: Expression and characterization of recombinant human angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 266:5540-5546, 1991.

28. Kumar R.S., Thekkumkara T.J., Sen G.C.: The mRNAs encoding the two angiotensin-converting enzyme isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation site. *J. Biol. Chem.* 266:3854-3862, 1991.

29. Sen G.C., Thekkumkara T.J., Kumar R.S.: Angiotensin-converting enzyme: Structural relationship of the testicular and the pulmonary forms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16(Suppl.4):S14-S18, 1991.

30. Langford K.G., Shai S.Y., Howarg T.E., Kovac M.J., Overbeek P.A., Bernstein K. E.: Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 266:15559-15562, 1991.

31. Bernstein K.E., Martin B.M., Edwards A.S., Bernstein E.A.: Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J. Biol. Chem.* 264:11945-11951, 1989.

32. Takada Y., Hiwada K., Kokubu T.: Isolation and characterization of angiotensin-converting enzyme from human kidney. *J. Biochem.* 90:1309-1319, 1981.

33. Bünning P., Holmquist B., Riordan J.F.: Functional residues at the active site of angiotensin converting enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83:1442-1449, 1978.

34. Fernley R.T.: Equine angiotensin-converting enzyme: a zinc metalloenzyme. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 4:267-281, 1977.

35. Harris R.B., Wilson I.B.: Glutamic acid is an active site of angiotensin I-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 258:1357-1362, 1983.

36. Soffer R.L.: Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 45:73-94, 1976.

37. Erdős E.G.: Angiotensin I converting enzyme. *Fed. Proc.* 36:1760-1765, 1977.

38. Patchett A.A., Cordeiro E.H.: The design and properties of N-carboxyalkyldipeptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Adv. Enzymol.* 57:1-84, 1985.

39. Erdős E.G.: Angiotensin I converting enzyme. *Circ. Res.* 36:247-255, 1975.

ESTA TESIS NO DEBE
SALAR DE LA BIBLIOTECA

40. Cushman D.W., Ondetti M.A.: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Prog. Med. Chem.* 17:42-104, 1980.
41. Elisseeva Y.E., Orekhovich V.N., Pavlikhina L.V., Alexeenko L.P.: Carboxycathepsin-a key regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure. *Clin. Chim. Acta* 31:413-419, 1971.
42. Yang H.Y.T., Erdös E.G., Levin Y.: Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin-converting enzyme) J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 177:291-300, 1971.
43. Angus C.W., Lee H.J., Wilson I.B.: Substrate specificity of hog plasma angiotensin-converting enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 309:169-174, 1973.
44. Krutzsch H.C.: Determination of polypeptide amino acid sequences from the carboxyl terminus using angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 19:5290-5296, 1980.
45. Beckner C.F., Caprioli R.M.: Proteolytic activity of dipeptidyl carboxypeptidase from human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:1290-1296, 1980.
46. Yokosawa H., Endo S., Ogura Y., Ishii S.: A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:735-742, 1983.
47. Cascieri M.A., Bull H.F., Mumford R.A., Patchett A.A., Thornberry N.A., Liang T.: Carboxy-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity *in vivo* by captopril and MK-422. *Mol. Pharmacol.* 25:287-293, 1984.
48. Skidgel R.A., Engelbrecht S., Johnson A.R., Erdös E.G.: Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5:769-776, 1984.
49. Thiele E.A., Strittmatter S.M., Snyder S.H.: Substance K and substance P as possible endogenous substrates of angiotensin converting enzyme in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:317-324, 1985.
50. Dubreuil P., Fulcrand P., Rodríguez M., Fulcrand H., Laur J., Martínez J.: Novel activity of angiotensin-converting enzyme: hydrolysis of cholecystokinin and gastrin analogues with release of amidated C-terminal dipeptide. *J. Biochem.* 282:125-130, 1989.
51. Moreno-Muñiz S.I.: Regulación intracelular de la secreción de renina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, 1989.

52. Ibarra-Rubio M.E.: Estudio comparativo de la actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4.15.1) en varias especies de mamíferos y en ratas bajo diferentes estados fisiológicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM, 1986.
53. Cushman D.W., Cheung H.S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637-1748, 1971.
54. Ferreira S.H., Bartelt D.C., Greene L.J.: Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9: 2583-2590.
55. Harris E.E., Patchett A.A., Tristram E.W., Wyvratt M.J. U.S. Patent 4,374,829 1983.
56. Ondetti M.A., Krapcho J. U.S. Patent 4,316,906, 1982.
57. Snyder R.A., Wintroub B.U.: Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des- Ieu -angiotensin I: A potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 871:1-5, 1986.
58. Shapiro R., Riordan J.F.: Activation of angiotensin-converting enzyme by monovalent anions. *Biochemistry* 22:110-117 1983.
59. Igit R., Erdos E.G., Yeh H.S.J., Sorrells K., Nakajima T.: Angiotensin I-converting enzyme of the lung. *Circ. Res. (suppl. 11)* 31:11-51, 1972.
60. Klausner R.J., Robinson C.J.G., Marinovic D.V., Erdos E.G.: Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I-converting enzyme, Kinase II) by serum albumin and its fragments. *Hypertension* 1:281-289, 1979.
61. Ikemoto F., Song G-B, Tominaga M., Yamamoto K.: Endogenous inhibitor of angiotensin enzyme in the rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:1093-1099, 1989.
62. Bunning P., Riordan J.F.: Activation of angiotensin-converting enzyme by monovalent anions. *Biochemistry* 22:110-117, 1983.
63. Piquilloud Y., Reinharz A., Roth M.: Studies on the angiotensin-converting enzyme with different substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 206:136-142, 1970.
64. Erdos E.G., Skidgel R.A.: Structure and functions of human angiotensin I converting enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 13:42-44, 1985.

65. Ryan J.W., Ryan U.S., Schultz D.R., Whitaker C., Chung A., Dorer F.E., Subcellular localization of pulmonary angiotensin converting enzyme (kininase II). *Biochem. J.* 146:497-499, 1975.
66. Caldwell P.R.B., Seegal B.C., Hsu K.C., Das M., Soffer R.L.: Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 191:1050-1051, 1976.
67. Wigger H.J., Stalcup S.A.: Distribution and development of angiotensin converting enzyme in the fetal and newborn rabbit. An immunofluorescence study. *Lab. Invest.* 38:581-585, 1978.
68. Defendini R., Zimmerman E.A., Weare J.A., Alhenc-Gelas F., Erdos E.G.: Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. *Neuroendocrinology* 37:32-40, 1983.
69. Lieberman J., Sastre A.: Angiotensin-converting enzyme activity in postmortem human tissues. *Lab. Invest.* 48:711-717, 1983.
70. Danilov S.M., Faerman A.I., Printseva O.Y., Martynov A.V. Sakharov I.Y., Trakht I.N.: Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 87:487-490, 1987.
71. Celio M.R., Inagami T.: Angiotensin II immunoreactivity coexists with renin in the juxtaglomerular granular cells of the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3897-3900, 1981.
72. Cushman D.W., Cheung H.S.: Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 250:261-265, 1971.
73. Harris P.J., Navar L.G., Plath D.W.: Evidence for angiotensin-stimulated proximal tubular fluid reabsorption in normotensive and hypertensive rats: effect of acute administration of captopril. *Clin Sci.* 66:541-544, 1984.
74. Mendelsohn F.A.O.: Evidence for the local occurrence of angiotensin II in rat kidney and its modulation by dietary sodium intake and converting enzyme blockade. *Clin. Sci.* 57:173-179, 1979.
75. Ward P.E., Sheridan M.A., Hammon K.J., Erdos E.G.: Angiotensin I converting enzyme (kininase II) of the brush border of human and swine intestine. *Biochem. Pharmacol.* 29: 1525-1529, 1980.
76. Crocker A.D., Munday K.A.: The effect of the renin- angiotensin system on mucosal water and sodium transfer in everted sacs of the rat jejunum. *J. Physiol.* 206:323-333, 1970.
77. Igic R.P., Robinson C.J.G., Erdos E.G.: Angiotensin I converting enzyme in the choroid plexus and in the retina. *En*

Buckley J.P. Ferrario C.M. eds. *Central actions of angiotensin and related hormones*. New York: Pergamon Press, 23-27, 1977.

78. Strittmatter S.M., Lo M.M.S., Javitch J.A., Snyder S.H.: Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with H-captopril: localization to a striatonigral pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1599-1603, 1984.

79. Rix E., Ganten D., Schull B., Unger T., Taugner R.: Converting-enzyme in the choroid plexus, brain and kidney: immunocytochemical and biochemical studies in rats. *Neurosc. Lett.* 22:125-130, 1981.

80. Yokoyama M., Hiwada K., Kokubu T., Takada M., Takeuchi M.: Angiotensin-converting enzyme in human prostate. *Clin. Chim. Acta* 100:253-258, 1980.

81. Yokoyama M., Takada Y., Iwata H., Ochi K., Takeuchi M., Hiwada K., Kokubu T.: Correlation between angiotensin-converting enzyme activity and histologic patterns in benign prostatic hypertrophy tissue. *J. Urol.* 127:368-370, 1982.

82. Strittmatter S.M., Theile E.A., De Souza E.B., Snyder S.H.: Angiotensin-converting enzyme in the testis and epididymis: differential development and pituitary regulation of isozymes. *Endocrinology* 117:1374-1379, 1985.

83. Johnson A.R., Skidgel R.A., Gafford J.T., Erdoz E.G.: Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxipeptidase, and neural endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides* 5:789-796, 1984.

84. Strittmatter S.M., Snyder S.H., Angiotensin-converting enzyme Immuno-histochemistry in rat brain and pituitary gland: correlation of isozyme type with cellular localization. *Neuroscience* 21:407-420, 1987.

85. Tani M., Mizuno K., Hashimoto S.: Demonstration and characterization of angiotensin-converting enzyme, in human pituitary tissue. *Life Sci.* 38:2277-2284, 1986.

86. Mendelsohn F.A.O., Quirion R., Saavedra J.M., Aguilera G., Catt K.J.: Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1575-1579, 1984.

87. Lang R.E., Unger T., Rascher W., Ganten D.: Brain angiotensin. Ed: Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH, Eds. *Handbook of psychopharmacology*. vol. 16. New York: Plenum Press, 307-361, 1983.

88. Aguilera G., Hyde C.L., Catt K.J.: Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology* 111:1045-1050, 1982.

89. Ramsay D.J., Keil L.C., Sharpe M.C., Shinsako J. Angiotensin II infusion increases vasopressin, ACTH, and 11-hydroxycorticosteroid secretion. *Am. J. Physiol.* 234:R66-R71, 1978.
90. Steele M.K., Negro-Vilar A., McCann S.M.: Effect of angiotensin II on *in vivo* and *in vitro* release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology* 109:893-899, 1981.
91. Yotsumoto H., Sato S., Shibuya M.: Localization of angiotensin converting enzyme (dipeptidyl carboxypeptidase) in swin sperm by immunofluorescence. *Life Sci.*, 35:1257-1261, 1984.
92. Brentjens J.R., Matsuo S., Andres G.A., Caldwell P.R.B., Zamboni L.: Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II) *Experientia* 42:399-402, 1986.
93. Pandey K.N., Misono K.S., Inagami T.: Evidence for intracellular formation of angiotensin-coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1337-1343, 1984.
94. Stritmatter S.M., De Souza E.B., Lynch D.R., Snyder S.H.: Angiotensin-converting enzyme localized in pituitary and adrenal glands by H-captopril autoradiography. *Endocrinology* 118:1690-1699, 1986.
95. Glosmann H., Baukal A.J., Catt K.L.: Properties of angiotensin II receptors in the bovine and rat adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 249:825-834, 1974.
96. Peach M.J., Bumpus F.M., Khairallah P.A.: Release of adrenal catecholamines by angiotensin I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176:366-376, 1971.
97. Studdy P.R., Lapwort R., Bird R.: Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance—a review. *J. Clin. Pathol.* 36:938-947, 1983.
98. Humes D., Weinberg M.: Toxic Nephropathies. En: Brenner B.M. y Rector F.C. eds. Saunder Co. The Kidney. Capitulo 34 Philadelphia P.A., 1986.
99. Passow H., Rothstein A., Clarkson T.W.: The general Pharmacology of heavy metals. *Pharmacol. Rev.* 13:185, 1961.
100. Rifkind R.J.: *In vitro* inhibition of Na-K and Mg ATPase by mono, di and trivalent cations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120:802-808, 1965.
101. Donohoe, J.F., Venkatachalam M.A., Bernard, D.B., Levinsky N.G.: Tubular leakage and obstruction after renal ischemia:

Structural functional correlations. *Kidney Int.* 13:208-216, 1978.

102. Venkatachalam M.A., Bernard D.B., Donohoe J.F., Levinsky, N.G.: Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, S3 segments. *Kidney Int.* 14:31-46, 1978.

103. Cadenas E., Boveris A.: Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycine-supplemented mitochondria. *Biochem. J.* 168:31-43, 1980.

104. Barret A.J.: Lysosomal enzymes. En Dingle J. T.: *Lysosomes*. John Wiley and Sons, Inc. New York, p. 46, 1969.

105. Maunsbach A.B.: Functions of lysosomes in kidney cells. En: Dingle J.T.: *Lysosomes*. John Wiley and Sons, Inc. New York, P. 115, 1969.

106. Mego J., Cain J.: An effect of cadmium on heterolysosome formation and function in mice. *Biochem. Pharmacol.* 24:1227-1239, 1975.

107. Lullman H., Lullman-Rauch R., Wassermann O.: Drug induced phospholipidosis. *CRC Crit. Rev. Toxicol* 4:185-190, 1975.

108. Gillette J.R., Mitchell J.R., Brodie B.B.: Biochemical basis for drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol.* 14:271-283, 1974.

109. Katz, A.M., Messineo, F.C.: Lipid membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium. *Circ. Res.* 48:1-8, 1981.

110. Patel, Y., Stewart J., Mathys, E., Venkatachalam M.A.: Renal cortical free fatty acid and 1,2 diglyceride in renal ischemic injury. *Clin. Res.* 30:541A-554A, 1982.

111. Flower, B.A., Kimmel C.A., Woods J.S., McConnell E.E., Grant L.D.: Chronic low level lead toxicity in the rat. III An integrated toxicological assesment with special reference to the kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56:59-67, 1980.

112. Humes H.D.: Regulation of intracellular calcium. *Sem. Nephrol.* 4:117-113, 1984.

113. Weinberg J.M.: Calcium as a mediator of renal tubule cell injury. *Sem. Nephrol.* 4:174-191, 1984.

114. Stierle H.E., Oser B., Boesken W.H.: Improved classification of proteinuria by semiautomated ultrathin SDS polyacrylamid gel electrophoresis. *Clin. Nephrol.* 33:168-173, 1990.

115. Lillehoj E.P., Poulik M.D.: Normal and abnormal aspects of

proteinuria. *Exp. Pathol.* 29:1-28, 1986.

116. Bernard A., Lauwerys R.: Proteinuria: Changes and mechanisms in toxic nephropathies. *Toxicology*. 21:373-405, 1991.

117. Jung K., Mattenheimer H., Burchard H.: Urinary enzymes in clinical experimental medicine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 325pp. 1992.

118. Bomhard E., Matuhm D., Vogel O., Marger H.: Determination of urinary glutathione S-transferase and lactate dehydrogenase for differentiation between proximal and distal nephron damage. *Arch. Toxicol.* 64:269-276, 1990.

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

120. Baggio B., Piccolli A., Favaro S., Antonello A., Bertaglia E., Borsatti A.: Urinary angiotensin-I- converting enzyme activity as a marker of tubulo-interstitial involvement in kidney diseases. *Contr. Nephrol.* 70:208-212, 1989.

121. Hosojima H., Miyauchi E., Morimoto S.: Urinary excretion of angiotensin-converting enzyme in NIDDM patients with nephropathy. *Diabetes Care* 12:580-582, 1989.

122. Pitotti A., Maurich V., Moneghini M., Vianello S.: HPLC method for evaluation of urinary angiotensin-converting enzyme: some examples of normal subjects and patients with renal transplantation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 4:677-683, 1986.

123. Arévalo A.E., Ibarra-Rubio M.E., Cruz C., Peña J.C., Pedraza-Chaverri J.: Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 191:175-184, 1990.

124. Pedraza-Chaverri J., Santana T., Arévalo A.E., Cruz C., González L., Tapia E., Peña J.C., Panduro A.: Angiotensin I-converting enzyme activity in rats with carbon tetrachloride induced acute renal failure. *Renal Failure.* 15:19-26, 1993.

125. Girolami J.P., Orfila C., Pecher C., Cabos-Boutot G., Bascands J.L., Moatti J.P., Adam A., Colle A.: Inverse relationship between renal and urinary kallikrein during chromate- induced acute renal failure in rat: urinary kallikrein excretion as a possible recovery index. *Biol Chem. Hopp-Seyler* 370:1305-1313, 1989.

126. Kleinman J.G., McNeil J.S., Schwartz J.H., Hamberger R.J., Flamenbaum W.: Effects of dithiothreitol on mercuric-chloride-and uranyl nitrate-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int.* 12:115-122, 1977.

127. Haagsma B.H., Pound A.W.: Mercuric chloride-induced tubulonecrosis in the rat kidney: The recovery phase. *J. Exp. Pathol.* 61:229-241, 1980.
128. Lowry O. A., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:267-275, 1951.
129. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680, 1970.
130. Horiuchi M., Fujimura K.I., Terashima T., Iso T.: Method for determination of angiotensin converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 233:123-130, 1982.
131. Okamura T., Miyazaki M., Inagami T., Toda N.: Vascular renin angiotensin system in two kidneys, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 8:560-565, 1986.
132. Rohrbach M.S.: Glycine-1-14C Hippuryl-1-Histidyl-1-Leucine: a substrate for radiochemical assay of angiotensin converting enzyme. *Anal. Biochem.* 272-276, 1978.
133. Skrha J., Perusicova J., Stolba P., Stibor V., Páv J.: Comparison of N-acetyl-B-glucosaminidase and albuminuria with clinical findings of microangiopathy in type I diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* 166:135-141, 1987.
134. Wellwood J.M., Price R.G., Ellis B.G., Thompson A.E.: A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl-B-Glucosaminidase in human urine *Clin. Chim. Acta* 69:85-91, 1976.
135. Nagatsu T., Hino M., Fuyamada H., Hayakawa T., Sakakibara S., Nagawa Y., Takemoto T.: New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal. Biochem.* 74:466-476, 1976.
136. Wolf G., Scherberich J.E., Nowack A., Stein O., Schoeppe W.: Urinary excretion of dipeptidyl aminopeptidase IV in patients with renal diseases. *Clin. Nephrol.* 33:136-142, 1990.
137. Paller M.S., Hoidal J.R., Ferris T.F.: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.* 74:1156-1164, 1984.
138. Baggio B., Favaro S., Cantaro S., Bertanzzo L., Frunzio A., Borsatti A.: Increased urine angiotensin converting enzyme activity in patients with upper urinary tract infection. *Clin. Chim. Acta* 109:211-218, 1981.
139. Hama T., Nagatsu T., Kohayash S., Azuma S., Miyachi T., Kumagai Y., Kato T.: Changes in form of dipeptidyl aminopeptidase

IV in patients with renal diseases. Clin. Chim. Acta 113:217-214, 1981.

140. Viau C. Bernard A., Ouled A., Lauwerys R.: Determination of rat B2-microglobulin in urine and serum. II: Application of its urinary measurement to selected nephrotoxicity models. J. Appl. Tox. 6:191-195, 1986.

141. Ellis E.N., Brouhard B.H., Lynch R.E., Dawson E.B., Tisdell R., Nichols M.M., Ramirez F.: Effects of hemodialysis and dimercaprol in acute dichromate poisoning. Clin. Toxicol. 19:249-258, 1982.

142. Houser M., Milner L.: Renal tubular protein handling in experimental renal disease. Nephron 58:461-465, 1991.

143. Gritz T.L., Trump B.F.: Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Am. J. Pathol. 52:1225-1278, 1968.

144. Evan A.P., Dail W.G.: The effects of chromate on the proximal tubules of the rat kidney, fine structural damage and lysozymuria. Lab. Invest. 30:704-715, 1974.

145. Kirschbaum B., Sprinkel M., Oken D.: Proximal tubule brush border alterations during the course of chromate nephropathy. Toxicol. Appl. Pharmacol. 58:19-30, 1981.