

27
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA
DE ANGIOTENSINA I EN LA INSUFICIENCIA
RENAL AGUDA INDUCIDA CON NITRATO
DE URANILO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MARIA DEL SOCORRO BLANCAS REVELES

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN

I INTRODUCCION

1. El sistema renina angiotensina (SRA)	1
1.1. Angiotensinógeno	2
1.2. Angiotensina	2
2. Aspectos históricos	3
3. Enzima convertidora de angiotensina I	5
3.1. Aspectos históricos	5
3.2. Ontogénesis en riñón	6
3.3. Clasificación	6
3.4. Localización y distribución	7
3.5. Propiedades fisicoquímicas	9
3.6. Propiedades catalíticas	10
3.7. Activación por aniones	10
3.8. Inhibición	11
4. Dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV)	12
5. N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG)	12
6. Insuficiencia renal aguda	13
6.1. Aspectos históricos	14
6.2. Necrosis tubular aguda	15
6.3. Necrosis tubular aguda en el modelo con nitrato de uranilo	16
6.4. Factores vasculares	19
6.5. Factores tubulares	20
6.6. Factores glomerulares	20
6.7. Recuperación en la necrosis tubular aguda (NTA)	20

II ANTECEDENTES

1. Proteinuria	21
2. Excreción normal de proteínas en la orina	22
2.1. Origen de las proteínas urinarias	23
2.2. Mecanismos de proteinuria	24
3. Distribución de enzimas y enzimas marcadoras de daño al túbulo proximal	24
4. ECA en suero	26
5. ECA renal y urinaria	27

III HIPOTESIS

IV OBJETIVO

V MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos	31
2. Equipo	31
3. Material de bioterio	32
4. Diseño experimental	32
5. Determinaciones analíticas	33
5.1. Determinación de proteínas	33
5.2. Determinación de sodio en orina por flamometría ..	34
5.3. Determinación de creatinina	35

5.4. Determinación de nitrógeno de urea	37
5.5. Determinación radioquímica de la actividad de la ECA	37
5.6. Dipeptidil aminopeptiasa IV	40
5.7. N-acetil-β-D-glucosaminidasa	44
5.8. Electroforesis de geles de SDS poliacrilamida	46
5.9. Técnica histológica	49
5.10. Análisis estadístico	49
VI RESULTADOS	50
VII DISCUSION	65
VIII CONCLUSIONES	69
IX REFERENCIAS	70

RESUMEN

Con la finalidad de conocer la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) tisular, sérica y urinaria en la insuficiencia renal aguda, en este trabajo se utilizaron 20 ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de 200 a 250 g de peso. A diez ratas se les indujo insuficiencia renal aguda con una solución de nitrato de uranilo (NU) en una dosis de 15 mg/Kg y a las otras diez se les inyectó solución salina, por vía subcutánea. Además, se midieron en orina otras dos enzimas que se han propuesto como marcadores de daño al túbulo proximal: la dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP) y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).

Las ratas se sacrificaron por decapitación cinco días después de la inyección del NU; se recolectó el suero y se tomó una porción de los siguientes tejidos: riñón, corazón, intestino delgado, testículo, aorta, cerebro, hígado, pulmón y glándulas suprarrenales. La orina se almacenó a -70°C y posteriormente se le midió creatinina, sodio, proteínas totales y la actividad de la ECA, de la DAP IV y de la NAG. En suero se midió: creatinina, urea, proteínas totales y ECA. La función renal se midió por medio de las determinaciones de urea y creatinina en suero, de la relación creatinina orina/creatinina suero (Cr O/Cr S), de la depuración de creatinina: $\text{Dep Cr} = \text{Cr O}(\text{mg/dl}) / \text{Cr S}(\text{mg/dl}) \times \text{flujo urinario}(\text{ml/min})$ y del índice de insuficiencia renal (IIR):

$$\text{IIR} = [\text{Na en orina (mEq/l)}] / [(\text{Cr O (mg/dl)} / \text{Cr S (mg/dl)})]$$

En las ratas inyectadas con NU: a) se observó pérdida de peso el 4º y 5º día, b) el volumen urinario aumentó progresivamente a partir del primer día, c) los niveles séricos de urea y creatinina se incrementaron, d) la depuración de creatinina y la relación CrO/CrS disminuyeron marcadamente, e) el IIR aumentó significativamente, f) la proteinuria se presentó desde el primer día de la aplicación del NU alcanzando un máximo el tercer día, g) las proteínas en suero no mostraron diferencias, h) la actividad de la ECA urinaria se incrementó a partir del primer día aumentando paulatinamente hasta el 5º día, i) la actividad de la ECA en suero aumentó, j) los tejidos que mostraron un aumento en la actividad de la ECA fueron los siguientes: pulmón, intestino y glándulas adrenales, mientras que permaneció sin cambio en testículo, cerebro, aorta, riñón, hígado y corazón. El aumento en la ECA sérica puede ser consecuencia del aumento de la ECA en algunos tejidos y su posterior liberación a la circulación.

Estas ratas mostraron evidencias funcionales y estructurales de IRA, así como existen evidencias funcionales de daño al túbulo proximal como es el aumento en la excreción urinaria de las enzimas NAG y DAP IV. La NAG aumentó en orina, con un máximo el día 2 y regresó a valores basales el día 5, mientras que la DAP IV aumentó desde el primer día y alcanzó un máximo el día 4. Analizando la orina en geles de poliacrilamida-SDS, se detectó que la albúmina es la proteína plasmática que se pierde más

abundantemente en este modelo experimental. Además no se observó aumento claro en la excreción de proteínas de alto peso molecular

Estos datos sugieren que el aumento de la ECA en la orina de estos animales es consecuencia del daño producido por el nitrato de uranilo al túbulo proximal y a su vez confirman las observaciones hechas en pacientes y sugieren que la ECA urinaria puede ser un buen marcador de daño al túbulo proximal.

INTRODUCCION

1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA), es un sistema hormonal importante que juega un papel central en el balance de líquidos, electrólitos y de la presión arterial. Se encuentra alterado de manera importante en algunos tipos de hipertensión, lo cual desde el punto de vista clínico, ha estimulado el interés por conocer la estructura, localización, regulación de síntesis, secreción y mecanismo de acción de cada uno de los componentes (1). El SRA se activa por la liberación de renina de las células especializadas del aparato yuxtaglomerular de las nefronas, la cual actúa en el plasma sobre el sustrato angiotensinógeno, que se sintetiza principalmente en el hígado. El incremento de renina en plasma conlleva a dos procesos catalíticos independientes a) la ruptura catalizada por la renina para producir al decapeptido angiotensina I (AI) del segmento N-terminal de la proteína plasmática angiotensinógeno, el cual es determinante para la formación de la angiotensina II (AII) (la renina es una enzima bastante específica) y b) posteriormente la hidrólisis del péptido His-Leu del C-terminal de la AI para formar al octapéptido biológicamente activo AII, reacción catalizada por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) (2).

La concentración de angiotensinógeno en sangre es generalmente constante y, de hecho, es la cantidad de renina circulante la limitante principal en la producción de AII in vivo. La secreción de renina es estimulada por la reducción

aguda del volumen sanguíneo circulante secundario a: hemorragias, diuresis, reducciones en el consumo de sal, por estados de hipovolemia o insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática y síndrome nefrótico.

La magnitud del estímulo de la renina es dependiente de la pérdida de volumen. En sujetos con alto consumo de sal la actividad de la renina en plasma se suprime (3).

1.1) ANGIOTENSINOGENO

El angiotensinógeno plasmático es una glicoproteína que contiene en su extremo amino al decapeptido angiotensina I el cual es liberado por la acción proteolítica de la enzima renina y tiene un peso molecular de 52 000 a 60 000 Da. El principal sitio de síntesis del angiotensinógeno es el hígado, lo cual puede demostrarse por la cantidad de ARNm presente en este tejido. Se ha encontrado que el gen de angiotensinógeno también se expresa en el sistema nervioso central (SNC), riñón, corazón, tejido vascular y glándulas adrenales (3).

1.2) ANGIOTENSINA II

Los efectos biológicos de la AII liberada a la circulación son los siguientes: a) es un vasoconstrictor periférico potente, b) actúa en la glándula adrenal para incrementar la tasa de síntesis de la aldosterona (hormona esteroide que influye en la retención de sodio), c) actúa directamente en el riñón para estimular la reabsorción de sodio (2). La regulación de los fluidos extracelulares y la reducción en la pérdida renal de sodio en el ducto colector cortical, así como el aumento directo de la absorción de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en el túbulo

proximal y el incremento de actividad de la aldosterona en el túbulo distal, trae como resultado cambios en la hemodinámica renal. Todos estos efectos incrementan el volumen en los fluidos extracelulares (3).

2. ASPECTOS HISTORICOS

La renina es la enzima iniciadora y limitante de la actividad del sistema. Fue descubierta por Tigerstedt y Bergman en 1898; estos primeros investigadores habían mostrado que los extractos salinos del riñón de conejo inyectados a conejos, producía una intensa pero transitoria elevación de la presión sanguínea. En vista de que había una gran cantidad de renina en el tejido renal, parecería lógico esperar que fuera el agente causal de la hipertensión (4).

A pesar de su descubrimiento temprano, la importancia de la renina no fue apreciada sino hasta después del trabajo realizado por Harry Goldblatt a principios de 1930. En aquel tiempo se sabía que los pacientes afectados con hipertensión casi siempre tenían las arterias intrarrenales dilatadas así como esclerosis arteriolar. Goldblatt supuso que el disturbio de la hemodinámica intrarrenal resultaba por enfermedad vascular que podía ser el estímulo a la hipertensión. Para probar esta teoría, Goldblatt indujo hipertensión a animales de laboratorio con su, ahora famoso, experimento de la interrupción parcial del flujo sanguíneo renal, demostró que la hipertensión tenía bases humorales y probó que era de origen renal. Con esta interrupción, él produjo tres formas de hipertensión que en su conjunto son semejantes a la que se genera en los humanos (4).

Este grupo de trabajo demostró que la hipertensión arterial producida con su método no involucraba al sistema nervioso. Se encontró que sin la corteza adrenal, la hipertensión experimental no podía producirse a menos que se diera una terapia de sustitución. Finalmente, Goldblatt y col. mostraron que la hipertensión era abolida si las venas renales eran ligadas, el animal llegaba a una presión normal pero eventualmente moría por uremia (4).

Una observación particular fue hecha por Friedman en 1938, quien encontró que la renina no causaba constricción en la cola de perro aislada y perfundida con solución tiroide. Después de dos años se demostró, por trabajos independientes, que la renina no era per se una sustancia vasoconstrictora (4). Page y Helmer en E.U.A y Braun-Menéndez y su grupo en Argentina, en 1940, descubrieron que la renina actuaba sobre una sustancia presente en el plasma para producir otra sustancia, estable al calor, y dializable que tenía ambas propiedades vasoconstrictoras y un corto pero poderoso efecto presor. Braun-Menéndez nombró a este nuevo péptido vasoconstrictor "hipertensina". El sustrato del cual se formaba fue llamado hipertensinógeno, mientras que las enzimas de riñón y plasma que lo metabolizaban eran las hipertensinasas. Page y Helmer, por su parte, llamaron a su péptido vasoconstrictor "angiotonina", mientras que el sustrato fue primeramente llamado activador de renina y después sustrato de renina. Años después, cuando se supo que eran exactamente la misma sustancia, ambos grupos de trabajo acordaron, en una reunión en 1961 en la Universidad de Michigan, el término híbrido angiotensina (4).

3 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

3.1 ASPECTOS HISTORICOS

En sus estudios culminantes Skeggs y sus colaboradores (revisado en 5-7) demostraron la existencia de dos formas de angiotensina y descubrieron una enzima en el plasma de caballo capaz de convertir la AI en AII, después llamada enzima convertidora de angiotensina I (5-7). Esos primeros estudios establecieron la importancia de la ECA para generar la AII, el efector final del SRA (5,8), y dilucidaron varias de las propiedades más importantes de la ECA: su dependencia por cloro, su naturaleza como metaloproteína, y su especificidad para la remoción de unidades de dipéptidos intactas del C-terminal de sustratos peptídicos (5). Independientemente de aquellos hallazgos, otros investigadores extrajeron una enzima de una fracción particular del riñón la cual inactivó la bradisinina por la liberación de un dipéptido C-terminal, y tal enzima fue llamada cininasa II. Esta se separó de plasma sanguíneo humano por cromatografía, y su efecto era liberar la arginina C-terminal de cininas. La identidad de la cininasa II con la ECA se demostró después, gracias a la purificación parcial de la enzima y al descubrimiento de que rompe una gran variedad de péptidos incluyendo algunos estructuralmente no relacionados con la bradisinina o angiotensina I (6). Entonces Ng y Vane propusieron que la misma enzima es responsable de la conversión de AI a AII y de la inactivación de la bradisinina (5,6,9). El sitio de metabolismo de los dos péptidos, cuando pasa a través de la circulación pulmonar, es el endotelio vascular (6).

3.2 ONTOGENESIS EN RIÑÓN

La distribución de la ECA en el riñón ha sido analizada por inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos, y por la determinación de la actividad de esta enzima en algunos segmentos a lo largo de las nefronas microdisecadas (10). La enzima está presente en la vasculatura del riñón y en el túbulo proximal de las nefronas. En el humano, la ECA aparece en esos sitios durante las primeras semanas de desarrollo fetal, antes de las 20 semanas de gestación. La ECA inmunoactiva ya es detectable en las células epiteliales glomerulares tan rápido como la capilaridad invade la hendidura inferior del cuerpo en forma de S, el cual llegará a formar el glomérulo (10). También se encuentra en arteriolas eferentes. Simultáneamente, la ECA aparece en el túbulo proximal diferenciado, en la membrana basolateral de las células epiteliales y en el polo apical, en la primera etapa de diferenciación del borde en cepillo. La ECA es por lo tanto un primer marcador de diferenciación vascular epitelial o endotelial, y después en la diferenciación del borde en cepillo y en los capilares peritubulares y glomerulares. La renina también es detectable en una primera etapa en los vasos sanguíneos del riñón y en el aparato yuxtaglomerular del feto así como también lo es el angiotensinógeno circulante en la sangre fetal (10).

3.3 CLASIFICACION

La ECA, a la cual también se le conoce con el nombre de cininasa II, está clasificada según la "Enzyme Comission" como sigue: tiene un 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-dipeptido-hidrolasa ("15"), y debido a que corta el extremo C-terminal de sus sustratos se le considera una dipeptidil carboxipeptidasa: y su número progresivo es el ("1") (10a).

3.4 LOCALIZACION Y DISTRIBUCION

La ECA está virtualmente presente en todos los órganos de los mamíferos y en los fluidos corporales (5). Sin embargo, no se conoce el origen de la ECA circulante y su sitio de degradación (11). La ECA está unida a la membrana celular del endotelio y del epitelio así como de células neuroepiteliales (Fig.1) (5,11,12). Evidencias recientes sugieren que un cuarto tipo de células puede ser agregado a la lista: las glándulas endocrinas, dentro de las cuales se encuentran las gónadas. La ECA testicular está bajo control hormonal. La enzima está ausente de los testículos de ratas inmaduras (aunque está presente en el pulmón) y se desarrolla en la pubertad. Otras glándulas donde se ha encontrado la presencia de la ECA son las glándulas adrenales (5) y la pituitaria (13). Algunas células epiteliales son mucho más ricas en ECA que las células endoteliales. El riñón humano contiene de 5 a 6 veces más ECA por peso húmedo que el pulmón (6). Los riñones de otros animales son muy ricos en ECA con excepción de la rata (6). En el riñón, la ECA se localiza principalmente en la superficie del borde en cepillo del túbulo proximal (5,6,12-15).

La ECA soluble se ha encontrado en plasma seminal (6,13),

en homogenados de próstata y cerca del epidídimo, en fluidos corporales tales como linfa, plasma, líquido amniótico y líquido cerebroespinal (6).

Las estructuras microvellosas a través del cuerpo también son ricas en ECA, como el borde en cepillo del túbulo proximal, las microvellosidades del intestino y de la placenta (6-9). En el plexo coroideo, donde la ECA está en contacto con el líquido cerebroespinal y en el órgano subfornical, la enzima puede facilitar la producción de AII donde tiene un efecto dipsogénico potente (6). Sin embargo, la ECA aparece en otras estructuras del cerebro tales como el eje pallido-nigral (13) y en algunos ganglios vasculares (6).

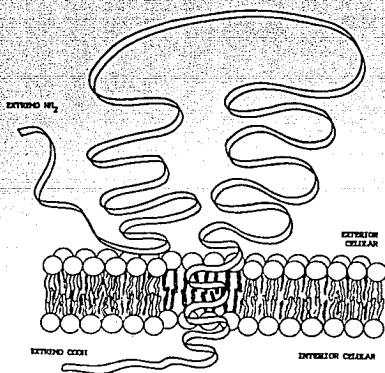


Fig. 1. Localización de la ECA en la membrana celular.

3.5 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Las evidencias sugieren que la ECA entre los mamíferos es fundamentalmente similar y es una glicoproteína que contiene un átomo gramo de zinc por mol de proteína (5). Además, dentro de especies particulares la estructura polipeptídica es similar, si no idéntica, en varios loci anatómicos con excepción del testículo y posiblemente el cerebro (5). En la ECA, el zinc no está tan estrechamente unido como en otras metalopeptidasas, ya que se disocia rápidamente a un pH por debajo de 7, y no parece contribuir a la estabilidad de la proteína (5). La ECA es estable a 4°C por diez días, pero se inactiva por descongelamientos y congelamientos repetidos (16).

La determinación del peso molecular de la ECA es complicado por su alto contenido de carbohidratos, su tendencia a agregarse y por su gran tamaño (5). El peso molecular de la ECA de varios tejidos humanos es de 140 000 - 150 000 Da (12). La enzima testicular es aproximadamente 30 % más pequeña que la del pulmón, y su peso molecular se ha estimado en 100 000 y 96 000 Da en conejos y 90 000 Da en humano (5). Como la enzima está unida a la superficie externa de la membrana celular, para purificarla primero debe solubilizarse con detergente o liberarse de la membrana por ruptura del puente peptídico con tripsina (12).

La ECA es una glicoproteína que contiene de 8 a 26 % de carbohidratos (7,12). Alrededor de 188 residuos de azúcar están presentes por molécula de proteína. Presenta: fucosa, manosa, N-acetilglucosamina y galactosa en una relación de 1.6:3.0:4.5:4.41 (12). El tejido de pulmón humano contiene alrededor de 20 % más de residuos de ácido siálico que la enzima que se aísla de tejido

renal (12), contribuyendo, en parte, al punto isoeléctrico (pI) ácido, el cual está entre 4.3 y 5.2. Las diferencias en pI se deben probablemente a las variaciones en el grado de sialización (5).

La fracción de residuos hidrofóbicos es de 44 %, mientras que la relación de residuos polares a residuos no polares es de 1.2 a 1.4, sugiriendo un grado moderadamente elevado de hidrofobicidad (5). Las reacciones de modificaciones químicas han establecido la existencia de cuatro residuos funcionales en, o cercanos al sitio activo: tirosina, arginina, ácido glutámico y lisina (5).

3.6 PROPIEDADES CATALITICAS

La ECA es un tipo inusual de exopeptidasa ya que: a) rompe dipéptidos secuencialmente a partir del carboxilo terminal de sustratos peptídicos y b) muestra actividad hacia un amplio rango de sustratos. Sin embargo, se ha demostrado (5) que tales sustratos deben tener ciertos requerimientos los cuales incluyen: a) un carboxilo terminal que no sea ácido glutámico (7), b) ausencia de un ácido dicarboxílico y c) ausencia de un residuo de prolina en la penúltima posición (5).

3.7 ACTIVACION POR ANIONES

Quizá la propiedad más interesante de la ECA es la dependencia de su mecanismo catalítico de la activación por iones, lo cual se observó desde el descubrimiento original de la enzima. Pronto llegó a ser claro que sus requerimientos iónicos eran complejos y dependían de la naturaleza del anión y del sustrato, así como del pH (5,7). Por ejemplo, la potencia

relativa de activación por aniones monovalentes es: $\text{Cl} > \text{NO}_3 > \text{Br} > \text{F} > \text{I}$ para la hidrólisis de 2-Phe-His-Leu y $\text{Cl} > \text{Br} > \text{F} > \text{NO}_3 > \text{CH}_3\text{COO}$ para la hidrólisis de Fa-Phe-Gly-Gly (5). La efectividad del bromo es de 52 %, la del nitrato 14 %, la del yodo es de 10 % y la del acetato es de 2%, lo que indica que existen estrictos requerimientos asociados con la activación (5). Incluso más compleja es la dependencia del sustrato para la activación por un anión. Se ha encontrado que la AI y tripéptidos como el Hip-His-Leu son absolutamente dependientes de cloro para su hidrólisis, y que la bradicinina es hidrolizada en un 37 % en ausencia de cloro(5).

3.8 INHIBICION

La ECA es una hidrolasa que contiene zinc en su centro activo (Fig. 2) y es inhibida por moléculas quelantes (17,18), componentes tiolados y sales de metales pesados, de los que se piensa ejercen su efecto por la interacción o intercambio con el Zn^{+2} de la enzima, produciendo la inactivación de la metaloproteína (17). Los inhibidores quelantes más efectivos son EDTA, o-fenantroleína, 2-mercapto-etanol y ditiotreitól (13). Un inhibidor oralmente efectivo de la ECA es el captopril (D-2-metil-3-mercaptopropanoil-L-prolina) (13). Fue diseñado, en parte, para tomar la función mercapto junto al átomo de zinc situado en el sitio catalítico (ocupando los subsitios S'_1 y S'_2) (13). La actividad puede restaurarse por la adición de varios iones metálicos divalentes, aunque la extensión de la recuperación parece ser dependiente del metal y del sustrato. Así, para Hip-His-Leu, el orden es Co^{+2} (160 %) > Mn^{+2} (40%), mientras que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} o Fe^{2+} son incapaces de

restaurar la actividad (5).

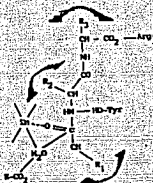


Fig. 2. Sitio activo de la enzima convertidora de angiotensina I.

4. DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA IV (DAP IV)

La dipeptidil peptidasa IV dipeptidil hidrolasa, (E.C. 3.4.14.5) (19) es una glicoproteína con un peso molecular de 220 000 Da (20), es una enzima unida a la membrana celular de varios tejidos de mamíferos y también está presente en bacterias como Flavobacterium meningosepticum y Streptococcus mitis (19). La enzima rompe dipéptidos N-terminales de polipéptidos con prolina o alanina en la segunda posición de la secuencia de aminoácidos (6). Los componentes del borde en cepillo del túbulo proximal son susceptibles a daños agudos crónicos. Por lo tanto, la determinación de enzimas y proteínas unidas a la membrana se han visto como un primer indicador de daño en el borde en cepillo del túbulo proximal, y esta es una de esas enzimas (20).

5. N-ACETIL-β-D-GLUCOSAMINIDASA (NAG)

Es una β-glucosaminidasa, la cual cataliza la hidrólisis de N-acetil-D-glucosaminopirinoside de enlaces β-glicosídicos; se descubrió en emulsiones de almendra por Helferich e Iloff (20a).

La N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) tiene un peso

molecular de 150-160 kDa y se encuentra en los lisosomas de muchos tejidos así como en los fluidos corporales (20a, 20b). Es particularmente abundante en órganos donde se esperan altos niveles de secreción de mucosas, por ejemplo el testículo y el bazo (20a).

Se ha encontrado que la actividad de la NAG de extractos de tejidos humanos puede ser atribuida a dos isoenzimas, llamadas A y B (20a, 20c) las cuales pueden ser detectadas por electroforesis, cromatografía de intercambio aniónico o por su estabilidad al calor (20c). Los puntos isoeléctricos de la forma A y B son de 5.4 y 7.9 respectivamente. Ambas isoenzimas están caracterizadas por la estructura de sus subunidades. La forma A consta de tres cadenas polipeptídicas α , β_a , β_b , mientras que la forma B consta de dos unidades β_a y β_b . Se han descrito, además, dos tipos de NAG A. La forma A tisular está presente en hígado, riñón y bazo. La mayor cantidad de NAG está presente, tanto la forma A como la B, en la corteza renal. La tasa de excreción de NAG en los humanos es directamente proporcional a la tasa liberación del epitelio tubular (20a).

La orina de humanos sanos contiene ambas formas. La forma B generalmente comprende del 15 al 25 % de la actividad total de la NAG. Otros investigadores han detectado la forma A en la orina de humanos sanos, mientras que la actividad de la NAG B aparece solo como consecuencia de daño renal (20a,20c).

6. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome que puede definirse como un deterioro rápido de la función renal,

resultando en la acumulación de productos nitrogenados de desecho (3). En bioquímica se utiliza el término azotemia que implica únicamente la acumulación de productos nitrogenados en la sangre. Se caracteriza químicamente por la elevada concentración de urea, creatinina, ácido urico, y otros componentes que normalmente se excretan en la orina (21). El término azotemia en sí mismo no connota síntoma de enfermedad, sin embargo, el término uremia, como se usa hoy en día, indica que la enfermedad clínica existe por el daño renal. Los pacientes con uremia pueden mostrar anorexia, náuseas, vómito, diarrea, prurito, disfunción en el sistema nervioso central (SNC), inflamación de nervios craneales y periféricos, pérdida de la función renal, desórdenes hemorrágicos, pericarditis, anemia y hemólisis (21).

6.1. ASPECTOS HISTORICOS

En 1915 Oliver (22) describió cambios específicos por medio de la microscopía de luz después de aplicar nitrato de uranilo (6 a 96 h). Los cambios que se observaron fueron: vacuolación y cambios mitocondriales de las células de los túbulos proximales los cuales fueron más graves en la porción distal del túbulo proximal y de escasos a ausentes en la primera y media porción (22). Se examinaron las estructuras glomerulares en detalle y no se encontraron anomalías en la membrana basal glomerular (23). La porción recta del túbulo proximal mostró necrosis casi uniformemente. En estudios de microdissección realizados por Oliver, MacDowell y Tracy (24) en conejo, las lesiones más severas con nitrato de uranilo se encontraron en la última porción del túbulo proximal y también en la pars recta (24).

En estudios realizados en 1975 por Stein *et al.* (25) en el modelo de nefrotoxicidad con nitrato de uranilo en perro en una dosis de 5 a 10 mg/Kg, se mostró que las lesiones observadas para ambas dosis eran cualitativamente similares agravándose con la dosis mayor. El glomérulo no presentaba alteraciones. La necrosis tubular fue la lesión más importante. La lesión principal involucraba la pars recta del túbulo proximal caracterizándose por hinchazón, necrosis y desprendimiento del epitelio plasmático en el lumen tubular. El túbulo contorneado proximal principalmente mostró cambios degenerativos, ligera hinchazón y granulación del citoplasma (25). Los resultados también indican que existe oliguria marcada y azotemia después de 48 h de la administración (25). En 1975 Blantz (23) en sus estudios con nitrato de uranilo para inducir la IRA utilizó una dosis de 25 mg/Kg en ratas, las cuales murieron el 5º día pero parecían completamente normales hasta el 4º día cuando se desarrolló la oliguria. La orina estaba libre de proteínas el primer día pero se desarrolló la proteinuria y glicosuria en bajo grado el segundo y el tercer día. La poliuria se desarrolló dentro de las primeras 24 h y después del primer día fue estable, los volúmenes de orina declinaron uniformemente al tiempo de morir. Las ratas también perdieron peso. El nitrato de uranilo produjo un síndrome caracterizado inicialmente por poliuria profunda y muerte dentro del 5º día.

6.2. NECROSIS TUBULAR AGUDA

La necrosis tubular aguda (NTA), por definición, incluye todas las formas de supresión urinaria aguda en las cuales el

daño tubular agudo es la base principal para el daño renal (3), y excluye otras causas de insuficiencia renal tales como azotemia prerrenal, nefritis intersticial, glomerulonefritis, coagulación intravascular diseminada con necrosis cortical renal, enfermedad orgánica vascular y obstrucción del tracto urinario bajo (3,26). Parece que la isquemia renal prolongada es el factor patogénico más común en la NTA (27). Otro factor causante comúnmente encontrado en pacientes que desarrollan NTA, es la exposición directa a nefrotoxinas, a solventes orgánicos, a glicol y metales pesados. Sin embargo, los agentes antimicrobianos aminoglicosidos son los inductores más frecuentes de nefrotoxicidad directa (26). Se pueden subrayar cuatro factores estructurales en la NTA: 1) células túbulo epiteliales hinchadas y necróticas, 2) obstrucción de segmentos distales de las nefronas por fusión, 3) anormalidades de la pared glomerular, lo que puede resultar en decremento de la filtración glomerular, y 4) contracción de arterias intrarrenales y arteriolas dando por resultado un decremento en el flujo sanguíneo glomerular (26).

No es inmediatamente reversible, cuando los disturbios iniciales se han eliminado, la típica tardanza de una semana sugiere daño renal intrínseco reversible esperando la regeneración celular para la recuperación funcional (3).

6.3. NECROSIS TUBULAR AGUDA EN EL MODELO CON NITRATO DE URANILO

El nitrato de uranilo (NU) en dosis de 5 a 20 mg/Kg de peso inyectado intravenosamente, produce insuficiencia renal aguda (IRA). El NU ejerce una interacción directa en la superficie de las membranas celulares epiteliales renales. El complejo

catiónico del uranio se une de modo reversible con grupos fosforilo, carboxilo y sulfhidrilo de la superficie membranosa. El NU no penetra fácilmente en las células (18,27), sin embargo, existe interacción importante pero reversible aún con períodos prolongados de exposición (18). La interacción entre las sales de uranio y los componentes celulares no está bien caracterizada como en el caso del cloruro de mercurio, especialmente para células de mamíferos (27). El NU inhibe el transporte de ciertos carbohidratos y aminoácidos en levaduras (27). También inhibe el transporte de hexosas y iones a través de la mucosa intestinal y el transporte de sodio en la vejiga urinaria de las palomas (27).

En el riñón de los mamíferos, el uranio inhibe la reabsorción de glucosa y aminoácidos después de 20 min de la administración (27).

El NU induce IRA en ratas y su efecto puede prevenirse o revertirse por la administración de ditiotreitól (DTT) (26). Los principales cambios morfológicos en las células del túbulo proximal son: turgencia, vacuolación y degeneración mitocondrial (26). Dentro de las primeras 15 h, las células epiteliales glomerulares son anormales, presentando deformación e hinchazón, pérdida de la separación entre los pedicelos y estructuras vellosas como nudos (18). A las 48 horas hay necrosis extensa en la porción recta del túbulo proximal extendiéndose frecuentemente a las porciones contorneadas (26), (en la Fig. 3 se muestra la ubicación de la nefrona en el riñón). En el túbulo proximal existen muchas fusiones. El tejido lesionado del epitelio tubular muestra la membrana basal desnuda, con lesiones severas de tipo isquémico, lo que se puede correlacionar

con una disminución en la filtración glomerular (26).

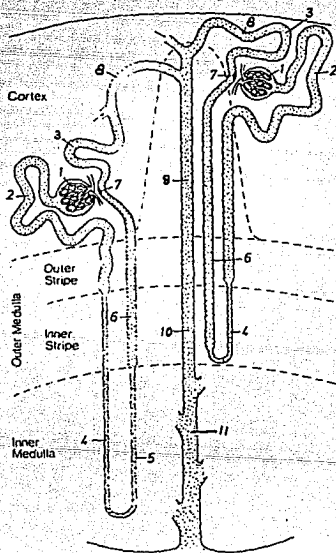


Fig. 3. Ubicación de la nefrona en el riñón.

1. glómulo, 2. túbulo contorneado proximal, 3. túbulo contorneado distal, 4. asa de Henle delgada, 5. asa de Henle gruesa, 6. asa de Henle gruesa, cortical y medular, 7. mácula densa, 8. túbulo conectador, 9. ducto colector cortical, 10. ducto colector de la médula externa, 11. ducto colector de la médula interna.

6.4. FACTORES VASCULARES

En el perro, la vasoconstricción renal reduce el flujo sanguíneo renal total durante la fase inicial de la IRA inducida con NU. La reducción en el flujo sanguíneo renal (de 20 a 65 %) se manifiesta en la primera hora después de la inyección con NU y persiste a través de las primeras 6 horas de la aplicación. La tasa de filtración glomerular cae conjunta y frecuentemente en un grado mayor que el flujo sanguíneo renal. Los cambios en el flujo sanguíneo renal en la rata son algunas veces menos constantes. Utilizando la técnica de xenón, se midió el flujo sanguíneo renal y se encontró una disminución del 36 % seis horas después de la administración de nitrato de uranilo (18). Sin embargo, no se pudo demostrar la reducción de la velocidad del flujo plasmático en la superficie glomerular después de dos horas de la administración en ratas, incluso con altas dosis de nitrato de uranilo.

Estos hallazgos fueron aún más evidentes cuando se consideró que la medida de la distribución intrarrenal del flujo sanguíneo cortical renal en la IRA con NU presenta reducciones. En cualquier caso, las evidencias en ratas y perros favorecen la observación de que el flujo sanguíneo renal cae en la fase inicial del daño inducido con NU (18).

La importancia patogénica de esas reducciones en el flujo sanguíneo renal asociado con la azotemia y oliguria es dudosa (18).

6.5. FACTORES TUBULARES

Es poca la evidencia morfológica de obstrucción en la fase de iniciación de la IRA inducida con NU. A las 24 h hay ruptura de los túbulos, pérdida de células epiteliales y muchos de los túbulos contorneados proximales contienen fusiones eosinófilas amorfas. El segmento de la pars recta en la corteza interna está extensamente involucrada y a las 48 h existe necrosis en dicha zona (18).

6.6. FACTORES GLOMERULARES

Los estudios morfológicos han sugerido una alteración en la estructura capilar glomerular como un factor patogénico en la insuficiencia renal aguda por nefrotoxinas (18). El cambio morfológico más importante inducido en el glomérulo por nitrato de uranilo es una reducción en tamaño y densidad del endotelio fenestrado, alteraciones que pueden ser reconocidas en las dos primeras horas después de la administración de nitrato de uranilo (23). A las 48 horas, las células del epitelio están anormales, lo que se puede demostrar por su hinchazón, pérdida de la separación normal entre los pedicelos, y estructuras vellosas muy voluminosas (18,25).

6.7. RECUPERACION EN LA NECROSIS TUBULAR AGUDA (NTA)

Los procesos de recuperación implican restitución de la continuidad de las nefrona en lugar de la regeneración epitelial. La restauración de la estructura normal se alcanza solo si no ha habido ruptura de la membrana basal del túbulo (26).

II ANTECEDENTES

1. PROTEINURIA

La importancia del riñón por conservar las proteínas se ha apreciado desde hace mucho tiempo (28). La proteinuria fue demostrada en 1695 por Frederick Dekker quien observó que la orina de pacientes enfermos cuando se hervía con ácido acético producía un precipitado. Un siglo después, Cruickshank notó que la porción de suero coagulable se detectaba en estados mórbidos de la orina. En el siglo XVIII, el concepto de que el riñón presentaba una membrana semipermeable que retenía las proteínas plasmáticas surgió progresivamente (29). Esta teoría se probó en la primera mitad del siglo XX siendo correcta cuando Wearn y Richards confirmaron con métodos microquímicos que la cápsula de Bowman constituye una malla cerrada ideal para el filtrado del plasma (30,31).

La proteinuria es considerada como un signo de enfermedad renal y es una anomalía frecuente en niños y adultos diagnosticada en los laboratorios. La proteinuria puede ser transitoria o persistente; cuando es persistente, las causas deben ser determinadas. El origen de la proteinuria puede ser glomerular o tubular. La proteinuria tubular frecuentemente indica la presencia de enfermedades renales obstructivas o tubulointersticiales. La detección de proteínas glomerulares como la albúmina se realiza por prueba de filtración molecular, sin embargo no existen pruebas simples para las cadenas de inmunoglobulinas y proteínas de bajo peso molecular las cuales predominan en la proteinuria por sobreproducción y proteinuria tubular. Esas proteínas de bajo peso molecular se detectan

solo por técnicas sofisticadas tales como: electroforesis (8), la cual separa a las proteínas en base a su carga eléctrica; técnica de filtración en gel, la cual hace posible analizar las moléculas protéicas de acuerdo a su tamaño; y técnicas inmunquímicas, las cuales hacen posible la identificación de proteínas urinarias y séricas (28). En la proteinuria glomerular se presentan grandes cantidades de proteínas de alto peso molecular las que entran a la filtración glomerular y finalmente aparecen en la orina. En la proteinuria tubular, la cantidad de proteínas filtradas por el glomérulo no aumenta, y las proteínas de bajo peso molecular, las cuales se filtran normalmente, aparecen en grandes cantidades en la orina final debido a que la reabsorción tubular es incompleta (28).

2. EXCRECION NORMAL DE PROTEINAS EN LA ORINA

La orina se forma por la ultrafiltración de plasma a través de la pared capilar glomerular. En los adultos, se forman 125 ml en promedio de filtrado glomerular cada minuto a partir de 1200 ml de flujo sanguíneo a través de los riñones (32). El glomérulo actúa como un tamiz molecular, permitiendo el paso de agua y pequeñas moléculas tales como glucosa y urea en tanto que impide la filtración de proteínas grandes en el ultrafiltrado. La pared capilar glomerular consta de tres componentes: a) una capa interna o endotelio fenestrado, b) una membrana basal glomerular y c) un epitelio celular externo el cual tiene interdigitaciones separadas por aberturas de filtración (32).

El paso de moléculas a través de la barrera glomerular está en función del tamaño molecular, de la carga y de la

configuración (32).

Bajo circunstancias normales, moléculas protéicas de tamaño relativamente pequeño, tales como la lisozima e insulina, pasan el filtrado glomerular en grandes cantidades; las moléculas proteicas de tamaño intermedio, tales como la albúmina, transferrina e IgG pasan en pequeñas cantidades, y las proteínas de mayor peso molecular, tal como la IgM no pasan la membrana basal glomerular excepto quizá en cantidades pequeñas (28).

2.1. ORIGEN DE LAS PROTEINAS URINARIAS

a) **Proteínas plasmáticas.** Proteínas que son constituyentes del plasma y son eliminadas en la orina por el filtrado glomerular. Dependiendo de su tamaño pueden servir como indicadores de cambios funcionales y/o morfológicos que afecten la parte glomerular, tubular, o ambas, de la nefrona. Pertenecen a varios grupos bioquímicos tales como anticuerpos, hormonas, enzimas, antígenos celulares, entre otros.

b) **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 a 70 000 Da tiene un origen renal.

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

d) **Proteínas liberadas de tejidos diferentes del tracto urogenital.** Liberadas de tejidos dañados o enfermos con tamaño

suficientemente pequeño para pasar el filtrado glomerular, por ejemplo mioglobina.

e) **Proteínas asociadas con el embarazo.** Antígenos de tejido placentar o de origen fetal, que pueden detectarse en la orina de mujeres embarazadas.

f) **Proteínas derivadas de tumores.** La orina de pacientes con cáncer pueden contener altas cantidades de proteínas las cuales se utilizan como marcadores de tumor, por ejemplo, antígeno carcino embrionario (33).

2.2. MECANISMOS DE PROTEINURIA

Los mecanismos de proteinuria son: a) paso anormal de proteínas plasmáticas a través de la membrana glomerular; b) reabsorción defectuosa de las proteínas plasmáticas filtradas; c) sobre flujo de proteínas, presentes en concentraciones muy altas; d) proteínas originarias de las vías urinarias (ejemplo Tamm-Horsfall) y e) pérdida de fluidos linfáticos en la orina (34).

3. DISTRIBUCION DE ENZIMAS Y ENZIMAS MARCADORAS DE DAÑO AL TUBULO PROXIMAL

Con la finalidad de conocer un marcador de daño del túbulo proximal intersticial, se han utilizado ampliamente las enzimas urinarias y no menos de 40 de ellas han sido analizadas para el diagnóstico de enfermedades urolrenales (35,36), con puntos de vista diferentes en su poder de diagnóstico (37,38).

El riñón humano muestra una distribución de enzimas particular a lo largo de la nefrona, reflejando la existencia de múltiples procesos catabólicos y biosintéticos. El riñón también juega un papel central en el metabolismo de proteínas y péptidos

tales como inmunoglobulinas, lisozima, albúmina, insulina, somatostatina coriónica (STH) y péptidos vasoactivos (20). En el borde en cepillo del túbulo proximal se encuentran distribuidas las siguientes enzimas: aminopeptidasa M, gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina, cisteína aminopeptidasa, N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), enzima convertidora de angiotensina I (ECA), dipeptidil aminopeptidasa IV y proteasas como la quimiotripsina (20,39).

Las células del borde en cepillo del túbulo proximal son susceptibles a daños crónicos agudos. Por lo tanto, se ha utilizado la determinación de proteínas y enzimas urinarias para valorar el daño renal en pacientes que reciben drogas potencialmente nefrotóxicas. Aunque muchas enzimas se han estudiado, la NAG ha recibido bastante atención (20,40). Otra de las enzimas que han sido de interés es la ECA (41), la cual también se ha comparado con la actividad la gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT), ya que ambas enzimas tienen la misma localización a lo largo de la nefrona (42,43). La actividad de la GGT ha sido investigada ampliamente en enfermedades renales (42,43). Lo más probable es que la ECA urinaria derive solo de las células tubulares, sugiriendo el uso potencial de su determinación como un índice de daño tubular (16), como se demostró en el modelo de insuficiencia renal inducido en ratas con tetracloruro de carbono (43a), en donde la actividad urinaria de la ECA se incrementó a partir del primer día de la inyección del tetracloruro hasta el tercer día, llegando a niveles control el séptimo día.

Generalmente se acepta que en ausencia de daño a la membrana

basal glomerular, las células tubulares renales son el principal origen de las enzimas que se detectan en orina en las nefropatías inducidas (41).

4. ECA EN SUERO

La ECA juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y balance de electrólitos en el riñón por la formación de la angiotensina II y por la degradación de la bradicinina. La regulación y el significado fisiológico de los niveles de actividad de la ECA en algunas enfermedades renales no se conocen con precisión, pero se han observado altos niveles de esta enzima en pacientes con desórdenes hormonales tales como hipertiroidismo y la enfermedad de Addison (44), así como en sarcoidosis (9,44a) y en la enfermedad de Gaucher (9,45,44a,46). La ECA en suero también está elevada en algunos pacientes con lepra (9,47), cirrosis hepática y hepatitis aguda (48). Ocasionalmente se ha encontrado, que pacientes con diabetes mellitus (9,48a) presentan altos niveles de ECA sérica, el cual se atribuye al daño epitelial (9). Se ha observado que en pacientes con IRA los niveles de ECA en suero son bajos durante la fase aguda de la enfermedad regresando a niveles normales cuando se llega a la recuperación (44). La actividad de la ECA en suero varía en relación a muchos factores. Las complicaciones pulmonares pueden modificar los niveles de actividad en suero debido a que el pulmón es rico en ECA (44).

Teóricamente, el riñón puede modificar la actividad de la ECA en suero por uno de los siguientes mecanismos: una posibilidad es que el riñón enfermo secrete cantidades excesivas

de enzima a la sangre; la otra posibilidad es que la actividad elevada sea una consecuencia del daño al riñón para excretar o degradar la enzima (49).

El origen de la ECA circulante se desconoce, aunque se ha sugerido que la enzima sérica puede derivarse del desprendimiento o secreción de glicoproteínas endoteliales al flujo sanguíneo (50). Esta sugerencia está apoyada por el hecho de que las características cinéticas, fisicoquímicas e inmunológicas de la enzima circulante son idénticas a la de la enzima unida a la membrana (50). Los factores involucrados en la regulación de los niveles de ECA en suero no están claros (51-55). Se sabe que existen varios estímulos que incrementan la ECA en suero como las hormonas tiroideas (56) y los inhibidores de la ECA tales como el captopril (SQ 14225, el D-metil-3-mercaptopropanoil-L-prolina), el MK 421 y el lisinopril (57).

3. ECA RENAL Y URINARIA

La función de la ECA en células endoteliales de los vasos del riñón está primeramente relacionada con la conversión de la angiotensina I. El SRA juega un papel importante en la función renal a través de la formación de la angiotensina II. El efecto vasoconstrictor de la AII, se observa especialmente a nivel postglomerular y de la presión hidrostática peritubular. La AII ejerce un efecto directo en la reabsorción de sodio y bicarbonato en el túbulo proximal (10).

El papel de la ECA en el borde en cepillo del túbulo proximal se desconoce. Puede convertir a la AI en AII en el lumen tubular. Sin embargo, las acciones fisiológicas de la AII no

están muy claras, aunque se han identificado sitios de unión específica en la membrana del borde en cepillo (10).

La ECA liberada en la orina puede contribuir significativamente a la inactivación de las cininas después de su formación en la nefrona distal. Además, es posible que la enzima actúe como una dipeptidil peptidasa no específica, contribuyendo a procesos de descomposición y absorción de varias proteínas y péptidos en el túbulo proximal (10). La ECA también puede contribuir a la inactivación de cininas en el túbulo proximal (10).

Como se mencionó, la ECA urinaria puede contribuir al diagnóstico de daño en el túbulo proximal renal y en humanos se ha observado un incremento significativo de la enzima, como es el caso de pacientes con infecciones de las vías urinarias altas y con nefrolitiasis (16,41). En otros estudios realizados a pacientes con pielonefritis y cálculos renales se encontró un incremento de actividad de la ECA urinaria (34), así como en pacientes con rechazo crónico del riñón transplantado (48b).

En estudios experimentales con ratas, Pedraza-Chaverri *et al* indujeron insuficiencia renal aguda con tetracloruro de carbono y encontraron un aumento significativo en la actividad de la ECA urinaria (43a).

III HIPOTESIS

El daño causado al túbulo proximal por el nitrato de uranilo, puede producir la pérdida y liberación de la enzima convertidora de angiotensina I a la orina en donde aumentará su concentración.

El daño que produce el nitrato de uranilo puede incrementar la liberación de la enzima convertidora de angiotensina, en los diferentes tejidos por lo que aumentarán los niveles de la enzima circulante.

IV OBJETIVO

Medir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I en tejidos, suero y orina de ratas con insuficiencia renal aguda inducida con nitrato de uranilo.

V MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

Los siguientes reactivos se compraron de Sigma Chemical Co.: reactivo de Folin-fenol, Ciocalteu, albúmina sérica bovina (ASB), hipurato de histidil leucina (HHL) no radiactivo, nonidet P-40, trizma-HCl, tritón X-100, glicina, Gli-Pro-p-nitroanilida, p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminide y p-nitroanilina. El HHL radiactivo se compró de DuPont, New England (Boston, Mass).

De J.T. Baker S.A. de C.V. México se obtuvieron los siguientes reactivos: nitrato de uranilo, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, acetato de etilo, ácido clorhídrico, sulfato de cobre, hidróxido de sodio, alcohol etílico, tartrato de sodio y potasio y ácido acético.

2. EQUIPO

Espectrofotómetro Carl Zeiss; centrifuga Clay-Adams, Inc; potenciómetro Orion Research; baño de incubación Precision; contador de radiaciones beta; vortex S.P; decapitador de animales Harvard Apparatus Co; micropipetas Gilson Rainin Instruments: P 5000 (5 ml), P 1000 (1 ml), P 200 (0.2 ml) y P 20 (0.02 ml); baño de incubación de aceite; pipetas de repetición Eppendorf; autoanalizador de creatinina Beckman; congelador Revco (-70 °C); agitador magnético; balanza granataria Ohaus modelo 700 (capacidad 2610 g). Material de cirugía: tijeras rectas MX5-6 y MX5-12. equipo para electroforesis Mini Trans-Blot, modelo Mini Protean II.

3. MATERIAL DE BIOTERIO

Jaulas metabólicas las cuales están integradas por bebedero, malla metálica y cono colector. Los dos primeros se encuentran fuera del cuerpo de la jaula; la malla metálica está colocada entre el cono colector y la caja, su función principal es la retención de heces y de sobrante de alimento permitiendo de este modo el paso de la orina libre de impurezas hacia el cono colector y finalmente a un recipiente de plástico.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Durante el presente estudio se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar (Rattus norvegicus) de 200 a 250 g de peso. Diez ratas constituyeron el grupo control y las otras diez constituyeron el grupo experimental.

Grupo control: Se le aplicó vehículo (solución salina 0.9%) por vía subcutánea.

Grupo experimental: Se le inyectó una solución de nitrato de uranilo por vía subcutánea, a una dosis de 15 mg/Kg (23).

Durante los días de experimentación se realizaron las siguientes actividades: las ratas se pesaron, se midió el volumen urinario y la orina se centrifugó; se tomaron cinco alícuotas de 1 ml cada una y se congelaron a -70°C con la finalidad de preservarlas hasta su análisis posterior.

Las ratas se sacrificaron por decapitación cinco días después de la inyección con el propósito de tomar las muestras de sangre así como las muestras de los siguientes tejidos: riñón, corazón, cerebro, intestino, hígado, pulmón, testículo, aorta y

glándulas suprarrenales. Las muestras de tejido se lavaron en solución salina al 0.9%; se pesó un gramo de cada uno de los tejidos, se guardaron en tubos Eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta que se realizó la cuantificación de proteínas totales y la determinación de la actividad de la ECA. Con la finalidad de realizar estudios histológicos, se tomó un riñón de cada una de las ratas.

5. DETERMINACIONES ANALITICAS

5.1. DETERMINACION DE PROTEINAS

FUNDAMENTO

Las proteínas se midieron por el método colorimétrico de Lowry et al (60) el cual tiene los siguientes principios básicos:

- a) Reacción de la proteína con cobre en condiciones alcalinas.
- b) Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la proteína tratada con cobre.

La proteína se cuantifica por la cantidad de tirosina y triptofano presentes en ella comparada con la cantidad de estos aminoácidos en la proteína usada como patrón. El color desarrollado se lee a 660 nm.

SOLUCIONES

Solución A: Carbonato de sodio al 2%, Hidróxido de sodio al 0.04% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%.

Solución B: Sulfato de cobre al 0.5%.

Solución C: 50 ml de solución A + 1 ml de solución B. Se prepara y usa al momento de la determinación.

Solución D: Reactivo de Folin-Fenol 1 N. Se hace una dilución a

partir de una concentración 2 N con agua destilada (1:1).

Solución E: Patrón de albúmina sérica de bovino al 0.05 %. Se prepara una curva patrón de 5 hasta 50 ug en un volumen final de 0.2 ml.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN ORINA

- 1) Se toman 100 µl de muestra, se coloca en un tubo de ensayo y se le agrega 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %.
- 2) Se agita y se centrifuga por 15 minutos a 2,500 r.p.m.
- 3) Se decanta el contenido del tubo y se repiten los pasos 1-3 dos veces más, y
- 4) Al botón residual se le agregan 600 µl de NaOH 0.5 M y se agita.
- 5) Se toman 200 µl, se agrega 1 ml de la solución C después de diez minutos, se agregan 600 µl de la solución D con agitación continua después de 30 minutos se lee la densidad óptica a 660 nm.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN TEJIDOS Y SUERO

- 1) Se toma 0.1 ml de una solución 1:100 de suero más 0.1 ml de agua para tener un volumen final de 0.2 ml. Esta se puede modificar de acuerdo a la concentración de proteínas en la muestra. La determinación se realiza como está descrito en el paso 5 del punto anterior.

5.2 DETERMINACION DE SODIO EN ORINA POR FLAMOMETRIA

La flamometría es ampliamente utilizada en los laboratorios para determinar sodio, potasio y concentraciones de litio en

fluidos corporales. Para hacer ésta determinación se usó el flamómetro de la marca Instrumentatio Laboratory Inc. como se indica a continuación:

1. Se abren las llaves de oxígeno y gas.
2. Se enciende y se espera a que la flama aparezca.
3. Se enciende el dilutor.
4. Se ajusta el estándar de litio (durante todas las determinaciones).
5. Se leen las muestras.

FUNDAMENTO

Los átomos de algunos metales cuando se les suministra suficiente energía calorífica como por ejemplo el de una flama, serán excitados y emiten esta energía a una longitud de onda característica de cada elemento.

La intensidad de la longitud de onda característica de la energía radiante producida por los átomos excitados en la flama, la cual es directamente proporcional a la concentración de la substancia de interés en la muestra (65).

5.3. DETERMINACION DE CREATININA

La determinación de creatinina en suero y orina se realizó con el reactivo para el analizador de creatinina Beckman .

El analizador utiliza un sistema de detección óptica, empleando una fuente luminosa, un filtro interferencial de 520 nm, un fotodetector y un circuito electrónico que mide el cambio de absorción de la solución de picrato alcalino después de la adición de la muestra.

Quando se inyecta una muestra en el reactivo picrato alcalino, la creatinina de la muestra reacciona con el ácido pícrico en la presencia de iones OH^- en el reactivo, y produce un

complejo de color rojo (Fig. 4)

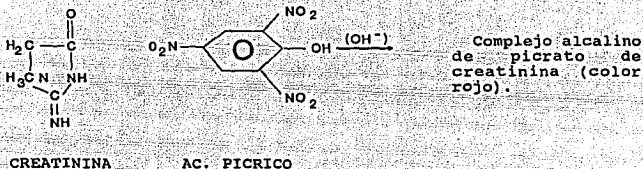


Fig. 4. Formación del complejo picrato de creatinina.

La velocidad observada a 25.6 segundos después de la inyección de la muestra, es una medida directa de la concentración de creatinina originalmente presente en la muestra en el momento de su introducción en la celdilla de reacción. Con la concentración de creatinina en orina y suero se calculó:

a) Relación O/S

$$= \frac{\text{Creatinina en orina (mg/dl)}}{\text{Creatinina en suero (mg/dl)}}$$

b) Depuración de creatinina (Dep Cr)

$$= \frac{\text{Creatinina en orina (mg/dl)}}{\text{Creatinina en suero (mg/dl)}} \times \text{flujo urinario (ml/min)}$$

c) Índice de insuficiencia renal

$$\text{IIR} = \frac{\text{Na en orina (mEq/l)}}{\frac{\text{Creatinina en orina (mg/dl)}}{\text{Creatinina en suero (mg/dl)}}}$$

5.4. DETERMINACION DE NITROGENO DE UREA

El nitrógeno de urea se determinó con el estuche comercial y el autoanalizador de BUN Beckman.

Este analizador utiliza un método enzimático que mide la velocidad de cambio de la conductividad de la reacción. Un volumen preciso de muestra se inyecta con el reactivo en la celdilla de reacción. El electrodo de conductividad mide la velocidad de aumento de la conductividad en la reacción. Esta velocidad es proporcional a la cantidad de nitrógeno ureico presente en la muestra (Fig. 5).

La concentración de nitrógeno ureico esta dado en mg/dl.

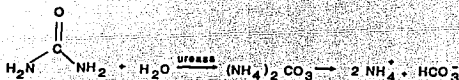


Fig. 5. Reacción para determinar la cantidad de urea por la conversión de la urea en carbonato de amonio.

5.5. DETERMINACION RADIOQUIMICA DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA

FUNDAMENTO

Para medir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) se utilizó una mezcla de hipurato de histidil leucina

(HHL) no radiactivo y HHL marcado con ^{14}C como sustrato (61).

La enzima convertidora de angiotensina I hidroliza al HHL en His-Leu y en ácido hipúrico (HA) (Fig.6). El HA radiactivo se extrae con acetato de etilo y la actividad se cuantifica en un contador de radiaciones beta.

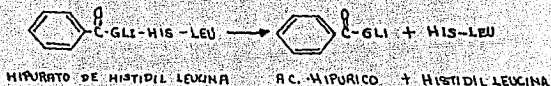


Fig. 6. Reacción en la que se basa la determinación de la enzima convertidora de angiotensina I.

TECNICA

Antes de realizar el ensayo se colocan volúmenes iguales para cada tubo 3.5 μl de HHL no radiactivo y HHL radiactivo (68.1 mmol/l, en una proporción de agua: etanol 2:3) los cuales se mezclan y se secan bajo una corriente de N_2 una vez seco se resuspende en 40 μl de amortiguador Tris HCl 0.125 mol a pH 8.3 conteniendo cloruro de sodio 0.6 mol/l posteriormente se coloca la muestra en cada una de los tubos: 5 μl de suero más 5 μl de solución salina o 10 μl de orina, o una muestra de los tejidos homogenados 10 μl de riñón, corazón, cerebro, intestino delgado,

hígado, aorta y adrenales, y 5 μ l de testículo. Se deben tener dos tubos blanco y dos tubos problema para cada una de las muestras. A cada tubo blanco se le agregan 50 μ l de HCl 1 N. Para que se lleve a cabo la reacción enzimática se colocan los tubos en baño María a 37°C. Los tiempos de incubación para cada una de las muestras es el siguiente: para aorta y adrenales 30 min, para cerebro e intestino 20 min, para hígado y testículo 10 min, y para pulmón 5 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación a los tubos problema se les adicionaron 300 μ l de acetato de etilo, con la finalidad de extraer el ácido hipúrico, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y posteriormente se centrifugan a 2500 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente.

De cada uno de los tubos se tomaron 200 μ l de sobrenadante, mismo que se puso en un frasco al cual se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad se cuantificó en un contador de radiaciones beta.

Para poder realizar la determinación de la actividad de la ECA en los tejidos se realizó el siguiente procedimiento (61): las muestras de los tejidos se colocaron en tubos con 5 ml de amortiguador de Tris-HCl 0.1 M pH 7.8 el cual contenía KCl 30 mM, $MgCl_2$ 5 mM, sacarosa 0.25 M y Nonidet P-40 0.5%. El Nonidet P-40 solubiliza a la enzima unida a la membrana. Los tejidos se dejaron reposar con el amortiguador toda la noche a 4°C y al día siguiente se centrifugaron a 12,500 r.p.m. (10,000 x g) durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf, los cuales se congelaron hasta que se

realizaron las determinaciones correspondientes.

La actividad de la ECA se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{mU/ml} = \frac{(\text{dpm P} - \text{dpm B}) (1.33)}{(\text{AE}) (0.91) (0.67) (t) (v)} = \text{nmol AH/ml/min}$$

AH= ácido hipúrico.

AE= actividad específica.

0.91= porcentaje de recuperación de AH.

0.67= fracción contada de AH.

t= tiempo de incubación (min).

v= volumen de la muestra incubada (ml).

dpm P= desintegraciones por minuto del tubo problema.

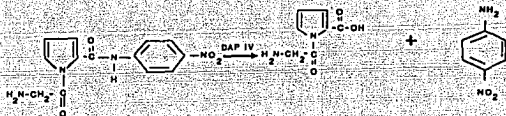
dpm B= desintegraciones por minuto del tubo blanco.

La actividad de la ECA en suero se expresa en mU/ml, en los tejidos en mU/mg de proteína y en orina en mU/vol, mU/mg creatinina.

5.6. DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA IV

FUNDAMENTO

La enzima hidroliza al sustrato Gli-Pro-p-nitroanilida en Gli-Pro y en p-nitroanilina (Fig.7). Cualquier X-prolina-p-nitroanilida puede ser usada para el ensayo, sin embargo en este ensayo se utilizó Gli-prolina p-nitroanilida (62,63). La DAP IV tiene una alta especificidad por este sustrato, lo cual hace que esta prueba sea altamente específica.



Gly-Pro-p-nitroanilida

Gly-pro p-nitroanilina

Fig. 7. Reacción catalizada por la Dipeptidil Aminopeptidasa IV.

El sustrato se disuelve en una solución acuosa de tritón al 2% en una concentración final de 3 mM el cual debe permanecer almacenado a 4°C. El detergente tritón X-100 no afecta la actividad de la enzima a una concentración final de 1%. También se puede utilizar Nikkol NP-10 o Tween 20. Durante la incubación estos sustratos cromogénicos son bastante estables a un pH 8, pero a un pH por arriba de 9 son inestables y se hidrolizan espontáneamente.

TECNICA

Los tubos experimentales contienen: 75 μ mol de glicina-NaOH pH 8.7, 1.5 μ mol de glicilprolina p-nitroanilida tosilato, la enzima, y agua para completar un volumen final de 1.05 ml.

Los tubos blanco y los estándar contienen: 40 μ l de agua y 150 nmoles de p-nitroanilina.

Los tubos controles no contienen la enzima. En la siguiente tabla se resumen las cantidades adicionadas a cada tubo.

	BLANCO	ESTANDAR	CONTROL	PROBLEMA
Buffer de Glicina	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Sustrato	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Agua	400 µl	200 µl	300 µl	300 µl
Muestra	-----	-----	-----	100 µl
Estándar	-----	200 µl	-----	-----

Los tubos se incuban a 37°C durante 30 min.

La reacción se detiene agregando 3.0 ml de amortiguador de acetato de sodio pH 4.2 a una concentración de 1M.

Posteriormente a los tubos control se les agregan 100 µl de la muestra. Se agitan suavemente para homogenizarlos.

El espectrofotómetro se ajusta a 0 con el blanco, y la absorbencia del experimental (E), control (C), y estándar (S), se leen a 385 nm.

CALCULOS

Los cálculos de la reacción enzimática en la liberación de p-nitroanilina se realizaron de la siguiente manera (62):

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

E= D.O. Tubo problema.

C= D.O. Tubo control.

S= D.O. Tubo estándar.

EJEMPLOS EN ORINAS (A) Y (B):

A) S= 0.36, E= 0.35, C= 0.06. (B) S= 0.365, E= 1.11, C= 0.07.

Ya que se usaron 0.1 ml de muestra y es necesario corregir por el mismo,

(A), Vol= 21.0 ml; $4.03 \times 10 \times 21= 806$ nmol/h.

(B), Vol= 40.5 ml; $85.89 \times 10 \times 40.5= 5769.86$ nmol/24 h.

También se puede expresar en Unidades, tomando en cuenta que una U de cualquier enzima se define como la cantidad de enzima que catalizará la producción de 1 μ mol de producto por minuto.

En los ejemplos anteriores equivale a 0.0806 U/24 h y 5.76 U/24 h para (A) Y (B) respectivamente.

5.7. N-ACETIL- β -D-GLUCOSAMINIDASA (NAG; EC 3.2.1.30)

La NAG es una hidrolasa lisosomal que está involucrada en el catabolismo de las glicoproteínas y se considera que su elevación en orina constituye una evidencia de daño al túbulo proximal.

FUNDAMENTO

La NAG libera al p-nitrofenol del sustrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminide (Fig. 8). La actividad de la NAG es proporcional a la cantidad de p-nitrofenol liberado el cual se lee a 405 nm (64,65).

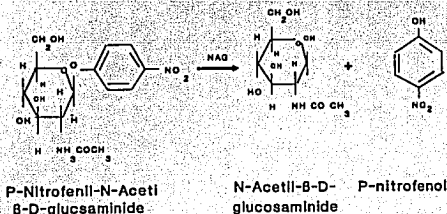


Fig. 8. Reacción catalizada por la N-acetil- β -D-glucosaminidasa.

REACTIVOS

- a) Amortiguador de citrato 0.1 M, pH 4.4.
PM 294.1.
294.2 - 1 mol
29.41 - 0.1 mol
Pesar 29.41 g, disolverlos con agua a 900 ml, ajustar el pH con HCl 1M y aforar con agua a 1 litro.
ALMACENAMIENTO: Congelado en alícuotas a -25°C.
- b) Carbonato de sodio 0.2 M, pH 10.4; PM 106
106 g - 1 mol
21.2 g - 0.2 mol
Pesar 21.2 g y disolverlos con agua a 900 ml, si es necesario ajustar el pH con NaOH 5 M y al final aforar con agua a 1 litro.
ALMACENAMIENTO: 4°C.
- c) p-nitrofenol 0.6 mM; PM 139.1.
139.1 g - 1 mol
139.1 mg - 1 mmol
83.46 mg - 0.6 mmoles
Disolver 8.346 mg en 100 ml de agua (Sol, 0.6 mM).
ALMACENAMIENTO: 4°C.
- d) p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminide 10 mM; PM 342.3.
342.3 g - 1 mol
342.3 mg - 1 mmol
Disolver 34.23 mg con amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.4 en un volumen final de 10 ml. Poner a 37°C para que se disuelva totalmente.
Almacenamiento: Se puede guardar congelado a 25°C hasta por seis meses en alícuotas de 0.2 ml. La solución debe descartarse si el blanco sobrepasa de un valor de 0.1.

MUESTRA DE ORINA

Se puede medir en orina de 24 h o en muestras de orina obtenidas en menor tiempo. No se requiere recolectar la orina, con algún conservador. Es estable con el almacenamiento a 4°C o hasta -20°C para reducir la posibilidad de crecimiento bacteriano lo cual altera la actividad de la enzima. No se necesita centrifugación antes del ensayo y la diálisis no es necesaria si la orina se diluye de 1:20. La hemólisis moderada no afecta el ensayo.

METODO

1. Mezclar:

0.1 ml de orina o suero

1.25 ml de amortiguador de citrato (sol. a).

0.25 ml de sustrato (sol. d). En el tubo blanco se sustituye por solución a.

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.

CALCULOS

Se hace una curva de calibración con diluciones crecientes de una solución 0.6 mM de p-nitrofenol.

También se puede hacer tomando en cuenta que el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol que es de 18500 mol/cm.

5.8. ELECTROFORESIS DE GELES DE SDS POLIACRILAMIDA

PREPARACION DEL GEL DE SEPARACION

1) Ensamble el Mini Trans-Blot modelo No. Mini Protean II usando espaciadores de 0.75 mm.

2) En un frasco vacío de capacidad de 125 ml, mezclar 60 ml de la solución del gel de separación de acuerdo a la tabla 1.

3) Tapar el frasco y agitar.

4) Añadir el TEMED (tetrametil etileno diamida) y persulfato de amonio y mezclarlo con lo demás cuidando que no se formen burbujas.

5) Pipetear la solución dentro de los sandwiches a un nivel cercano a 1 cm del tope.

6) Cubrir las placas, use un lubricante leve. En una jeringa de plástico apropiada de 2 pulgadas y con una aguja del número 22.

La posición de la aguja deberá estar en un ángulo de 45° en un punto cercano al tope de la acrilamida y próximo a un espaciador. Aplicar suavemente cerca de 0.3 ml de agua o agua saturada con N-butanol, se aplica de la misma manera en toda la superficie después de un minuto o dos, cubrir la segunda placa de la misma manera. Cuando el líquido penetra la interfase del gel comienza a ser polimerizado y empieza a ser visible.

- 7) Desechar el agua que está en la parte superior.
- 8) Lavar la superficie de los geles con agua destilada.
- 9) Añadir cerca de 1 ml de gel running (6) para cubrir.
- 10) Dejar asentar los geles por algunas horas.

PREPARACION DEL GEL CONCENTRADOR O STAKING GEL

- 11) Vertir el líquido de la superficie de los geles.
- 12) En un frasco vacío de capacidad de 50 ml mezclar de acuerdo a la tabla 2 dejando fuera el persulfato de amonio y el TEMED.
- 13) Agitar la solución.
- 14) Añadir el persulfato y el TEMED, en el frasco de la mezcla.
- 15) Agregar 1 o 2 ml de la solución del gel concentrado al sandwich, limpiando la superficie de los geles.
- 16) Llenar el sandwich con la solución del gel concentrador.
- 17) Insertar un peine dentro del sandwich, cuidando que no se formen burbujas por debajo de las cerdas de los peines, pues el oxígeno inhibe la polimerización y causa una distorsión local en la superficie del gel y en el fondo de las paredes.
- 18) Se deja asentar el gel aproximadamente media hora.
- 19) Combinar partes iguales de proteínas con el buffer de tratamiento 2 x.
- 20) Poner el tubo en agua hirviendo por 90 segundos.

21) Remover la muestra y llevarlo al hielo hasta su uso.

CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS

22) Remover lentamente los peines de los geles, jalándolos cuidadosamente en línea recta hacia arriba para evitar disturbios en las paredes divididas.

23) Limpiar las paredes con agua destilada. 24) Drenar las paredes.

25) Llenar las paredes con tank buffer.

26) Use una jeringa de 50 μ l, apuntando la muestra hacia la pared en cada uno de de los canales, con cada una de las muestras.

27) Colocar la cámara de buffer alta en la placa. Remover las cámaras y el centro del sandwich a la base de la cámara alta de buffer.

28) Llenar la cámara baja con buffer 8, quedando los sandwiches inmersos en este buffer. Si quedan atrapadas las burbujas al fondo de los sandwiches, quitarlas con una pipeta.

29) Llenar la cámara alta con tank buffer.

30) Que el buffer no penetre en el canal de las muestras porque las lava.

31) Conecte la fuente de poder a la cámara y ajustar la corriente a 30 mA, si hay dos ajustar a 60 mA. El voltaje inicial debe ser de 70 a 80 volts. Anotar el voltaje inicial y el voltaje final.

TINCION

1.-Se sacan los geles y se pasan a una solución fijadora que contiene metanol al 40 % y ácido acético al 10 %, se dejan hasta que se realice la tinción con plata que va de una hora a más.

2.- Solución de fijación que es etanol al 10 % y ácido acético al 5 % en un volumen de 400 ml, durante 30 min.

3.- Oxidador. Se preparan 200 ml, 20 ml de oxidador y 180 ml de agua destilada, los geles se colocan por 10 minutos. Posteriormente se pasan a agua destilada, cambiando de agua hasta que el color amarillo sea removido; en caso de que no se vean totalmente transparentes se realizan otros lavados.

4.- Reactivo de plata. Se preparan 200 ml, 180 ml de agua y 20 ml de reactivo de plata, los geles se mantienen en esta solución por 30 min. Se enjuaga en agua destilada durante 2 min. y se pasa al revelador.

5.- Revelador. Se pesan 32 gramos de revelador para 1 litro de agua y en tres recipiente diferentes se colocan aproximadamente 200 ml. En el primer recipiente se dejan los geles durante 30 segundos, en el segundo y el tercero hasta que aparezcan las bandas y por último se dejan en una solución stop.

6.- Solución stop. Acido acético al 5 % , allí se deja hasta que se lean.

TABLA 1. GEL DE SEPARACION al 7.5 %

30 % de T + 2.7 % de C (acrilamida + bis-acrilamida)	3.75 ml
Buffer 2	3.75 ml
SDS al 10 %	0.15 ml
Agua	7.25 ml
Persulfato de amonio	75.0 µl
TEMED	5.0 µl

TABLA 2. GEL DE CONCENTRACION

30 % de T + 2.7 % de C (acrilamida + bis-acrilamida)	0.665 ml
Buffer 3	1.25 ml
SDS al 10 %	50.0 µl
Agua	3.0 ml
Persulfato de amonio	25.0 µl
TEMED	2.5 µl

5.9. TECNICA HISTOLOGICA

Microscopia de luz: las porciones de riñón incluyendo corteza y médula se fijaron con formaldehído al 10 % en buffer de fosfato y se incluyeron en parafina, entonces se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Microscopia electrónica: fragmentos pequeños de corteza renal se fijaron en glutaraldehído al 4 % amortiguado con cacodilato al 0.01 M pH 7.4 a temperatura ambiente por 4 horas, se postfijaron con tetraóxido de osmio al 2 %, se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en Epon. Cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Posteriormente se examinaron con un microscopio electrónico Zeiss M-10.

5.10. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos están expresados como el promedio \pm la desviación estándar. El análisis estadístico utilizado para comparar los dos grupos fue el de t no pareada.

VI RESULTADOS

DATOS GENERALES Y ESTUDIOS DE FUNCION RENAL

En la Fig. 9 se presenta el peso corporal de ambos grupos durante los días de estudio. La pérdida de peso llega a ser significativa para las ratas tratadas con nitrato de uranilo (NU), durante el cuarto y quinto día ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente). En la Fig. 10 se representa el volumen urinario mismo que aumenta progresivamente en el grupo experimental, a partir del día 1, alcanza un pico el día tres, y después disminuye hasta alcanzar valores control el día 5.

En la Tabla 1 se resumen los estudios de función renal de las ratas control y de las ratas tratadas con NU. Se puede observar en esos resultados que las ratas con insuficiencia renal aguda presentaron en suero altos niveles de sustancias de desecho como lo son la urea y la creatinina el día 5, lo que indica que las nefronas están dañadas y son incapaces de eliminar normalmente del organismo tales sustancias, por lo que se van acumulando. De acuerdo con estos datos, la depuración de creatinina y la relación CrO/CrS disminuyeron marcadamente. El índice de insuficiencia renal (IIR), que es una medida de la capacidad del riñón para retener sodio, aumentó significativamente ($p < 0.001$).

La Fig. 11 representa la proteinuria la cual se presentó desde el primer día de la aplicación de nitrato de uranilo y alcanzó un máximo el tercer día para posteriormente disminuir de manera gradual. Las proteínas en suero no presentaron diferencias significativas: $\bar{x} = 8 \pm 0.8$ y $\bar{x} = 7.52 \pm 0.8$ para los grupos control y experimental respectivamente.

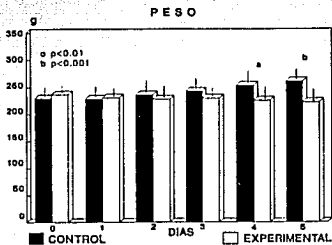


Fig. 9. Pesos corporales de las ratas de los grupos control y experimental. Se puede apreciar un descenso significativo a partir del cuarto día.

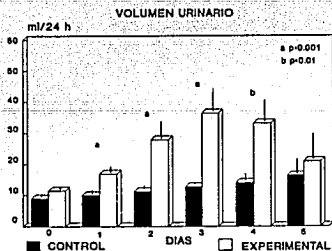


Fig. 10. Volumen urinario de las ratas de los grupos control y experimental. Este se incrementa desde la aplicación del NU pero es significativo a partir del segundo día, tendiendo a valores basales para el quinto día.

TABLA 1 ESTUDIOS DE FUNCION RENAL

	CONTROL	I.R.A.	SIGNIFICANCIA
UREA EN SUERO mg/dl	21 ± 3.4 (10)	222.1 ± 39 (10)	p < 0.001
CREATININA EN SUERO mg/dl	0.34 ± 0.05 (9)	5.1 ± 1.2 (10)	p < 0.001
CREATININA EN ORINA mg/dl	62.2 ± 9.0 (10)	15.2 ± 3.0 (9)	p < 0.001
DEPURACION DE CREATININA ml/min	2.1 ± 0.5 (8)	0.06 ± 0.04 (10)	p < 0.001
RELACION O/S	189 ± 32 (8)	3.1 ± 0.6 (10)	p < 0.001
I.I.R.	1.0 ± 0.2 (8)	11.0 ± 3.8 (9)	p < 0.001

Estudios del quinto día. Número de datos (). I.R.A. = Insuficiencia Renal Aguda. I.I.R. = Índice de Insuficiencia Renal.

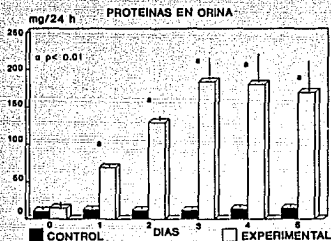


Fig. 11. Excreción urinaria de proteínas . Se observa un incremento significativo de proteínas a partir de la aplicación del NU, con una excreción máxima durante el tercer día.

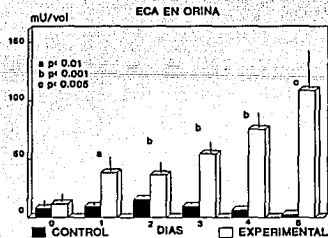


Fig. 12. Excreción urinaria de ECA. En esta gráfica se observa que la ECA aumenta desde el primer día de aplicación del NU.

ACTIVIDAD DE LA ECA URINARIA Y SERICA

La actividad de la ECA urinaria aumentó significativamente a partir del primer día ($p < 0.01$), y siguió aumentando paulatinamente hasta el quinto día ($p < 0.005$ $x = 108.18 \pm 40.3$ mU/24 h) (Fig. 12).

En la Fig. 13 se representa la actividad de la enzima en mU/mg de creatinina y se observa un incremento significativo a partir del primer día de experimentación.

La actividad de la ECA en suero aumentó significativamente $p < 0.001$ (Fig. 14).

DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA IV Y N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA

En la Fig. 15 se representa otro de los indicadores utilizados para diagnosticar el daño en el borde en cepillo del túbulo proximal que es la dipeptidil aminopeptidasa IV. En esta gráfica se puede apreciar que el aumento en la excreción urinaria es significativa a partir del primer día ($p < 0.001$) hasta el quinto día ($p < 0.002$).

En la Fig. 16 se presentan los datos de N-acetil- β -D-glucosaminidasa urinaria la cual aumenta significativamente a partir del primer día después de la inyección ($p < 0.05$), sigue aumentando hasta alcanzar un pico el 4º día ($p < 0.05$) y disminuye, pero sigue alta, al final del estudio.

ACTIVIDAD DE LA ECA EN LOS TEJIDOS

En la Tabla 2 se resumen los resultados de la actividad de la ECA en los tejidos del grupo control y del grupo experimental con la desviación estándar correspondiente. Los

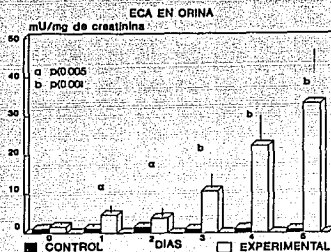


Fig.13. Excreción urinaria de ECA. Se puede apreciar un incremento significativo de enzima en orina respecto a la cantidad de creatinina.

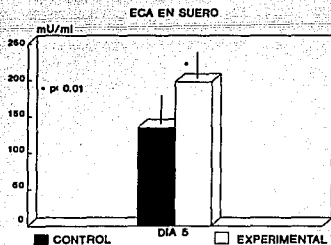


Fig. 14. Actividad sérica de la ECA, del quinto día.

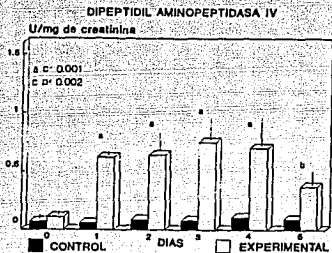


Fig. 15. Excreción urinaria de DAP IV. Esta enzimas incrementa significativamente a partir del primer día de aplicación de NU.

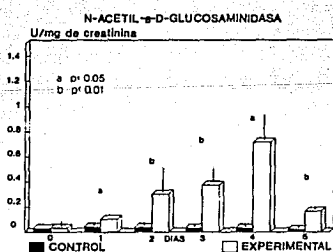


Fig. 16. Excreción urinaria de NAG. Se puede apreciar el incremento significativo de la NAG respecto al grupo control a partir del primer día de aplicación, teniendo un máximo el cuarto día.

**TABLA 2 ACTIVIDAD DE LA ECA EN
LOS TEJIDOS**

TEJIDO	CONTROL	I.R.A.	SIG.
TESTICULO	192 ± 19	236 ± 50	N S
PULMON	96 ± 23	139 ± 21	p < 0.001
INTESTINO DELGADO	5.4 ± 1.8	14 ± 5.4	p < 0.001
AORTA	1.66 ± 0.6	1.62 ± 0.7	N S
CEREBRO	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.1	N S
ADRENALES	1.28 ± 0.5	2.6 ± 0.4	p < 0.001
RIÑON	1.25 ± 0.3	1.0 ± 0.3	N S
CORAZON	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	N S
HIGADO	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.04	N S

La actividad de la enzima está dada en ml/100g de proteína. (n = 8-10). I.R.A. = Insuficiencia Renal Aguda. SIG. = Significancia. N S = No significativo.

tejidos en los que se observó un aumento en actividad de la enzima respecto al grupo control fueron los siguientes: pulmón (67.54 %), adrenales (63.63 %) e intestino delgado (39.0 %), mientras que la actividad de la ECA en corazón, hígado, cerebro, aorta, testículo y riñón permaneció sin cambio.

ELECTROFORESIS

Con la finalidad de conocer el tipo de proteínas presentes en la orina de las ratas con insuficiencia renal aguda, se utilizó la técnica de electroforesis, misma que permitió determinar que la albúmina es la proteína más abundante. Se observó un aumento progresivo durante los días de experimentación (Fig. 17).

MICROSCOPIA DE LUZ

En las Figs. 18 y 19, principalmente en la porción media y profunda, se pueden observar los túbulos contorneados proximales y distales que muestran necrosis caracterizada por acidofilia nucleoplásmica y cariólisis con desprendimiento celular y membranas basales desnudas. También se observaron túbulos con actividad regenerativa manifestada por la presencia de figuras de mitosis e incremento del volumen nuclear. En la porción cortical profunda existen túbulos con cilindros celulares. En la porción medular, tanto en los túbulos colectores como en las asas de Henle, se encuentran cilindros hialinos y ocasionalmente cilindros celulares.

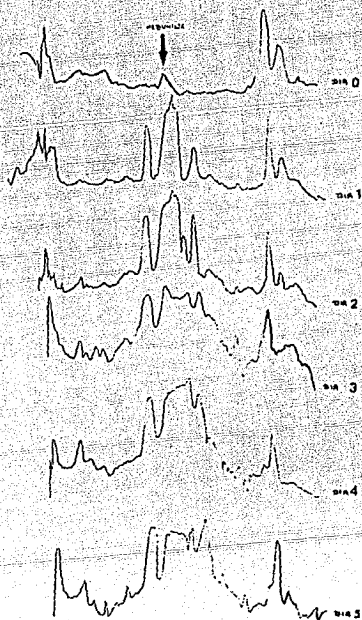


Fig. 17. Densitometría de los geles de SDS-poliacrilamida con muestras de orina de cada uno de los días de experimentación. Se puede observar un gran incremento de albúmina.



Fig. 18. Porción cortical de riñón. Aquí se puede apreciar un extenso desprendimiento celular hacia el lumen de los túbulos. Técnica de H-E, (40x), día 5.



Fig. 19. Porción cortical media y profunda de riñón, se puede apreciar el desprendimiento celular así como las membranas basales desnudas de los túbulos contorneados proximales. Técnica de H-E, (100x), día 5.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

En la Fig. 20 se presenta una célula del túbulo contorneado proximal en donde se observa degeneración extensa de las mitocondrias caracterizada por la ruptura de las crestas y precipitados electrón densos en la matriz; hay, además, vacuolación con núcleos de conformación irregular y cromatina grumosa (picnosis).

En la Fig. 21 se puede apreciar el citoplasma a un mayor aumento del túbulo contorneado proximal. Aquí se observa daño extenso manifestado por la ruptura de las crestas con precipitación de sustancia amorfa electrón densa en la matriz, también muestra vacuolación con precipitados de material de aspecto proteináceo.

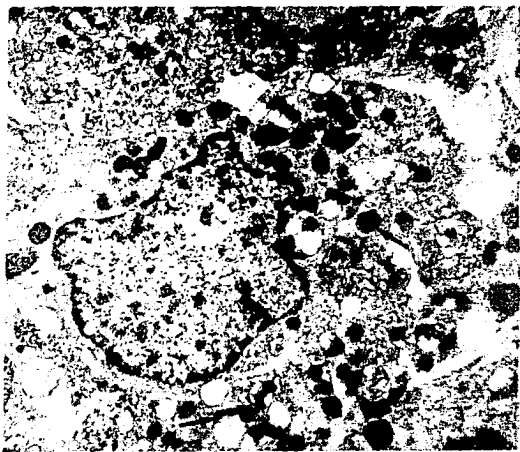


Fig. 20. Micrografía electrónica de una célula del túbulo contorneado proximal, en la cual se observa extensa degeneración de las mitocondrias caracterizada por la ruptura de las mismas.

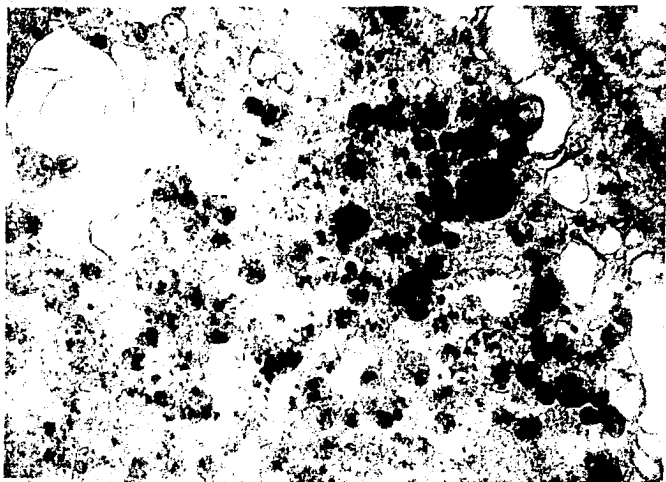


Fig. 21. Imagen ultraestructural del citoplasma del túbulo contorneado proximal, se observa degeneración y ruptura de las mitocondrias.

VII DISCUSION

El presente estudio se realizó con la finalidad de conocer la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) en la insuficiencia renal aguda inducida con NU.

La administración de NU en una dosis de 15 mg/Kg de peso aplicado subcutáneamente en las ratas produce daño al túbulo proximal renal. Con los estudios ultraestructurales de microscopía de luz y electrónica se detectó necrosis en los túbulos contorneados proximales con cariólisis, desprendimiento celular y membranas basales desnudas lo que es similar a los estudios de Bencosme *et al* (58) y Stein *et al* (25). En suero no hubo cambios significativos en cuanto a las proteínas, sin embargo, la función renal disminuyó marcadamente. Además, se encontraron altos niveles de urea y creatinina en suero, no así en orina, lo que indica que sus causas pueden ser diversas, de acuerdo con las teorías propuestas para explicar la patogénesis de la IRA. Una de las teorías dice que la disminución en la tasa de filtración glomerular se debe a la vasoconstricción (18,66); otra teoría dice que el bloqueo tubular aparece como consecuencia del desprendimiento celular en el lumen así como al edema intersticial, también se han propuesto cambios en la barrera de filtración (66). En un modelo en perro con una dosis de 10 mg/Kg de NU, Stein *et al*. (25) encontraron que existe una marcada azotemia a las 48 horas de la aplicación.

Después de la administración del NU, en este trabajo se observó que las ratas perdieron peso y esta disminución fue significativa durante el cuarto y el quinto día, y el volumen

urinario aumentó a partir del primer día. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Blantz (23) utilizando dosis de 15 y 25 mg/Kg de peso y Bencosme *et al.* (58) con una dosis de 14.4 mg/Kg quienes encontraron que las ratas perdieron peso y que la poliuria se presentó dentro de las primeras 24 horas. La poliuria es un signo comúnmente observado en el daño renal (66-68). Se ha investigado la patogénesis de la poliuria para determinar si es una consecuencia del daño renal o si es secundaria a cambios homeostáticos en la función renal como resultado de la reducción en la función de la nefrona. Varias evidencias sugieren que la poliuria en el daño renal es secundaria al mecanismo adaptativo de la cantidad de solutos en la nefrona (66). En humanos se ha reportado que un daño severo da origen a la oliguria pero cuando este daño es menos severo puede resultar en poliuria (66).

En este trabajo la proteinuria se desarrolló a partir del primer día a diferencia de los resultados de Blantz (23) en donde la proteinuria se desarrolló durante el segundo y tercer día, y de los estudios de Bencosme *et al.* (58) en donde no hubo diferencia de proteínas respecto al grupo control el primer día pero se alcanza un máximo de proteínas en orina el cuarto día.

Con la técnica de electroforesis se encontró que la albúmina es la proteína plasmática que más se pierde en este tipo de daño renal. Lo que sugiere que el tipo de proteinuria que se observa en este modelo puede ser tubular debido a que el túbulo proximal dañado es incapaz de reabsorber la pequeña cantidad de albúmina que normalmente pasa al espacio urinario. Por otra parte, el intenso daño al túbulo proximal trae como consecuencia

que se liberen a la orina en forma abundante enzimas presentes normalmente en los túbulos y proteínas de bajo peso molecular que normalmente pasan el filtrado glomerular. Las proteínas presentes en los túbulos se utilizan para diagnosticar daño al túbulo proximal renal (20,28). De hecho, la actividad de la ECA en orina aumentó a partir del primer día permaneciendo elevado hasta el quinto día.

En ratas con daño al túbulo proximal producido con CCl_4 , la ECA urinaria aumentó los días 1-3 (43a).

Estos resultados están de acuerdo con los estudios previamente realizados por diversos investigadores en humanos, que cursan con daño al túbulo proximal como por ejemplo aquellos con infecciones de las vías urinarias altas (16,41), nefrolitiasis (16,41), diabetes mellitus (48a) y rechazo crónico del riñón transplantado (48b). Estos datos en humanos y los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la ECA puede ser un marcador de daño al túbulo proximal.

Así como la ECA, se han utilizado otras enzimas para diagnosticar enfermedades urorenales como es la DAP IV y la NAG, mismas que se cuantificaron en este estudio encontrando lo siguiente: la DAP IV incrementó su actividad a partir del primer día y alcanzó un pico máximo el segundo día, a diferencia de la NAG, cuya actividad se incrementó a partir del primer día alcanzando un máximo el cuarto día. Wolf *et al.* (20) demostraron que la determinación de la DAP IV en orina es de valor clínico y contribuye al diagnóstico de enfermedades renales, debido a que el túbulo proximal es susceptible a daños agudos y crónicos.

La actividad de la ECA en suero se incrementó en el grupo

experimental. El mecanismo por medio del cual se lleva a cabo esto no se conoce; sin embargo, se sabe que el riñón puede influenciar la actividad de la ECA en suero por uno de los siguientes mecanismos: que el riñón enfermo libere cantidades excesivas de enzima a la sangre, o que la actividad elevada sea una consecuencia del daño del riñón para excretar o degradar la enzima (49). Por otra parte, es posible que el incremento en la actividad de la ECA en suero pueda ser consecuencia del aumento en la biosíntesis de la ECA tisular y de su liberación al flujo sanguíneo (55). De hecho, se observó un aumento de actividad de la ECA en pulmón, glándulas adrenales e intestino delgado, permaneciendo sin cambio en cerebro, aorta, riñón, corazón, hígado y testículo a diferencia de los estudios de Pedraza-Chaverri *et al.* (43a) en el modelo con tetracloruro de carbono en el cual se observó una disminución en la actividad de la ECA en pulmón e intestino delgado permaneciendo sin cambio cerebro, corazón, hígado, testículo y riñón, lo que es comparable a lo observado en este modelo de IRA con nitrato de uranilo.

En conclusión, podemos decir que la determinación de la actividad de la ECA puede ser utilizada en laboratorio como una prueba que ayude a diagnosticar el daño al túbulo proximal renal.

VIII CONCLUSIONES

1. La función renal disminuyó como consecuencia del daño al túbulo proximal con el nitrato de uranilo.
2. El incremento en la excreción urinaria de la ECA probablemente se deba a su liberación del proximal, como consecuencia del daño por nitrato de uranilo.
3. El aumento en la excreción urinaria de NAG y DAP IV confirma el daño al túbulo proximal por el nitrato de uranilo.
4. Las proteínas y enzimas liberadas a la orina son consecuencia del daño que sufrió el borde en cepillo del túbulo proximal, lo que se confirma al no haber cambio en las proteínas en suero respecto al grupo control.
5. La determinación de la ECA urinaria puede ayudar en el diagnóstico de enfermedades que cursan con daño al túbulo proximal renal.

IX REFERENCIAS

1. Piriyova B, Girchev R. Converting enzyme activity in regulation of blood pressure and kidney function. *Cor Vasa* 26: 401-407, 1984.
2. Patchett A, Cordes EH. The design and properties of N-carboxyalkyl dipeptides inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Adv Enzymol* 57: 1-84, 1985.
3. Brenner BM, Rector Jr FC. *The Kidney*. 4th Ed. WB Sanders Co. Philadelphia, Cap. 24, 1991.
4. Soffer RL. *Biochemical Regulation of blood pressure*. Ed. John Wiley & Sons. New York, 1981.
5. Laragh JH, Brenner BM. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Raven Press; Ltd. New York, 1990.
6. Erdős EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 56: 345-348, 1987.
7. Erdős EG. The angiotensin I converting enzyme. *Fed Proc* 36: 1760-1764, 1977.
8. Ikemoto F, Song GB, Tominaga M, Kanayama Y, Yamamoto K. Angiotensin converting enzyme predominates in the inner cortex and medulla of the rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 144: 915-921, 1987.
9. Romer FK, Schmitz O. Angiotensin-converting enzyme activity in renal disorders: Influence of disease patterns, hemodialysis and transplantation. *Clin Nephrol* 21: 178-183, 1984.
10. Alhenc-Gelas F, Baussant T, Hubert C, Soubrier F, Corvol P. The angiotensin converting enzyme in the kidney. *J Hypertens* 7: 9-14, 1989.
- 10a. International Union of Biochemistry, *Enzyme Nomenclature*. Academic Press Inc, 606: 1978.
11. Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Serum angiotensin converting enzyme activity in experimental models of rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 17: 391-399, 1990.
12. Ellis-Horwood. *Neuropeptides and their peptidases*. Ed by Turner AJ, Chichester, England, 1987.
13. Schönherr E, Jones GA, Slakey L. Gastric and salivary mucins inhibit angiotensin-converting enzyme. *Biochem J* 286: 425-433, 1992.
14. Song GB, Tominaga M, Kenayama Y, Ikemoto F, Yamamoto K. Enhancement of angiotensin-converting enzyme activity in the inner cortex of rat kidney by captopril. *Renal Physiol Biochem*

11: 43-49, 1987.

15. Ikemoto F, Song GB, Tominaga M, Kanayama Y, Yamamoto K. Regional distribution of angiotensin converting enzyme in the rat kidney. *Kinins-V, part A* 169-174, 1989.

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

17. Cushman DW, and Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin- converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648, 1971.

18. Brenner BM, Lazarus JM. Renal circulatory and nephron function in experimental acute renal failure. *En Acute Renal Failure*. 2nd. ed. Ed. Churchill Livingstone, NY, 1988.

19. Heins J, Welker P, Schönlein, Born I, Hartrodt B, Neubert K, Tsuru D, Barth A. Mechanism of proline-specific proteinases: (1) substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney and proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Biochem Biophys Acta* 954: 161-169, 1988.

20. Wolf G, Scherberich JE, Nowack A, Stein O, Schoppe W. Urinary excretion of dipeptidyl aminopeptidase IV in patients with renal diseases. *Clin Nephrol* 33: 136-142, 1990.

20a. Jung K, Mattlenheimer, Burchardt U. Urinary enzymes in clinical and experimental medicine. Springer-Verlag. Germany, pp. 118-119, 1992.

20b. Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 69: 85-91-1976.

20c. Sánchez-Bernal C, Vlitos M, Cabezas JA, Price RG. Variation in the isoenzymes of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and protein excretion in aminoglycoside nephrotoxicity in the rat. *Cell Biochem Function* 9: 209-214, 1991.

21. Brenner BM, Lazarus JM (1988). *Acute Renal Failure*. 2nd. ed. Churchill Livingstone, NY. Cap. 2,3,20.

22. Oliver J. The histogenesis of chronic uranium nephritis with especial reference to epithelial regeneration. *J Exp Med* 21: 425-451, 1915.

23. Blantz RC. The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 55: 621-635, 1975.

24. Oliver JM, MacDowell M, Tracy A. The pathogenesis of acute renal failure associated damage with traumatic and toxic injury: Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin*

Invest 30: 1307-1351, 1951.

25. Stein JH, Gottschalk J, Osgood RW, Ferris TF. Pathophysiology of a nephrotoxic model of acute renal failure. *Kidney Int* 8: 27-41, 1975.

26. Brenner BM, Lazarus JM. Morphologic factors in acute renal failure de Acute Renal Failure. 2nd. ed. Ed. Churchill Livingstone, NY (1988).

27. Stein JH, Lifschitz MD, Barnes LD. Current concepts on the pathophysiology of acute renal failure. *Am J Physiol* 234: 171-181, 1978.

28. First MR, Sloan DE, Pesce AS, Pollak VE. Albumin excretion by kidney: The effect of volume expansion. *J Lab Clin Med* 88: 22-29, 1977.

29. Ludwig C, Beitrage zur Lehre von. Mechanismus der Harnsekretion, Elwert, Marburg, 1843,1.

30. Walker AM, Blott AP, Oliver J, MacDonald MC. The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. *Am J Physiol* 134, 580, 1941.

31. Walker. Comparison of total molecular concentration of glomerular urine and blood plasma from the frog and necturus. *J Biol Chem* 87: 499, 1930.

32. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem* 35: 755-765, 1989.

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

34. Wibell L. Aspects on tubular proteinuria. *Uppsala J Med Sci.* 90: 5-14, 1985.

35. Werner M, Heilbron DC, Maruhn D. Pattern of urinary enzyme excretion in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 29: 437-499, 1970.

36. Mattenheimer H. Enzymes in renal diseases. *Ann Clin Lab Sci* 7: 4122-433, 1977.

37. Vanderlinde RL. Urinary enzymes measurements in the diagnosis of renal disorders. *Ann Clin Lab Sci* 11: 189-201, 1981.

38. Price RG. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal diseases. *Toxicol* 23: 99-134, 1982.

39. Guder WG. Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* 26: 101-111, 1984.

40. Sánchez-Bernal C, Vlitos M, Cabezas JA, Price RG. Variation in the isoenzymes of N-acetyl- β -D-glucosaminidasa and protein

excretion in aminoglycoside nephrotoxicity in the rat. *Cell Biochem Funct* 9: 209-214, 1991.

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

42. Heinle H, Wendel A, Schmidt U. The activities of the key enzymes of the gamma-glutamyl cycle in microdissected segments of rat nephron. *FEBS Lett* 73: 220-22, 1977.

43. Sudo J. Distributions of peptidases in the metabolism of peptide hormones, particularly angiotensin II, along the isolated nephron of the rat. *Folia Pharmacol Jap* 78: 27-44, 1981.

43a. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Hernández-Pando R, Santana T, Arévalo AE, González L, Tapia E, Peña JC, Panduro A. Angiotensin I-converting enzyme activity in rats with tetrachloride-induced acute renal failure. *Renal Failure* 15: 19-26, 1993.

44. Ujjiek, Tomita K, Owada A, Matsui N, Marumo F. Angiotensin-converting enzyme activity as a prognostic factor in acute renal failure. *Nephron* 58: 443-449, 1991.

44a. Shultz T, Miller WC, Bedrossian CW. Clinical application of measurement of angiotensin-converting enzyme level. *JAMA* 3, 242, 5, 1979.

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

46. Silverstein E, Friedland J. Elevated serum and spleen angiotensin-converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 74: 21-25, 1977.

47. Lieberman J, Rea TH. Serum angiotensin-converting enzyme in leprosy and coccidioidomycosis. *Ann Intern Med* 87: 422-425, 1977.

48. Schweisfurth H, Wernze H. Changes of serum angiotensin I-converting enzyme in patients with viral hepatitis and liver cirrhosis. *Acta Hepatogastroenterol* 26: 207-210, 1979.

48a. Hosojima H, Miyauchi E, Morimoto S. Urinary excretion of angiotensin-converting enzyme in NIDDM patients with nephropathy. *Diabetes Care* 12: 580-582, 1982.

48b. 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 Pharmaceut Biomed Anal* 4: 677-683, 1986.

49. Pale R, Ansari A. Serum angiotensin converting enzyme activity in patients with chronic renal failure on long term

- hemodialysis. Clin Chim Acta 92: 491-495, 1979.
50. Das M, Hartley JL, Soffer RL. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to pulmonary enzyme. J Biol Chem 252: 1316-1319, 1977.
51. Cambien F, Alhenc-Geas F, Herbeth B. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme levels. The Nancy study. Am J Hum Genet 43: 774-780, 1988.
52. Pedraza-Chaverri J, Herrero B, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Lack of correlation between human serum angiotensin converting enzyme activity and the renin-angiotensin-aldosterone system. Clin Chim Acta 190: 105-106, 1990.
53. Ibarra-Rubio ME, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Kinetic and inhibitory characteristics of serum angiotensin-converting enzyme from nine mammalian species. Comp Biochem Physiol 92 B: 399-403, 1989.
54. Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Hubert C, Lattion AI, Corvol P. The angiotensin I- converting enzyme (kininase II): Progress in molecular and genetic structure. J Cardiovasc Pharmacol 15 (Suppl. 6), 25-29, 1990.
55. Pedraza-Chaverri J, Maciel A, Cruz C, Peña JC. Captopril magnifies the increase in angiotensin I- converting enzyme activity in rats with aminonucleoside nephrosis. Clin Exp Pharmacol Physiol 19: 439-445, 1991.
56. Yatsumoto H, Inai Y, Kusuya N, Uchimura H, Matsuzaki F. Increased levels of serum angiotensin-converting enzyme activity in hyperthyroidism. Ann Intern Med 96: 326-328, 1982.
57. Kokubu T, Ueda E, Ono M, Kawaba T, Hayashi Y, Kan T. Effect of captopril (SQ 14225) on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal rats. Eur J Pharmacol 62: 269-275, 1980.
58. Bencosme SE, Stone RS, Latta H, Madden SC. Acute tubular and glomerular lesions in rat kidney after uranium injury. AMA Arch Pathol 69: 470-476, 1960.
59. Suzuki Y, Okada T, Hara M, Miura K, Naiki S, Sakuragawa N. Rapid differentiation between glomerular and tubular proteinuria by high-performance liquid chromatography. Clin Nephrol 24: 138-141, 1985.
60. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Ranall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.
61. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri. Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. Clin Chim Acta 191: 175-184,

1990.

62. Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S, Nakagawa Y, Takemoto T. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem* 74: 466-476, 1976.

63. Wolf G, Scherberich JE, Nowack A, Stein O, Schoeppe W. Urinary excretion of dipeptidyl aminopeptidase IV in patients with renal diseases. *Clin Nephrol* 33: 136-142, 1990.

64. Skrha J, Perusicova J, Stolba P, Stibor V, Páv J. Comparison of N-acetyl- β -glucosaminidase and albuminuria with clinical findings of microangiopathy in type I diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 69: 85-91, 1976.

65. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical chemistry*. Second Ed. The C.V. Mosby Company. St. Louis, Missouri, USA. p. 62-63, 1989.

66. Kaneko J.J. *Kidney Function de Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th. Ed. Academic Press Inc, USA, 496-537, 1989.

67. Valtin H, *Renal Function*. Little, Brown and Company, 2nd. Ed. USA, 57-83, 1972.

68. Brenner, Coe F, Rector F. *Renal Physiology in Health and Disease*. W.B. Saunders Company, 43-56, 1987.