

03068 7  
26



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGIA  
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL C.C.H.**

**EFFECTO DE DIVERSOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS  
NIVELES CIRCULANTES Y URINARIOS DE  
ANGIOTENSINOGENO, ASI COMO EN EL  
CONTENIDO HEPATICO DE SU ARNm EN  
RATAS NEFROTICAS**

**T E S I S**  
Que para obtener el Grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**  
**p r e s e n t a**

**OMAR NOEL MEDINA CAMPOS**

**MEXICO, D. F.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Neurología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri.

**Comité tutorial:**

**Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. Carmen Clapp Jiménez, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dra. Alejandra Mainero del Paso y M. en C. María Elena Ibarra Rubio.**

Este trabajo fue apoyado parcialmente por un donativo del Fondo de Estudios e Investigaciones "Ricardo J. Zevada".

Agradezco a la DGAPA la beca otorgada para dedicarme de tiempo completo a este trabajo.

ÍNDICE.	
RESUMEN.	vi
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA).	1
1.2. SÍNDROME NEFRÓTICO (SN).	2
1.3. ANGIOTENSINÓGENO (Ao).	3
1.4. ANTECEDENTES INMEDIATOS.	4
2. OBJETIVOS.	7
3. HIPÓTESIS.	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS.	8
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	8
4.1.1. INDUCCIÓN DEL SÍNDROME NEFRÓTICO.	8
4.1.2. TRATAMIENTOS.	8
4.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.	8
4.2.1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (CPA) Y EXCRECIÓN URINARIA DE ANGIOTENSINÓGENO (EUA).	9
4.2.2. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RENINA (CPR).	9
4.2.3. PROTOCOLO PARA EL RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA) DE ANGIOTENSINA I (AI).	9
4.2.3.1. CÁLCULO DE RESULTADOS DEL RIA.	11
4.2.4. ALBÚMINA.	11
4.2.5. COLESTEROL.	11
4.2.6. CREATININA.	11
4.2.7. NITRÓGENO DE UREA.	11
4.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	12
4.3.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.	12
4.3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN.	13
4.3.2. DETERMINACIÓN DEL ARNm DE Ao Y DE $\beta$ -ACTINA.	13
4.3.2.1. TÉCNICA DE "NORTHERN BLOT".	13
4.3.2.1.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%.	14

4.3.2.1.2. TRANSFERENCIA DEL ARN A LA MEMBRANA DE HIBRIDACIÓN	15
4.3.2.2. TÉCNICA DE "SLOT BLOT".	17
4.3.2.3. MARCAJE DE SONDAS.	18
4.3.2.4. PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN.	19
4.3.3.5. LAVADO DE LA SONDA NO HIBRIDADA A LA MEMBRANA.	19
4.3.3.6. AUTORADIOGRAFÍA.	20
4.3.3.7. DENSITOMETRÍA.	20
4.3.3.8. CÁLCULO DE LOS NIVELES DE ARNm.	20
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	24
5. RESULTADOS.	22
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SN Y EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE ESTOS PARÁMETROS	22
5.2. ANGIOTENSINÓGENO Y RENINA PLASMÁTICAS EN EL SN Y EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE ESTAS VARIABLES	25
5.2.1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RENINA.	25
5.2.2. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ANGIOTENSINÓGENO (CPA).	26
5.2.3. EXCRECIÓN URINARIA DE ANGIOTENSINÓGENO (EUA).	27
5.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ARNm DE Ao.	28
5.3.1. "NORTHERN BLOT".	28
5.3.2. "SLOT BLOT".	29
5.3.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE Ao.	30
6. DISCUSIÓN.	32
7. RESUMEN DE RESULTADOS.	37
8. CONCLUSIONES.	38
9. BIBLIOGRAFÍA.	39
10. APÉNDICE A. REACTIVOS.	48
11. APÉNDICE B. PREPARACIÓN DE LA AI-125.	51
12. APÉNDICE C. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA SONDA MARCADA.	52

## RESUMEN.

El SN inducido en ratas con la administración subcutánea del aminonucleósido de puromicina (ANP) es un modelo experimental de la enfermedad de cambios mínimos que se presenta en humanos y que se caracteriza, principalmente, por proteinuria y por alteraciones en la concentración de diversas proteínas circulantes. Por ejemplo, la concentración plasmática de angiotensinógeno (CPA) disminuye y su excreción urinaria (EUA) aumenta al igual que la concentración plasmática de renina (CPR). Se ha postulado que la disminución de la CPA es resultado de la elevada EUA y de su consumo por renina (debido al aumento en la CPR), sin embargo, en este modelo experimental no se han estudiado las posibles alteraciones en la expresión del gen de angiotensinógeno (Ao) y su respuesta a diversos factores que la regulan en condiciones normales.

Con este objetivo se determinaron la CPA, la CPR y la EUA mediante radiomunoanálisis de angiotensina I (AI) y los niveles hepáticos del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de Ao mediante las técnicas de "Northern blot" y "slot blot" en ratas controles, nefróticas, y controles y nefróticas sometidas a los siguientes tratamientos: dexametasona (DEX), etinil-esiradiol (EE), nefrectomía (NX), triyodotironina (T3), captopril (CAP) y adrenalectomía (ADX).

Al octavo día de la administración del ANP, las ratas nefróticas presentaron todas las características del SN, incluyendo la disminución en CPA ( $382 \pm 142$  vs.  $888 \pm 152$  ng AI/mL/h) y los aumentos en CPR ( $26.7 \pm 6.8$  vs.  $11.5 \pm 2.6$  ng AI/mL/h) y EUA ( $4.02 \pm 1.86$  vs.  $0.101 \pm 0.064$  µg AI/24h). El análisis mediante "Northern blot" mostró la integridad del ARN total, así como la identidad del ARNm de Ao (1760 nucleótidos). Mediante la técnica de "slot blot" se encontró que las ratas con SN no presentan alteraciones en los niveles hepáticos del ARNm de Ao y que la respuesta a los diferentes estímulos fue similar en ratas controles y en ratas nefróticas. Los resultados tanto de CPA (n = 8-10) como del ARNm (n = 6-8), expresados como cambios porcentuales respecto a su basal, fueron los siguientes:

	CONTROLES		NEFROTICOS	
	CPA	ARNm	CPA	ARNm
DEX	↑ 223±20	↑ 216±51	↑ 274±80	↑ 234±43
EE	↑ 237±20	↑ 183±23	↑ 341±40	↑ 229±17
NX	↑ 254±40	↑ 227±35	↑ 247±70	↑ 262±47
T3	↑ 204±30	↑ 266±24	↑ 164±40	↑ 270±83
CAP	↓ 47±10	SIN CAMBIO	↓ 31±10	SIN CAMBIO
ADX	↓ 51±12	↓ 27±2	SIN CAMBIO	↓ 41±7

En las ratas nefróticas los cambios en la CPA se reflejaron en la EUA, a excepción de los grupos tratados con T3 y ADX. La CPR de las ratas controles aumentó con CAP y ADX y disminuyó con NX, mientras que en ratas con SN los niveles de CPR aumentaron aún más con DEX y CAP y disminuyeron con NX y ADX.

Se concluye que la disminución en CPA en el síndrome nefrótico no se debe a cambios en los niveles hepáticos del ARNm de esta proteína ni a alteraciones en la capacidad de respuesta del gen a los tratamientos estudiados en el presente trabajo. Los únicos factores documentados hasta ahora para explicar esta disminución son su elevada excreción urinaria y su elevada degradación por los altos niveles de renina circulante.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA).

El sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los principales reguladores de la presión arterial y del equilibrio hídrico y electrolítico (1). Los componentes de este sistema son: a) angiotensinógeno (Ao), b) renina, c) angiotensina I (AI), d) enzima convertidora de AI (ECA), e) angiotensina II (AII), f) angiotensina III (AIII) y g) angiotensinasas.

La enzima renina cataliza la hidrólisis del Ao para originar la AI, este deca péptido es hidrolizado por la ECA, una dipeptidil-carboxipeptidasa produciéndose el octapéptido AII, el cual se une a receptores en la superficie celular de diferentes órganos e induce una gran variedad de efectos biológicos como: vasoconstricción, sensación de sed, gluconeogénesis, estimulación de la secreción de aldosterona y de catecolaminas, de prolactina, de hormona adrenocorticotrópica y de Ao e inhibición de la secreción de renina (2-4). La AII es convertida a AIII por la acción de la angiotensinasa A. Esta última enzima actúa también sobre la AI eliminando el residuo ácido aspártico para originar el nonapéptido des-ácido aspártico-angiotensina I (des-Asp<sup>1</sup>-AI) que luego es transformado por la ECA en AIII. Finalmente, un conjunto de enzimas denominadas angiotensinasas degradan a la AIII en fragmentos inactivos (figura 1).

### COMPONENTES DEL SRA

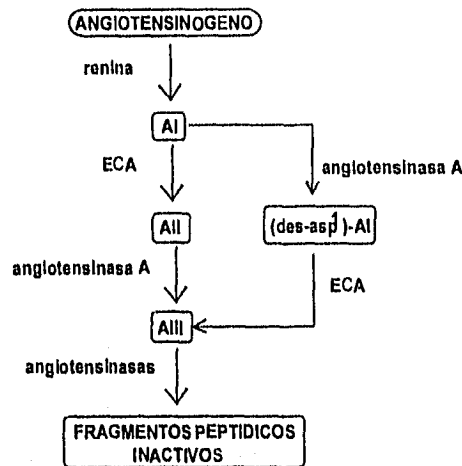


Figura 1. Componentes del sistema renina-angiotensina.

Esta cascada bioquímica ha sido considerada tradicionalmente como un sistema endocrino porque varios de sus componentes se originan en diferentes órganos y su proteína efectora, la AII, es conducida por el torrente circulatorio a su sitio de acción. Sin embargo, evidencias bioquímicas y moleculares indican la existencia



de varios SRA locales en órganos como cerebro, vasculatura, corazón, riñón, testículo, intestino, pulmón, glándulas adrenales, ovario y tejido adiposo, entre otros (5-9). La AI generada en estos SRA locales podría regular el flujo sanguíneo en regiones específicas de estos órganos modificando el tono vascular.

## 1.2. SÍNDROME NEFRÓTICO (SN).

El SN es un padecimiento que se presenta en humanos de todas las edades cuyo origen puede ser primario (idiopático), o secundario (consecuencia de otras enfermedades como lupus eritematoso, diabetes mellitus y alergias entre otros desórdenes) (10). El daño principal en el SN es la alteración en la estructura de la barrera de filtración glomerular, lo que provoca la pérdida de proteínas por vía urinaria. A consecuencia de esta pérdida se originan otras anomalías como: hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, retención de sodio, alteraciones en el metabolismo de muchas proteínas plasmáticas, hipercoagulabilidad y tromboembolismo, alteraciones en el sistema inmunitario, ascitis y edema (11-18). El SN puede ser inducido experimentalmente por modelos de tipo inmunológico al inyectar anticuerpos dirigidos contra antígenos de riñón o por modelos de tipo químico administrando adriamicina o aminonucleósido de puromicina (ANP), que es un derivado del antibiótico puromicina (19). Del SN inducido por ANP se han descrito 2 modelos, el agudo y el crónico. El modelo agudo es reversible y se presenta luego de una sola inyección con una dosis de ANP de 50 a 150 mg/Kg de peso corporal que desencadena una proteinuria masiva y las características típicas del SN. Al cabo de unas semanas la proteinuria disminuye hasta desaparecer. El modelo crónico se produce con inyecciones periódicas de ANP con dosis menores a las del modelo agudo y el daño provocado es irreversible.

Se ha postulado que el daño renal que ocasiona el ANP se debe a los radicales libres producidos durante su metabolismo, los cuales causan daño estructural y una reducción en la carga negativa de las células epiteliales del glomérulo (20), lo que se traduce en la lesión característica del SN que es la fusión de los podocitos (21). Esto hace que se presente proteinuria, cuya magnitud puede provocar que la concentración de proteínas en la orina (30-40 mg/ml) sea la misma que en suero (22). La concentración plasmática de una proteína depende de las siguientes variables: a) velocidad de síntesis, b) catabolismo y c) pérdida urinaria. Se ha observado que en el SN la velocidad de síntesis de muchas proteínas aumenta (23-27) aunque la de otras no cambia (23,27) lo que indica que el mecanismo de regulación de síntesis proteica en el SN no es el mismo para todas las proteínas. También se ha encontrado que los cambios de los niveles plasmáticos de una proteína no permiten predecir los cambios que ocurren en los niveles de su ARNm o en la velocidad de transcripción, ni si aumentará su pérdida por vía urinaria tal y como lo han demostrado Sun *et al.* (27) al estudiar en el síndrome nefrótico diferentes proteínas. Ellos encontraron que los niveles circulantes de fibrinógeno y los niveles hepáticos de su ARNm aumentan, así como su índice de transcripción, sin embargo su excreción urinaria no cambió. Los cambios que encontraron al estudiar la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 fueron diferentes puesto que su concentración plasmática disminuyó y su excreción urinaria aumentó sin que se hayan modificado los niveles hepáticos de su ARNm y su índice de transcripción. La última proteína que estudiaron fue la albúmina cuyos niveles circulantes disminuyeron mientras que su excreción urinaria, el contenido hepático de su ARNm y su índice de transcripción aumentaron.

Entre las proteínas que se pierden por orina en el SN, se encuentran la albúmina (23,28,29), proteínas transportadoras de vitamina D (30,31), unidoras de metales y hormonas (32-36), transferrina (32,33), inmunoglobulinas (37,38), factores promotores e inhibidores de la coagulación (23,39-41) y entropoyetina (42,43). Varios reportes indican que esta proteinuria no es selectiva puesto que se pierden proteínas de peso molecular bajo, intermedio y alto (44,45).

El SRA en el SN presenta muchas alteraciones, por ejemplo, la actividad y la concentración plasmática de renina (APR y CPR respectivamente), la actividad de la ECA y los niveles de aldosterona muestran incrementos y la concentración plasmática de Ao (CPA) disminuye (46-48). Además se ha demostrado que la renina, el Ao y la ECA se pierden por la orina (49-51).

**1.3. ANGIOTENSINÓGENO.**

La proteína de estudio en este trabajo, el Ao, es una  $\alpha$ -2 globulina sintetizada principalmente por el hígado, y su sitio de reserva es el plasma (52). Además del hígado, otros sitios de síntesis son cerebro, tejido adiposo café, riñón y adrenales entre otros (53-56) (Tabla 1). El peso molecular del Ao es de 55 a 60 kDa y se secreta de manera constitutiva. En la rata, la estructura de aminoácidos deducida a partir de la clonación de su ADNc (57) indica que de los 452 aminoácidos aproximadamente el 20% son idénticos en naturaleza y posición a los de algunos miembros de la superfamilia de proteínas denominadas inhibidoras de proteasas de serina:  $\alpha$ -1-antitripsina,  $\alpha$ -1-antiquimiotripsina, antitrombina III, globulinas acarreadoras de corticosteroides y de hormonas tiroideas, el cofactor de la heparina y la ovoalbúmina, así que tal vez esta proteína posea otra función además de la de ser sustrato de la renina (58).

Tabla 1. Distribución del ARNm de Ao de rata. Estas concentraciones se determinaron mediante densitometría y los porcentajes se calcularon tomando como el 100% a la cantidad de ARNm de Ao presente en el hígado (Ref. 52).

TEJIDO	ARNm de Ao (100%)
HIGADO	100
CEREBRO	3-30
TEJIDO ADIPOSO	5
RINÓN	1.6-5
ADRENAL	1-5
VASOS	1-2
PULMÓN	0.3-1
OVARIO	3-4
CORAZÓN	0.5-5
BAZO	0-4

Se han publicado variaciones en los niveles plasmáticos de Ao en diversas condiciones fisiológicas y patológicas, por ejemplo, se han observado altos niveles de esta proteína en hipercorticismos (59), inflamación

(60), embarazo y terapias anticonceptivas (61), y bajos niveles asociados con insuficiencia adrenal (62) y con tratamientos antihipertensivos (63). Aún se discute la causa de las variaciones en la CPA; la mayoría de los autores postulan que estas variaciones se deben a modificaciones en la expresión del gen de Ao reguladas por factores hormonales como glucocorticoides, estrógenos, prostaglandinas, insulina, AI y hormonas tiroideas, entre otros y que dichas variaciones no son consecuencia de los cambios en los niveles de renina. Por ejemplo Bing y Poulsen (64) y Taleishi *et al.* (65) observaron un aumento de la CPA en ratas blinefrectomizadas a pesar de la inyección de renina, Freeman y Rostorfer (66) observaron que al añadir actinomicina D a un sistema de hepatocitos se bloqueó por completo el aumento de Ao; Radziwill *et al.* (67) informaron que en ratas con hipertensión Goldblatt los niveles de renina permanecieron elevados durante lapsos largos de tiempo sin que la CPA se modificara; Page y McCubbin (68) informaron que en ratas, después del parto, la CPA permaneció baja en tanto que la renina regresó a niveles normales; Dzau y Hermann (69) han reportado que en ratas hipertiroideas o hipotiroideas hay variaciones en la CPA sin que se modifiquen los niveles de APR y de CPR; Gotoh *et al.* (69) han mostrado que la destrucción del núcleo paraventricular causa la disminución de CPA sin afectar la APR. En conjunto, estos informes indican que la disminución en CPA se debió principalmente a la reducción de su secreción hepática y no a la degradación de Ao por la renina.

Otros autores, sin embargo, indican que las variaciones en la CPA se deben a la acción de la renina sobre el Ao (71). Por ejemplo, se ha informado que la administración repetida de inhibidores de la ECA induce un aumento de la renina y AI plasmáticas así como una disminución de la CPA. El aumento de renina sugiere que esta enzima hidroliza al Ao a una velocidad más alta que a la que esta proteína se sintetiza en el hígado (63,67,72). La adrenalectomía disminuye la CPA, pero se ha informado que no produce cambios en la síntesis del Ao ni en su ARNm (73,74), por lo que es posible que la disminución en la CPA se deba probablemente a un aumento en su degradación enzimática, lo cual coincide con el aumento en los niveles de renina y de AI (75).

Hasta ahora se ha demostrado claramente que la administración de glucocorticoides, estrógenos y hormonas tiroideas aumentan los niveles hepáticos del ARNm de Ao (52,76-79), al igual que la nefrectomía (52,80), mientras que aún no está claro el efecto de la adrenalectomía sobre los niveles del ARNm de Ao ya que hay informes que indican que causa una disminución en este ácido nucleico (78,81) y otros trabajos informan que no lo afecta (73,74,77). También se ha informado que los inhibidores de la ECA disminuyen el contenido hepático del ARNm de Ao (82,83).

#### 1.4. ANTECEDENTES INMEDIATOS.

Una de las líneas de investigación de nuestro grupo de trabajo ha sido el estudio de las alteraciones metabólicas del SN inducido por ANP. Este modelo presenta similitudes con la enfermedad de cambios mínimos que se presenta en humanos por lo que es de gran ayuda para tratar de entender los mecanismos bioquímicos y fisiológicos del SN.

Algunas de las alteraciones típicas de esta enfermedad y cuyos mecanismos no están completamente dilucidados son los aumentos en la retención de sodio y agua, los que conllevan a la formación de edema y ascitis. Como ya se mencionó en la introducción, el SRA es el responsable de la homeostasis del sodio y del agua mediante la generación de la AI, la cual participa en esta acción de manera indirecta a través de la

estimulación de la liberación de la aldosterona por las glándulas suprarrenales y de manera directa a nivel de túbulo renal.

El estudio del SRA se inició al investigar si la retención de sodio que ocurre en el SN era consecuencia de la activación de este sistema hormonal (46). Para comprobar lo anterior, se estudió diariamente durante 21 días la retención de sodio y los cambios en los componentes del SRA en las ratas inyectadas con ANP. Estos animales presentaron proteinuria a partir del día 4 y retención de sodio los días 2 a 7. El SRA se activó el día 4 manifestándose por el aumento de renina circulante (actividad y concentración plasmática de renina). Con estos datos se concluyó que la retención de sodio precede a la activación del SRA, y que por lo tanto, este último no es responsable de la retención de sodio en este modelo experimental de SN.

Posteriormente se estudió si la inhibición del SRA por captopril (un inhibidor de la ECA, y por lo tanto de la generación de Ang II), modificaba el patrón de retención de sodio en estas ratas. Sin embargo, este inhibidor no produjo ninguna alteración en el perfil diario de la retención de sodio (48). En este trabajo subsecuente también se alcanzó la misma conclusión: El SRA no es responsable de la retención de sodio en el SN.

En este modelo experimental también se encontró que otros componentes del SRA se alteran: la enzima convertidora de Ang I aumenta mientras que la concentración plasmática de angiotensinógeno (substrato de renina) disminuye. Estos datos del comportamiento en circulación de las proteínas recién mencionadas nos condujo a investigar el mecanismo por medio del cual la concentración de las mismas cambia. En primer lugar estudiamos si estas proteínas se pierden por orina, encontrándose que tanto la renina como la ECA y el Ang II aparecen en ésta. Llama la atención que mientras estas tres proteínas se pierden en la orina su comportamiento en circulación no es el mismo: renina y ECA aumentan y Ang II disminuye. Esto significa que no se puede predecir el comportamiento en plasma de una proteína en SN a partir del dato de su excreción urinaria. Por otra parte estos datos también indican que a pesar de la disminución de las proteínas totales en el SN, la concentración de algunas proteínas específicas puede aumentar.

Ya que la concentración de una proteína depende al menos de su síntesis, catabolismo, distribución y pérdidas corporales (por ejemplo en la orina), es evidente que no conocemos todos estos parámetros para las proteínas del SRA y que por lo tanto no conocemos el mecanismo por medio del cual éstas cambian. En el caso particular del Ang II, cuyos niveles circulantes están bajos y su excreción urinaria está elevada en el SN, no tenemos información acerca de su síntesis ni de su catabolismo. Por lo tanto, continuando con esta línea de investigación, en este trabajo se estudia la expresión del gen de Ang II en ratas controles y nefróticas y su regulación por diversos tratamientos, los cuales en ratas normales afectan los niveles circulantes de esta proteína y el contenido hepático de su ARNm.

Los niveles basales de este ARNm específico nos permitirán conocer si existen diferencias en la expresión del gen de Ang II que nos permitan deducir si hay cambios en la síntesis de esta proteína.

La respuesta a los diferentes tratamientos permitirá conocer si las ratas nefróticas son capaces de responder a estos estímulos y si existe una alteración en la modulación de la expresión del gen de Ang II.

Además en estas mismas ratas se medirán:

- a) Los niveles circulantes y la excreción urinaria de Ang II y
- b) La concentración plasmática de renina.

La información acerca de la renina circulante nos permitirá tener un índice parcial del catabolismo de Ao y junto con los datos del ARNm de Ao este trabajo nos permitirá tener una visión más completa del mecanismo de la disminución del Ao en el SN en los siguientes puntos:

- 1) niveles basales del ARNm de Ao,
- 2) Regulación de la expresión del gen hepático de Ao,
- 3) Catabolismo del Ao por renina,
- 4) Pérdida urinaria.

**OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la regulación de los niveles circulantes de Ao y del contenido hepático de su ARNm en el SN experimental.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Determinar si hay diferencias en el contenido hepático del ARNm de Ao entre las ratas normales y nefróticas.

Investigar si el hígado de ratas nefróticas es capaz de responder de la misma forma que el de las ratas normales a factores que regulan el gen de Ao.

**HIPÓTESIS.**

Al presentarse alteraciones importantes en los niveles plasmáticos y urinarios de Ao en el SN, es probable que también existan alteraciones a nivel de la expresión del gen o en la capacidad de respuesta del hígado a factores que regulan esta proteína.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se usaron 220 ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200 g de peso las cuales se subdividieron en grupos de 10 animales cada uno de acuerdo al siguiente esquema de trabajo: 1) control; 2) control + tratamiento; 3) síndrome nefrótico; 4) síndrome nefrótico + tratamiento.

##### 4.1.1. INDUCCIÓN DEL SN.

El SN se indujo mediante una inyección subcutánea única de ANP (Sigma Chem. Co.) a una dosis de 15 mg/100 g de peso corporal. El ANP se disolvió al 2% en solución salina al 0.9%.

Los animales de estudio tuvieron libre acceso tanto al alimento como al agua y se mantuvieron en jaulas metabólicas para obtener muestras de orina de 24 horas. Las ratas nefróticas se sacrificaron 8 días después de la inyección del ANP dado que se ha encontrado que en este día los niveles circulantes de Ao se encuentran disminuidos (46-48). Antes del sacrificio las ratas controles y nefróticas recibieron diferentes tratamientos a los tiempos indicados en el siguiente párrafo. Después del sacrificio por decapitación se obtuvieron plasma, suero y tejido hepático de cada uno de los animales. El plasma, suero y orina se guardaron a -20°C hasta que se realizaran las determinaciones bioquímicas; el hígado extraído se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo en éste hasta iniciar la extracción del ARN total para determinar los niveles del ARNm de Ao y de  $\beta$ -actina.

##### 4.1.2. TRATAMIENTOS.

Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento A) dexametasona (DEX; 10 mg/Kg)(69); tratamiento B) etinil-estradiol (EE; 4 mg/Kg)(69); tratamiento C) triyodotironina (T3; 1 mg/Kg) (84). La administración de estas sustancias se realizó mediante una inyección única y subcutánea 24 horas antes del sacrificio. La DEX y el EE se disolvieron en alcohol al 70% y luego en aceite de cacahuete; la T3 se disolvió en solución salina isotónica. Los 3 agentes se adquirieron de Sigma Chem. Co. Tratamiento D) nefrectomía (NX) 8 horas antes de sacrificar a las ratas (80,85); tratamiento E) el captopril (CAP; Squibbs and Sons) se administró disuelto en el agua de beber a una concentración de 0.5 g/L desde el día de la inyección del ANP hasta el día del sacrificio. Las ratas controles recibieron durante 8 días este tratamiento (48); tratamiento F) adrenalectomía (ADX) 24 horas antes del sacrificio (75). Para realizar la NX y la ADX los animales se anestesiaron con éter.

##### 4.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS:

Las determinaciones bioquímicas fueron las siguientes:

- Concentración plasmática de angiotensinógeno (CPA), de renina (CPR) y de albúmina,
- Excreción urinaria de angiotensinógeno (EUA) y de proteínas totales.
- Concentración sérica de proteínas, colesterol y nitrógeno de urea.

Las determinaciones de CPA, EUA y CPR se realizaron por un radioinmunoanálisis (RIA) de AI generada *in vitro*. Se emplearon anticuerpos anti-AI que fueron preparados y caracterizados en el laboratorio (86). La AI-125 se adquirió de NEN Research Products.

La AI se genera como resultado de la actividad enzimática de la renina sobre el Ao o sustrato de renina. De esta manera, los cambios detectados en los niveles de AI revelan los cambios en los niveles de Ao.

#### **4.2.1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (CPA) Y EXCRECIÓN URINARIA DE ANGIOTENSINÓGENO (EUA).**

En estas determinaciones se adiciona un exceso de renina porcina para agotar el angiotensinógeno presente en las muestras a medir. El protocolo para la generación de AI fue el siguiente:

A una serie de tubos de ensayo de 12 x 75 mm colocados en hielo se adicionaron: 25 µl de plasma u orina, 5 µl de hidroxiquinoleína al 6.6%, 5 µl de dimercaprol al 3.4%, 5 µl de EDTA 0.25 M, 5 µl de renina porcina (Sigma Chem. Co.) y 360 µl de amortiguador de maleatos 0.2 M pH 6.0. Todas las muestras problema se hicieron por duplicado.

Los tubos se incubaron a 37°C durante 1 h, fueron regresados al hielo, se aforó cada uno a 1 mL con amortiguador trizma base 0.1 M pH 7.38 y luego se hizo una dilución 1:10 con este mismo amortiguador. Se tomaron 100 µl para el RIA (Tabla II). Para calcular la EUA se consideró el volumen urinario de 24 h para expresar los resultados como µg AI/dla (49), mientras que la CPA se expresó como ng AI/mL/h.

#### **4.2.2. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RENINA (CPR).**

En esta determinación se midió la AI generada por la acción enzimática de la renina presente en la muestra sobre un exceso de angiotensinógeno (plasma obtenido de ratas binefrectomizadas durante 24 h). El propósito de la adición de un exceso de sustrato fue saturar a la renina.

El protocolo para esta determinación fue el siguiente:

A una serie de tubos de ensayo de 12 x 75 mm colocados en hielo se adicionaron: 50 µl de plasma, 5 µl de hidroxiquinoleína al 6.6%, 5 µl de dimercaprol al 3.4%, 1 mL de amortiguador de maleatos 0.2 M pH 6.0 y 450 µl de sustrato de renina. Al igual que para la determinación de CPA y EUA, las muestras problema se hicieron por duplicado. Este volumen se dividió en 2 alícuotas. Una de ellas se incubó a 37°C y la otra a 4°C (en hielo) durante 1 hora. Los tubos incubados a 37°C fueron regresados al hielo y se tomaron 100 µL para el RIA (Tabla II).

#### **4.2.3. PROTOCOLO PARA EL RIA DE AI.**

El RIA es una técnica que se basa en la competencia de un antígeno marcado y antígeno no marcado por un anticuerpo específico a ese antígeno. Al montar el RIA se construyó una curva patrón en la cual se interpolaron los datos de las muestras problema. Las concentraciones de los patrones usados para construir la curva fueron: 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 y 5.00 ng AI/mL. También se incluyeron tubos para determinar las cuentas totales (CT), la unión no específica (UNE) y la unión máxima (100%). El contador empleado (Gammacord de Micro Medic System) tiene incorporado un "software" que realiza una regresión logit y calcula la concentración de AI presente en cada muestra, expresando los resultados como ng de AI/mL/h.



TABLA II. PROTOCOLO PARA EL RIA DE AI.

	# TUBO	Amortiguador de ensayo	ESTÁNDAR	MUESTRA	AI-125	ANTICUERPO
CUENTAS TOTALES	1 a 4	1.5 mL	---	---	50 $\mu$ l	---
UNIÓN NO ESPECIFICA	5 a 8	0.5 mL	100 $\mu$ l ST 0	---	50 $\mu$ l	---
100 %	9 a 12	---	100 $\mu$ l ST 0	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
0.1 ng AI/mL	13 a 14	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
0.25 ng AI/mL	15 a 16	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
0.5 ng AI/mL	17 a 18	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
1.0 ng AI/mL	19 a 20	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
2.5 ng AI/mL	21 a 22	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
5.0 ng AI/mL	23 a 24	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
CONTROL A	25 a 26	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
CONTROL B	27 a 28	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
CONTROL C	29 a 30	---	100 $\mu$ l	---	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
CPA		---	---	50 $\mu$ l + 50 $\mu$ l ASB	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
CUA		---	---	50 $\mu$ l + 50 $\mu$ l ASB	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
CPR		---	---	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l

CONTROL A = 0.175 ng AI/mL/h.

CONTROL B = 0.75 ng AI/mL/h.

CONTROL C = 3.75 ng AI/mL/h.

ST 0 = 0 ng AI/mL.

ASB = Albúmina sérica bovina grado RIA al 5%.

Después de agregar el anticuerpo:

- Los tubos se agitaron en vórtex 15 seg y se incubaron a 4°C durante 18 h.
- Se añadió 1 mL de carbón activado a cada tubo (a excepción de los tubos de CT) y se agitó en vórtex 15 seg para separar la AI-125 que no se unió al anticuerpo.
- Los tubos se centrifugaron a 2,500 rpm a 4°C durante 15 min.
- El sobrenadante se decantó cuidadosamente a tubos de ensayo de plástico de 12 x 75 mm.
- Los tubos de plástico se contaron en un contador de radiaciones gama durante 2 min.

#### 4.2.3.1. CÁLCULO DE RESULTADOS DEL RIA.

Para las determinaciones de CPA y EUA, las muestras de plasma u orina se diluyeron 1:800, por lo que el resultado obtenido de la regresión logit se multiplicó por 800 para obtener los ng de AI generada por mililitro por hora de incubación. Para la EUA se consideró el volumen urinario de 24 horas expresando el resultado como µg de AI por día.

Para las determinaciones de CPR se restó el valor de la AI generada en los tubos incubados a 4°C al valor de la AI generada en los tubos incubados a 37°C, y el resultado se multiplicó por 30 que es la dilución practicada a la muestra.

**4.2.4. ALBÚMINA.** Para esta determinación se usó una prueba colorimétrica (Sigma Chem. Co.) que es una modificación del método de Doumas (87) y que se basa en la unión del verde de bromocresol a la albúmina, produciéndose un complejo color verde-azul cuya absorbencia máxima es a 628 nm. La intensidad de este color es directamente proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra. Para esta determinación se hizo una curva patrón con estándares de 2, 4, 6 y 8 g/dL para interpolar las muestras problema.

**4.2.5. COLESTEROL.** La determinación de colesterol sérico se realizó utilizando el estuche comercial "monolest® colesterol CHOD-PAP" (Farmacéuticos Lakeside) que es una prueba enzimática colorimétrica. El método se basa en reacciones enzimáticas sobre los ésteres de colesterol y los productos de su hidrólisis para producir un compuesto rojo con absorbencia máxima a 505 nm. Los resultados se expresan como mg/dL.

**4.2.6. CREATININA.** La creatinina se midió por el método de picrato alcalino en un autoanalizador de creatinina 2 de Beckman cuyo fundamento es el siguiente: cuando se inyectan 25 µl de suero en el autoanalizador, la creatinina de la muestra reacciona con el ácido picrico en medio alcalino en una celdilla de reacción y produce un complejo de color rojo. Se mide la velocidad del aumento de absorción debido a la formación del complejo alcalino de picrato de creatinina. La velocidad de formación del complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Los resultados se expresan en mg/dL.

**4.2.7. NITRÓGENO DE UREA.** El nitrógeno de urea se cuantificó en un analizador BUN 2 de Beckman. Este analizador utiliza un método enzimático que mide la velocidad de cambio de la conductividad en la reacción. Se inyectan 10 µL de la muestra con la ureasa en la celdilla de reacción. El resultado de la reacción es la conversión de la especie no iónica (urea) en una iónica (carbonato de amoníaco), la cual aumenta la conductividad de la solución. El electrodo de conductividad del aparato 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. El analizador procesa esta señal y presenta el valor de la concentración de nitrógeno ureico (o urea) en mg/dL en un lector digital.

### 4.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Para esta parte del trabajo se usó el tejido hepático almacenado en nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1.5 ml.

#### 4.3.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.

Debido a que el ARN es muy susceptible a la degradación por ribonucleasas fue necesario evitar la acción de estas enzimas, por lo que se tomaron ciertas precauciones al extraer este ácido nucleico como usar guantes estériles y cambiarlos frecuentemente, usar material de plástico nuevo, estéril y desechable, material de vidrio homoeado a 220°C durante 12 h y esterilizado en autoclave a 15 lbs/pulgada cuadrada, emplear reactivos con grado de biología molecular, usar agua esterilizada en autoclave 20 min a 15 lbs/pulgada cuadrada y agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC; Sigma Chem. Co. EUA) al 0.1% para preparar la mayoría de las soluciones que tuvieran contacto con el ARN. El DEPC es un fuerte inhibidor de ribonucleasas que debe ser usado con precaución debido a su posible actividad como agente cancerígeno. Se procuró que al trabajar con el ARN, éste estuviera siempre en hielo y el menor tiempo posible fuera del congelador de -70°C.

En este trabajo se empleó el reactivo TRIzol™ (GIBCO BRL) para la extracción del ARN total. Este agente es una solución monofásica de fenol y de tiocianato de guanidina, y la técnica empleada es una modificación del método de extracción de una etapa desarrollado por Chomczynski y Sacchi (88). Durante la homogeneización o lisis del tejido, el TRIzol mantiene la integridad del ARN y disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo y la centrifugación separan la solución en una fase acuosa y una fase orgánica. El ARN permanece en la fase acuosa y es recuperado por precipitación con isopropanol. La extracción se hizo de la siguiente manera:

##### a) Homogeneización del tejido hepático.

Antes de iniciar la homogeneización, la cuchilla del politron (Brinkmann Instruments) se sumergió durante 20 min en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lavó con alcohol absoluto, con H<sub>2</sub>O-DEPC y finalmente con agua esterilizada.

- 1.- En un tubo de plástico Falcon de 50 mL se agregó 1 mL de TRIzol.
- 2.- Se pesaron 80 mg de tejido.
- 3.- El tejido se colocó en el tubo con TRIzol y se homogeneizó durante 1 min.
- 4.- El homogeneizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

##### b) Separación en fases:

- 5.- Se añadieron 0.2 mL de cloroformo (Baxter).
- 6.- Se agitó en el vórtex durante 15 seg y se dejaron transcurrir 3 min.
- 7.- Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C (centrífuga refrigerada Jouan MR 1812).
- 8.- El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL con una pipeta Pasteur con bulbo.

##### c) Precipitación del ARN: (A partir de este paso los tubos se colocaron en hielo).

- 9.- Se añadieron 0.5 mL de isopropanol (Fisher Scientific).

10.- El contenido se mezcló invirtiendo suavemente el tubo varias veces.

11.- Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C.

**d) Lavado del ARN:**

12.- El sobrenadante se eliminó por decantación.

13.- Se añadió 1 mL de etanol al 70% (J.T. Baker).

14.- Se agitó en vórtex durante 15 seg.

15.- Se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C.

16.- El sobrenadante se eliminó por decantación.

**e) Disolución del ARN:**

17.- Se secó con centrifugación en vacío durante 1 min ("speedvac").

18.- El botón de ARN se resuspendió en 70 µL de agua esterilizada y se disolvió con ayuda de una micropipeta aspirando y expulsando la solución varias veces.

**4.3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN.**

La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbencia a 260 nm de una alícuota de ARN (2 µL de ARN + 498 µL de agua esterilizada). Una unidad de densidad óptica (D.O.) a 260 nm, equivale a 40 µg de ARN/mL (89). Por lo tanto, para conocer la concentración de ARN en una muestra se usa la siguiente relación:  $\mu\text{g ARN muestra/mL} = (\text{D.O. muestra})(40 \mu\text{g})$

En este trabajo se hicieron diluciones para obtener una concentración final de 5 µg de ARN/µl en cada una de las muestras.

**4.3.2. DETERMINACIÓN DEL ARNm DE Ao Y DE β-ACTINA.**

Se han desarrollado varios métodos para cuantificar la concentración de un ARNm específico. En este trabajo se usaron las técnicas de "slot blot" y "Northern blot" para analizar los ARNm de Ao y de β-actina. La hibridación con la sonda de β-actina se hizo para normalizar los valores del ARNm de Ao.

**4.3.2.1. TÉCNICA DE "NORTHERN BLOT".**

La técnica de "Northern blot" permite detectar la presencia, así como la cantidad y tamaño de un ARNm específico presente en una muestra. Para ello las moléculas de ARN se mezclan con un agente desnaturalizante que impida la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias de ARN, impidiendo que el ARN se pliegue. Enseguida se realiza una electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa para separar las moléculas de ARN en base a su tamaño o peso molecular. Para visualizar el ARN y observar su integridad, ésta se tinte con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y fluoresce con la luz ultravioleta. El ARN luego es transferido a una membrana donde queda adherido evitándose con ello su degradación y facilitando su hibridación con ADN complementario (ADNc) o con sondas específicas marcadas. La hibridación consiste en exponer la membrana a una solución que contenga la sonda específica marcada, la cual mediante el apareamiento de bases complementarias se unirá a su ARNm específico. Posteriormente la

membrana hibridada es sometida a autorradiografía para detectar la ubicación del material marcado así como la cantidad de ARNm específico.

#### 4.3.2.1.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%:

Se empleó una cámara horizontal de GIBCO BRL modelo 11-14 (Fig. 2).

a.- La cámara se lavó con agua esterilizada y fue tratada durante 20 min con  $H_2O_2$  y con  $H_2O$ -DEPC cada 3 corridas.

b.- En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se pesó 1 g de agarosa, luego se añadieron 10 mL de amortiguador MOPS 12 X y 85 mL de  $H_2O$ -DEPC.

c.- La mezcla se calentó en horno de microondas durante 1.5 min o con un mechero Bunsen agitándola suavemente hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se dejó enfriar 20 min a temperatura ambiente.

d.- Se añadieron 5 mL de formaldehído (agitando suavemente el matraz para evitar hacer burbujas). La solución se vació en el molde para el gel y, en el caso de que se hubieran formado burbujas, éstas se eliminaron con una pipeta Pasteur estéril con bulbo de goma.

e.- Se esperó a que la solución se gelificara (al menos 20 min). Luego se agregó al tanque de la cámara amortiguador de corrida y se retiraron cuidadosamente el peine y las piezas que delimitan el gel, el cual quedó cubierto con el amortiguador.

f.- En tubos eppendorf de 1.5 mL colocados en hielo se mezclaron 16.2  $\mu$ l de solución desnaturante (ver apéndice A) y 2  $\mu$ l de la solución de 5  $\mu$ g/ $\mu$ L de ARN total. Estos tubos se incubaron a 65°C durante 10 min. Las muestras de ARN total se guardaron a -70°C inmediatamente después de ser usadas y las muestras desnaturadas fueron regresadas rápidamente al hielo después de la incubación a 65°C.

g.- Cada muestra de ARN se colocó cuidadosamente en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Se procuró evitar que alguna cantidad de muestra se derramara fuera de los pozos del gel porque ello hubiera afectado la concentración del ARN colocado en la mezcla.

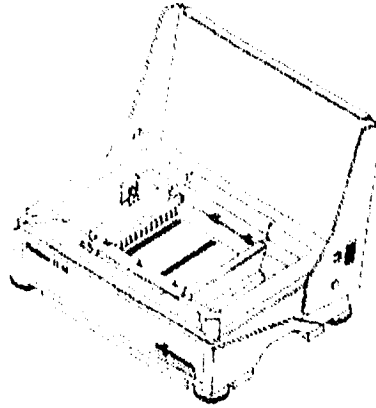
h.- La electroforesis se realizó a 65 volts hasta que la banda azul que representó el frente estuvo próxima a llegar al final del gel (aproximadamente 4 h).

i.- El gel se sacó de la cámara y se colocó en un recipiente con agua destilada durante 15 min para lavar el exceso de formaldehído.

j.- El gel se introdujo en un baño de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) durante 10 min y se dejó lavando en agua destilada al menos 12 hrs.

k.- El gel fue observado en el transiluminador ultravioleta (usando la careta protectora de UV) para observar la integridad de las bandas 18S y 28S y que su intensidad fuera similar en todos los carriles, lo cual es un reflejo de la cantidad de ARN total colocado.

l.- El gel se fotografió usando una cámara Polaroid DS-34 con filtro para bromuro de etidio con película Polaroid tipo 667.



**FIGURA. 2. CÁMARA DE ELECTROFORESIS.**

#### **4.3.2.1.2. TRANSFERENCIA DEL ARN A LA MEMBRANA DE HIBRIDACIÓN.**

Se usó un sistema de transferencia por capilaridad para colocar el ARN en una membrana de nylon (Fig. 3).

a.- Se recortaron rectángulos de membrana de hibridación Gene Screen de DuPont de 14 cm x 11 cm, de toallas de papel absorbente de 13 x 10 cm, de papel filtro 35 x 14 cm y de 13.5 x 10.5 cm.

b.- El molde donde se preparó el gel se colocó en posición invertida y se cubrió con la tira doblada de papel filtro de 35 x 14 cm.

c.- El papel filtro fue humedecido completamente con amortiguador de transferencia (amortiguador de fosfatos 0.025 M pH 7.0) y se eliminaron las burbujas de aire que se formaron entre el molde y el papel presionándolas con los dedos hacia las orillas.

d.- El gel se colocó cuidadosamente sobre el papel filtro evitando que quedaran burbujas de aire entre ambos.

e.- El gel se cubrió con la membrana de hibridación (previamente humedecida en amortiguador de transferencia durante 15-20 min) y se eliminaron las burbujas de aire.

- f.- Se colocaron 2 cuadros de papel filtro de 13 x 10 cm sobre la membrana
- g.- Los cuadros de toallas absorbentes fueron acomodados sobre el papel filtro.
- h.- Se colocó un vidrio sobre las toallas absorbentes
- i.- Se añadió más amortiguador de transferencia (sin que éste llegara a tocar al gel) y se dejaron transcurrir al menos 10 horas.
- j.- Todas las capas de papel se retiraron cuidadosamente (con excepción de la membrana) y el gel se colocó sobre el transiluminador UV.
- k.- Se levantó una esquina de la membrana para despegarla gradualmente del gel, si la transferencia ha sido completa no debe haber ningún rastro de ARN en el gel. En caso de que aún hubiera ARN en el gel se volvió a empezar desde el paso e.
- l.- La membrana fue sumergida en amortiguador de transferencia para lavar los residuos de agarosa que pudieran haberse adherido a la membrana.
- m.- El ARN se fijó a la membrana usando el entrecruzador "UV stratalinker" modelo 2400 de Stratagene. Se tuvo cuidado de no perder la orientación de la membrana.
- n.- La membrana se colocó en el transiluminador UV y con un lápiz de punta suave se marcó la ubicación de las bandas 18S y 28S, así como el número o clave de la membrana. Enseguida se colocó entre 2 cuadros de papel filtro para secarla y finalmente se introdujo en una bolsa sellable para hibridación para guardarla a 5°C hasta el momento de la hibridación.

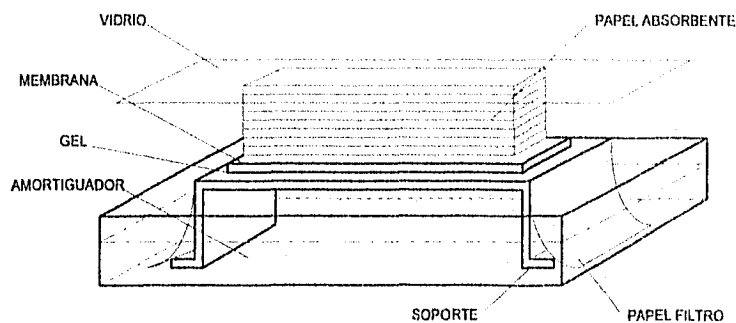


FIGURA. 3. SISTEMA DE TRANSFERENCIA POR CAPILARIDAD.

#### 4.3.2.2. TÉCNICA DE "SLOT BLOT".

Esta técnica es muy similar a la de Northern blot, la diferencia radica en que el ARN no se somete a electroforesis sino que se fija directamente a la membrana utilizando el aparato Milli Blot-S de Millipore (Fig. 4).

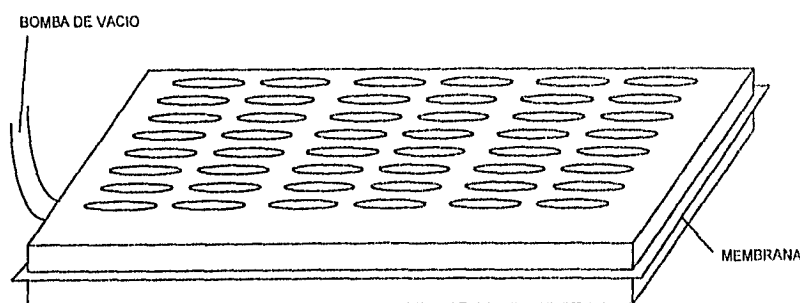


FIGURA 4. CÁMARA DE SLOT BLOT.

La cámara que se usó tiene 48 pozos, cada vez que se usó se emplearon 24 muestras de ARN (6 muestras por cada uno de los 4 grupos de cada tratamiento), colocando las muestras como se observa en la figura 5. Después de obtener la membrana, ésta se recortó a la mitad para que las primeras 24 muestras se hibridaran con la sonda de Ao y las siguientes 24 (que son el duplicado de las primeras), se hibridaran con la sonda de actina. En total se obtuvieron 4 membranas de 48 muestras por cada tratamiento.

- a.- La cámara de "slot blot" se lavó con H<sub>2</sub>O-DEPC y con agua esterilizada.
- b.- Se humedecieron 3 papeles filtro con amortiguador SSC 2X (NaCl 0.3M y citrato de sodio 0.03 M pH 7.0) y se colocaron sobre la base de la cámara. Enseguida se colocaron la membrana de hibridación (previamente humedecida durante 15 min en amortiguador SSC 2X) y la placa con ranuras o pozos ("slots") para fijarla a la base con ayuda de las abrazaderas.
- c.- Se añadieron 0.5 ml. de amortiguador SSC 10X a cada pozo.
- d.- Se numeraron tubos eppendorf de 1.5 ml., se colocaron en hielo y a cada uno se añadió la siguiente mezcla: 20  $\mu$ l de formamida, 7  $\mu$ l de formaldehído, 2  $\mu$ l de SSC 20X, 5  $\mu$ g de ARN (1  $\mu$ l de la solución de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l de ARN total) y 9  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC.
- e.- Todos los tubos se incubaron a 68°C durante 15 min y se colocaron nuevamente en hielo.
- f.- Se adicionaron 2 volúmenes de amortiguador SSC 20X (78  $\mu$ l) a cada tubo.
- g.- El contenido de cada tubo se colocó en los pozos de la cámara de "slot blot", la cual estaba conectada a un sistema de vacío.
- h.- Una vez succionada toda la muestra se añadieron 0.5 ml. de amortiguador SSC 10X (este paso se repitió 4 veces para cada pozo).



i.- La membrana se sacó de la cámara y se enjuagó en amortiguador SSC 2X y se colocó entre 2 papeles filtro para secarla.

j.- Se fijó el ARN a la membrana de hibridación empleando el entrecruzador "stratalinker".

k.- La membrana se guardó a 5°C hasta el momento de la hibridación.

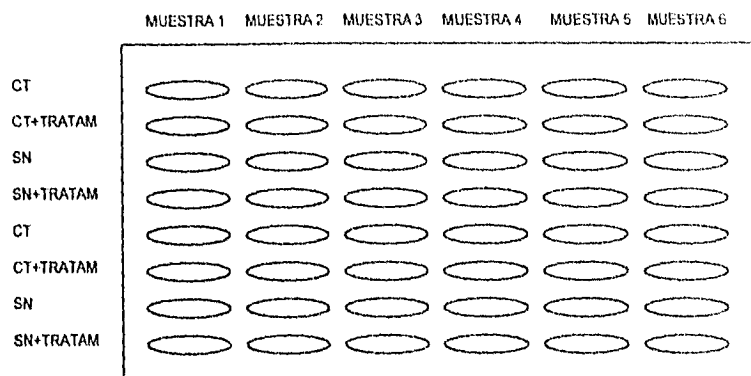


FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARN EN LA CÁMARA DE "SLOT BLOT".

#### 4.3.2.3. MARCAJE DE LAS SONDAS.

La sonda de Ao que se usó en este trabajo fue donada por Lynch *et al.* (90), su tamaño es de 1650 nucleótidos y su concentración fue de 30 ng/ $\mu$ L. La concentración de la sonda de actina fue de 20 ng/ $\mu$ L.

Ambas sondas (Ao y actina) se marcaron con fósforo-32 ( $P^{32}$ ) y este procedimiento se realizó observando las siguientes precauciones: usar guantes desechables, protector de acrílico, contenedor de desechos radiactivos y un contador Geiger.

Las sondas de Ao y de  $\beta$ -actina eran de ADNc y para marcarlas se empleó el estuche comercial Prime-It<sup>®</sup> RmT Random Primer (Stratagene). En esta técnica algunos oligonucleótidos ("primers") se unen a múltiples sitios a lo largo de la sonda de ADN formando un complejo que sirve como sustrato para la enzima ADN-polimerasa magenta, la cual sintetiza ADN incorporando nucleótidos en el grupo hidroxilo libre del "primer". Al añadir desoxi-trifosfato de citosina (dCTP) marcado con  $P^{32}$  a la mezcla de reacción éste nucleótido también se incorpora a la cadena de ADN recién sintetizada. Este estuche produce sondas con alta actividad específica ( $> 1 \times 10^9$  dpm/ $\mu$ g). Se realizaron los siguientes pasos:

a.- El baño María se puso a 37°C.

- b.- Al tubo de reacción (suministrado en el estuche) se adicionaron 30 ng de ADNc (1  $\mu$ L de la sonda de Ao y 1.5  $\mu$ L de la sonda de  $\beta$ -actina) y se completó a un volumen final de 42  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O esterilizada.
- c.- El tubo se colocó en agua hirviendo durante 5 min.
- d.- Se centrifugó durante 5 seg a temperatura ambiente para recolectar el vapor que formó a causa del paso anterior.
- e.- Se adicionaron 5  $\mu$ L de <sup>32</sup>P-dCTP (Actividad específica 3000  $\mu$ Ci/mmol, Amersham) y 3  $\mu$ L de la ADN polimerasa de Magenta (4U/ $\mu$ L) y se mezclaron rápida y cuidadosamente con una micropipeta.
- f.- Se incubó inmediatamente durante 9 min a 37°C.
- g.- Se agregaron lo más rápidamente posible 2  $\mu$ L de la solución "stop mix" (que viene en el estuche) para detener la reacción.
- h.- Se calculó la actividad específica de la sonda marcada (apéndice C).

#### 4.3.2.4. PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN.

Las muestras de ARN fijadas a las membranas se hibridaron de manera independiente con las sondas de Ao y de  $\beta$ -actina.

##### PREHIBRIDACIÓN.

- a.- A la bolsa donde estaba la membrana de hibridación se añadieron 0.1 mL/cm<sup>2</sup> de la siguiente solución:
  - Formamida desionizada al 50%, sulfato de dextrán al 10%, SDS al 1%, NaCl 1 M y 100  $\mu$ g/mL de ADN de testículo de salmón previamente desnaturalizado.
- b.- La membrana se humedeció completamente con la solución de prehibridación, se eliminaron las burbujas, la bolsa se selló con calor y se dejó en el horno de hibridación (Stratagene) durante 1 h a 42°C.

##### HIBRIDACIÓN.

- c.- La sonda marcada (ver la sección 4.3.2.3. Marcaje de las sondas) se desnaturalizó colocándola en agua hirviendo durante 5 min y luego en hielo. Enseguida se agregó a la bolsa de hibridación, se eliminaron las burbujas, la bolsa se selló con calor.
- d.- La bolsa se dejó en el horno de hibridación al menos 15 h a 42°C.

#### 4.3.2.5. LAVADO DE LA SONDA NO HIBRIDADA A LA MEMBRANA.

Después de la hibridación se eliminó la solución con la sonda marcada que no se unió a su ARNm específico realizando un lavado de alta astringencia:

- e.- La solución se vació a un recipiente para desechos radiactivos líquidos.
- f.- La membrana hibridada se extrajo de la bolsa con unas pinzas y se colocó en un recipiente hermético con 150 mL de una solución SSC 2X - SDS 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente con agitación constante. Después se vació esta solución de lavado al recipiente de desechos radiactivos.

g.- Se añadieron 150 ml. de una solución SSC 0.1X - SDS 0.1% al recipiente y se colocó en un baño María a 55°C-65°C con agitación constante durante 15 min. La solución se vació al recipiente de desechos y se repitió este paso 2 veces más.

h - La membrana se colocó entre 2 cuadros de papel filtro durante 5 min para eliminar el exceso de humedad.

#### 4.3.2.6. AUTORRADIOGRAFÍA.

i.- La membrana hibridada se forró con plástico (para evitar que se adhiriera a las placas intensificadoras y a la placa radiológica durante la exposición) y se fijó con cinta adhesiva a una de las placas intensificadoras dentro del cassette de exposición.

f.- En un cuarto oscuro se colocó una placa radiológica sobre la membrana y el cassette de exposición se guardó a -80°C. El tiempo de exposición fue muy variable (de 3 h a 2 días dependiendo de la efectividad de la marcación de la sonda y de la actividad del radioisótopo).

g.- Finalmente la placa radiológica se reveló en una máquina RPX-OMAT Processor modelo M6B (Kodak).

#### 4.3.2.7. DENSITOMETRÍA.

La densitometría de la placa radiológica se realizó en un espectrofotómetro Beckman modelo 640 DU utilizando el programa "scan gel area".

h.- La placa radiológica se colocó en un aditamento especial para este aparato. Se leyó el blanco (algún segmento no velado de la placa) y se inició la lectura densitométrica (barrido de la placa con el haz de luz).

k.- Los resultados obtenidos se expresan como unidades arbitrarias de densitometría a 560 nm.

#### 4.3.2.8. CÁLCULO DE LOS NIVELES DE ARNm.

Con los datos obtenidos de las autorradiografías de las 144 muestras de ARN hibridadas con la sonda de Ao (6 muestras x 4 grupos x 6 tratamientos) y de las 144 muestras hibridadas con la sonda de actina, se realizó lo siguiente:

i) Para cada una de las muestras se calculó el siguiente cociente:

$$\frac{\text{Unidades arbitrarias de densitometría del ARNm de Ao}}{\text{Unidades arbitrarias de densitometría del ARNm de actina}}$$

ii) Se obtuvieron los promedios de cada uno de los 4 grupos de los 6 tratamientos.

iii) Cada dato de los grupos CT+TRATAM se dividió entre el promedio de su grupo CT y cada dato de los grupos SN+TRATAM se dividió entre el promedio de su grupo SN para obtener el porcentaje de cambio en los niveles del ARNm de Ao a consecuencia de los tratamientos.

#### 4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó el programa estadístico EPISTAT versión 4.0.

En cada bloque de 4 subgrupos se aplicó la prueba de análisis de varianza de una sola vía y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, para las comparaciones de dos subgrupos se realizó una prueba de t de Student. Se consideró una significancia del 5%.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SÍNDROME NEFRÓTICO Y EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE ESTOS PARÁMETROS.

La administración del ANP provocó, después de 8 días, las alteraciones bioquímicas características del SN: hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, aumento en la creatinina sérica, proteinuria y aumento en el nitrógeno de urea. Además se observaron algunos efectos de los tratamientos sobre los parámetros anteriores.

**PROTEÍNAS URINARIAS.** La proteinuria fue de la misma magnitud en los grupos nefróticos. En estos grupos los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre este parámetro, excepto el tratamiento con ADX que la disminuye. De la misma manera, la ADX redujo la excreción urinaria de proteínas en las ratas controles (Tabla III).

Tabla III. Excreción de proteínas en la orina (mg/día).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	24±6	25±13	717±117 <sup>c</sup>	848±297 <sup>d</sup>
EE	24±6	23±9	717±117 <sup>c</sup>	854±269 <sup>d</sup>
NX	----	----	-----	-----
T3	19±10	18±8	713±184 <sup>c</sup>	754±161 <sup>d</sup>
CAP	21±6	19±7	679±243 <sup>c</sup>	541±152 <sup>d</sup>
ADX	23±6	9±3 <sup>a</sup>	826±108 <sup>c</sup>	595±244 <sup>b,d</sup>

Los resultados expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticos (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)

**PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.** La hipoproteinemia en todos los grupos de ratas fue de la misma magnitud y los tratamientos no indujeron alteraciones en la concentración de proteínas totales en plasma de ratas controles y con SN (Tabla IV).

Tabla IV. Concentración de proteínas en el plasma (mg/mL).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	85±7	90±5	55±7 <sup>c</sup>	54±11 <sup>d</sup>
EE	85±7	81±8	55±7 <sup>c</sup>	52±5 <sup>d</sup>
NX	82±4	82±5	63±11 <sup>c</sup>	56±6 <sup>d</sup>
T3	85±4	81±5	59±7 <sup>c</sup>	57±5 <sup>d</sup>
CAP	90±4	92±6	52±7 <sup>c</sup>	57±5 <sup>d</sup>
ADX	82±4	85±6	62±11 <sup>c</sup>	60±4 <sup>d</sup>

Los resultados expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

c = p < 0.05 vs control (CT)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)

**ALBÚMINA PLASMÁTICA.** Al igual que la hipoproteinemia, la hipoalbuminemia fue de la misma magnitud en los grupos de ratas con SN. La DEX incrementó la albúmina en ratas controles (SN+DEX) y la disminuyó en ratas con SN. La ADX provocó la disminución de este parámetro en ambos grupos de ratas. Los tratamientos restantes no indujeron ningún cambio (Tabla V).

Tabla V. Concentración de albúmina en el plasma (mg/mL).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	35±3	45±4 <sup>a</sup>	17±5 <sup>c</sup>	13±3 <sup>b,d</sup>
EE	35±3	37±4	17±4 <sup>c</sup>	16±3 <sup>d</sup>
NX	35±3	33±2	15±2 <sup>c</sup>	15±6 <sup>d</sup>
T3	33±5	32±5	16±5 <sup>c</sup>	13±2 <sup>d</sup>
CAP	35±4	36±4	16±5 <sup>c</sup>	16±3 <sup>d</sup>
ADX	35±3	28±3 <sup>a</sup>	15±2 <sup>c</sup>	12±1 <sup>b,d</sup>

Los resultados expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticas (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)

**COLESTEROL SÉRICO.** El aumento en el colesterol fue de la misma magnitud en los grupos de ratas nefróticas (SN). La DEX, la NX, el CAP y la T3 no causaron cambios en el colesterol y el EE y la ADX lo disminuyeron en ratas nefróticas (SN+TRATAM). En las ratas controles (CT+TRATAM) la DEX, el EE y la T3 aumentaron el colesterol y la ADX lo disminuyó (Tabla VI).

Tabla VI. Concentración de colesterol en suero (mg/dL).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	45±4	83±8 <sup>a</sup>	292±34 <sup>c</sup>	255±69 <sup>d</sup>
EE	45±4	81±8 <sup>a</sup>	292±34 <sup>c</sup>	165±22 <sup>b,d</sup>
NX	74±12	74±8	298±82 <sup>c</sup>	260±52 <sup>d</sup>
T3	48±9	65±10 <sup>a</sup>	251±65 <sup>c</sup>	267±46 <sup>d</sup>
CAP	51±6	53±6	263±45 <sup>c</sup>	227±36 <sup>d</sup>
ADX	74±12	61±8 <sup>a</sup>	298±82 <sup>c</sup>	210±38 <sup>b,d</sup>

Los resultados expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticos (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)

**CREATININA SÉRICA.** El aumento en creatinina fue de la misma magnitud en los grupos nefróticos (SN). En las ratas nefróticas (SN+TRATAM) la DEX, la T3 y la ADX disminuyeron la creatinina, mientras que el EE, la NX y el CAP la aumentaron. En ratas controles (CT+TRATAM) la NX y el CAP la aumentaron, los demás tratamientos no tuvieron ningún efecto (Tabla VII).

Tabla VII. Concentración de creatinina en suero (ng/dL).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	0.35±0.05	0.32±0.07	0.93±0.35 <sup>c</sup>	0.66±0.11 <sup>b,d</sup>
EE	0.35±0.05	0.34±0.05	0.93±0.35 <sup>c</sup>	1.14±0.15 <sup>b,d</sup>
NX	0.33±0.05	1.86±0.22 <sup>a</sup>	0.80±0.07 <sup>c</sup>	1.95±0.31 <sup>b</sup>
T3	0.32±0.09	0.30±0.08	1.00±0.18 <sup>c</sup>	0.49±0.05 <sup>b,d</sup>
CAP	0.29±0.03	0.36±0.07 <sup>a</sup>	0.81±0.07 <sup>c</sup>	1.05±0.48 <sup>d</sup>
ADX	0.33±0.05	0.44±0.25	0.80±0.07 <sup>c</sup>	0.67±0.19 <sup>d</sup>

Los resultados expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticos (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)

**NITRÓGENO DE UREA (BUN).** Al igual que en los otros parámetros, el aumento en el BUN fue de la misma magnitud en las ratas con SN. En las ratas controles la DEX, la NX y la ADX aumentaron el BUN, mientras que en las ratas nefróticas la DEX y la NX lo aumentaron, la ADX lo disminuyó y los tratamientos restantes no lo modificaron (Tabla VIII).

Tabla VIII. Concentración de nitrógeno de urea en suero (mg/dl.).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	12.6±1.9	21.3±3.3 <sup>a</sup>	50.4±16.6 <sup>c</sup>	74.2±21.1 <sup>b,d</sup>
EE	12.6±1.9	13.1±1.4	50.4±16.6 <sup>c</sup>	58.3±23.2 <sup>d</sup>
NX	13.5±2.6	65.2±5.1 <sup>a</sup>	51.8±12.6 <sup>c</sup>	83.9±31.4 <sup>b</sup>
T3	14.8±2.5	17.0±2.2	62.0±10.1 <sup>c</sup>	71.7±19.3 <sup>d</sup>
CAP	15.5±1.9	16.5±2.3	53.6±13.0 <sup>c</sup>	53.2±16.6 <sup>d</sup>
ADX	13.5±2.3	18.5±2.3 <sup>a</sup>	52.0±13.0 <sup>c</sup>	34.0±9.0 <sup>b,d</sup>

Los resultados expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticos (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)

## 5.2. ANGIOTENSINÓGENO Y RENINA EN EL SN Y EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE ESTAS VARIABLES.

### 5.2.1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RENINA.

En la tabla IX se muestran los valores de CPR obtenidos en los diferentes grupos estudiados y en la tabla X se muestran los cocientes CT+TRATAM/CT y SN+TRATAM/SN de los valores de la tabla IX. A consecuencia de la NX, la CPR de las ratas controles disminuyó a un 23.6%, y en las ratas nefróticas disminuyó a un 2.1%. En las ratas controles el CAP indujo un aumento de hasta 1831.1% en la CPR y en las ratas nefróticas el aumento fue de 1439.6%. La ADX en las ratas controles provocó un aumento en la CPR de 1184.2% y en las ratas con SN se observó una respuesta diferente al disminuir a un 22.8%.

Los tratamientos restantes no causaron ninguna modificación en la CPR de ambos grupos de ratas.

Tabla IX. Concentración plasmática de renina (ng Al/mL/h).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	11.5±2.6	10.6±4.9	26.7±6.8 <sup>c</sup>	47.2±18.5 <sup>d</sup>
EE	11.5±2.6	11.6±3.0	28.8±8.6 <sup>c</sup>	16.9±7.1 <sup>b</sup>
NX	15.2±10.2	3.6±0.5 <sup>a</sup>	68.2±26.7 <sup>c</sup>	1.5±1.1 <sup>b,d</sup>
T3	9.5±1.9	9.0±3.5	33.4±6.1 <sup>c</sup>	39.5±12 <sup>d</sup>
CAP	15.4±4.8	282±86 <sup>a</sup>	23.2±6.5 <sup>c</sup>	334±95 <sup>b</sup>
ADX	15.2±10.2	180±114 <sup>a</sup>	68.2±26.7 <sup>c</sup>	15.6±8.7 <sup>b,d</sup>

Los datos expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticos (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM.)



Tabla X. Comparación de la magnitud del efecto de los tratamientos sobre la CPR

	(CT+TRATAM)/CT	(SN+TRATAM)/SN	p
DEX	sin cambio	sin cambio	NS
EE	sin cambio	↓ 58.6±15.6	< 0.05
NX	↓ 23.6±3.4	↓ 2.1±1.6	< 0.05
T3	sin cambio	sin cambio	NS
CAP	↑ 1831±572	↑ 1439±359	NS
ADX	↑ 1184±339	↓ 22.8±8.6	< 0.05

NS = No significativo.

### 5.2.2. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ANGIOTENSINÓGENO (CPA).

La DEX, el EE, la NX y la T3 incrementaron la CPA tanto de ratas controles como en ratas con SN, el CAP y la ADX redujeron la CPA de las ratas controles, pero estos tratamientos tuvieron un efecto diferente en las ratas nefróticas puesto que el CAP también redujo la CPA de estos animales pero la ADX no causó ningún efecto sobre el Ao plasmático (Tabla XI).

Tabla XI. Concentración plasmática de angiotensinógeno (ng Al/mL/h).

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	858 ± 170	1914 ± 195 <sup>a</sup>	340 ± 129 <sup>c</sup>	932 ± 267 <sup>b,d</sup>
EE	858 ± 170	2040 ± 193 <sup>a</sup>	373 ± 82 <sup>c</sup>	1275 ± 184 <sup>b,d</sup>
NX	858 ± 152	2187 ± 371 <sup>a</sup>	382 ± 142 <sup>c</sup>	944 ± 270 <sup>b,d</sup>
T3	678 ± 59	1388 ± 163 <sup>a</sup>	320 ± 103 <sup>c</sup>	526 ± 133 <sup>b,d</sup>
CAP	824 ± 143	388 ± 80 <sup>a</sup>	435 ± 115 <sup>c</sup>	139 ± 47 <sup>b,d</sup>
ADX	888 ± 152	455 ± 112 <sup>a</sup>	382 ± 142 <sup>c</sup>	367 ± 170

Los datos expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefróticos (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM)

En la tabla XII se muestra la magnitud de cambio de la CPA en los grupos controles y nefróticos a consecuencia de los tratamientos empleados en este trabajo. Los aumentos observados en las ratas con SN a causa de la administración de DEX y EE fueron mayores que los aumentos observados en las ratas controles y la NX provocó un aumento de igual magnitud en los dos grupos de ratas. El incremento en la CPA en el grupo control, a causa de la inyección con T3, fue menor que el observado en el grupo nefrótico.

Tabla XII. Cambios en la CPA de ratas controles (CT) y de ratas nefróticas (SN) en respuesta a los tratamientos.

	(CT+TRATAM)/CT	(SN+TRATAM)/SN	p
DEX	↑ 223±20	↑ 274±80	< 0.05
EE	↑ 237±20	↑ 341±40	< 0.05
NX	↑ 254±40	↑ 247±70	NS
T3	↑ 204±30	↑ 164±40	< 0.05
CAP	↓ 47±10	↓ 31±10	< 0.05
ADX	↓ 51±12	sin cambio	< 0.05

Los datos expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

NS = no significativo.

### 5.2.3. EXCRECIÓN URINARIA DE ANGIOTENSINÓGENO (EUA).

Las ratas nefróticas mostraron una cantidad considerable de Ao en la orina y algunos de los tratamientos magnificaron en gran medida la cantidad de Ao presente en la orina, por ejemplo, la DEX indujo un incremento de 317% y el EE de hasta un 1208%. La administración de CAP redujo la EUA de las ratas nefróticas a un 4.37% (5.48 a 0.23 µg Al/día), es decir, casi a valores normales. Los tratamientos con T3 y ADX no tuvieron ningún efecto sobre la EUA de las ratas nefróticas (Tabla XIII).

Tabla XIII. Excreción urinaria de angiotensinógeno (µg Al/mL/h) en los grupos estudiados.

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	0.099±0.061	0.163±0.138	4.07±1.76 <sup>c</sup>	13.6±4.47 <sup>b,d</sup>
EE	0.101±0.064	0.320±0.263	4.02±1.86 <sup>c</sup>	55.6±15.6 <sup>b,d</sup>
NX	-----	-----	-----	-----
T3	0.026±0.043	0.051±0.072	6.01±2.11 <sup>c</sup>	7.41±2.79 <sup>d</sup>
CAP	0.024±0.026	0.016±0.037	5.48±1.88 <sup>c</sup>	0.24±0.23 <sup>b,d</sup>
ADX	0.024±0.017	0.348±0.258	4.66±1.09 <sup>c</sup>	3.76±2.52 <sup>d</sup>

Los datos expresan el promedio ± DE. n = 8-10.

a = p < 0.05 vs control (CT)

c = p < 0.05 vs control (CT)

b = p < 0.05 vs nefrótico (SN)

d = p < 0.05 vs control tratado (CT+TRATAM).

### 5.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ARNm DE Ao.

#### 5.3.1. "NORTHERN BLOT".

El ARN total extraído del hígado de los animales en estudio fué examinado en electroforesis en gel de agarosa al 1% y con las técnicas de "Northern blot" y "slot blot". En la figura 6 se ilustra un ejemplo de "Northern blot": inciso A: ARN total teñido con bromuro de etidio. se observa la integridad del ARN y la misma intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras lo que fué indicativo de que en cada pozo se colocó la misma cantidad de muestra. En los incisos B y C se muestran las hibridaciones con la sonda de Ao y de  $\beta$ -actina, respectivamente, marcadas con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

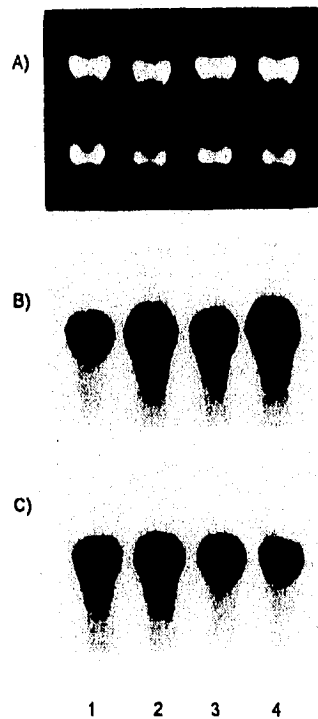


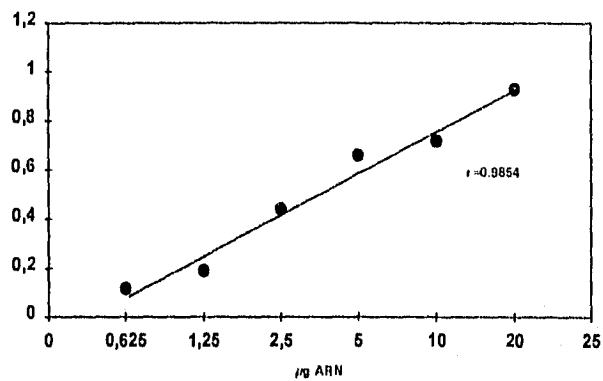
Figura. 6. A. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el ARN total teñido con bromuro de etidio. En cada pozo se colocaron 10  $\mu\text{g}$  de ARN. B. "Northern blot" del ARNm de Ao. C. "Northern blot" del ARNm  $\beta$ -actina. (línea 1=control; línea 2=control+NX; línea 3=SN y línea 4=SN+NX).

### 5.3.2. "SLOT BLOT".

Para determinar las cantidades relativas del ARNm de Ao hepático de las ratas controles y con SN sometidas a los diferentes estímulos, el ARN total se analizó con la técnica de "slot blot". Posteriormente se realizó un análisis densitométrico en el espectrofotómetro Beckman DU serie 640. Los datos del ARNm de Ao se normalizaron con los datos obtenidos del ARNm de  $\beta$ -actina (la hibridación del ARNm de  $\beta$ -actina se hizo paralelamente a la del ARNm de Ao). Los valores están expresados en unidades densitométricas arbitrarias y representan el área bajo la curva de cada una de las lecturas.

Esta técnica se validó realizando dos gráficas de linealidad en las que se graficaron concentración de ARN total vs unidades de densitometría. Estas gráficas se muestran en la Fig. 7.

a)



b)

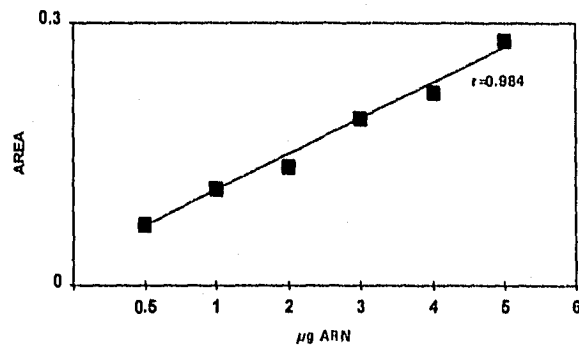


Figura. 7. Gráfica de linealidad obtenida con la técnica de "slot blot" usando diferentes cantidades de ácido nucleico (las hibridaciones se hicieron con la sonda de Ao). a) 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 µg de ARN total. b) 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 µg de ARN total.

### 5.3.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE Ao.

En la figura 8 se muestran ejemplos de las autorradiografías de "slot blot" de los diferentes tratamientos obtenidas al hibridar las membranas con la sonda de Ao marcada con  $^{32}\text{P}$ -dCTP. En la tabla XIV se expresan los resultados obtenidos de una sola membrana para cada tratamiento expresados como unidades arbitrarias de densitometría (ver la sección 4.3.2.8. Cálculo de los niveles de ARNm).

En la tabla XV se muestra el porcentaje de cambio de cada uno de los grupos tratados con respecto a su control ( $\text{CT}+\text{TRATAM}/\text{CT}$  Y  $\text{SN}+\text{TRATAM}/\text{SN}$ ) considerando los resultados obtenidos de 4 membranas para cada tratamiento.

Tabla XIV. Niveles hepáticos del ARNm de Ao en los grupos de estudio.

	CT	CT+TRATAM	SN	SN+TRATAM
DEX	0.68±0.14	1.63±0.36 <sup>a</sup>	0.77±0.14	1.67±0.31 <sup>b</sup>
EE	0.12±0.07	0.22±0.02 <sup>a</sup>	0.10±0.07	0.24±0.11 <sup>b</sup>
NX	0.59±0.16	1.28±0.18 <sup>a</sup>	0.42±0.20	1.18±0.34 <sup>b</sup>
T3	0.13±0.04	0.32±0.13 <sup>a</sup>	0.16±0.02	0.44±0.09 <sup>b</sup>
CAP	1.01±0.19	1.09±0.19 <sup>a</sup>	1.05±0.12	1.91±0.94 <sup>b</sup>
ADX	0.89±0.31	0.25±0.07 <sup>a</sup>	0.78±0.29	0.28±0.16 <sup>b</sup>

Estos datos están expresados como unidades arbitrarias de densitometría.

n = 6 para cada grupo.

a = p < 0.05 vs CT

b = p < 0.05 vs SN

Tabla XV. Comparación de la magnitud de respuesta a los tratamientos obtenida en los grupos controles y nefróticos.

	(CT+TRATAM)/CT	(SN+TRATAM)/SN	p
DEX	216 ± 51	234 ± 43	NS
EE	183 ± 23	229 ± 17	NS
NX	227 ± 35	262 ± 47	NS
T3	268 ± 24	270 ± 83	NS
CAP	111 ± 2.8	165 ± 88	NS
ADX	27 ± 2.0	41.1 ± 7.4	< 0.05

Los datos expresan el promedio ± DE. n = 4.

NS = No significativo.

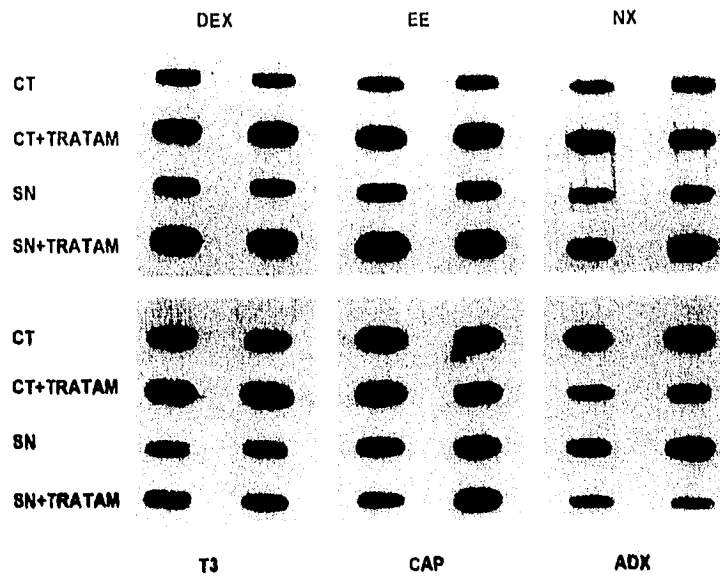


Figura 8. "Slot blots" de los diferentes tratamientos después de hibridar con la sonda de Ao. En cada pozo se colocaron 5  $\mu$ g de ARN total.

## 6. DISCUSIÓN.

### Caracterización del SN.

El SN inducido con ANP (91-94) es un modelo experimental del SN de cambios mínimos que se presenta en humanos (91,95-97).

En este estudio, 8 días después de la administración del ANP, se presentaron las alteraciones bioquímicas características del SN: proteinuria, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, aumento en la concentración sérica de creatinina y de nitrógeno de urea, así como las alteraciones previamente informadas en el SRA: disminución de la CPA y aumentos en la CPR y en la EUA (46-48).

Los tratamientos empleados en este trabajo: DEX, EE, NX, T3, CAP y ADX causaron algunas alteraciones en algunos de los parámetros anteriores, por ejemplo la ADX disminuyó la proteinuria en el grupo CT ( $23 \pm 6$  vs  $9 \pm 3$  mg/día,  $p < 0.05$ ) y en grupo SN ( $826 \pm 108$  vs  $595 \pm 244$  mg/día,  $p < 0.05$ ). Esta disminución se explica porque la ADX disminuye el flujo plasmático renal y el índice de filtración glomerular y se ha observado que la administración de glucocorticoides incrementan estos parámetros.

La albúmina plasmática cambia a consecuencia de la DEX y de la ADX. En las ratas CT la DEX causa un incremento en los niveles plasmáticos de esta proteína lo que puede deberse al aumento en su síntesis ya que el gen de la albúmina presenta elementos de respuesta a glucocorticoides, sin embargo la respuesta observada en el grupo de ratas nefróticas es diferente, ya que la DEX causa una disminución en este parámetro, la explicación que podría darse es que esta disminución se debe a su pérdida por orina, la cual se ha informado previamente, sin embargo en los grupos nefróticos restantes sometidos a estímulos con EE, NX, T3 y CAP la albúmina plasmática no cambia. La disminución de la albúmina en el grupo SN+ADX podría ser consecuencia de la deficiencia de corticoides.

No tenemos explicación acerca de los cambios que suceden en los niveles de colesterol sérico

### CPA, CPR y EUA en el SN.

Se ha postulado que los bajos niveles de CPA observados en el plasma de ratas con SN durante los días 4 a 10 después de la administración del ANP pueden deberse a uno de los siguientes factores o a una combinación de algunos de ellos: i) al aumento en su degradación por la enzima renina, ii) al aumento en su excreción urinaria o iii) a la disminución en la síntesis y secreción hepática de Ao (47).

Los niveles plasmáticos de renina aumentan hasta 5 veces en los días 5 a 7 después de la inyección del ANP (46-48) y se ha informado que el contenido renal de renina (CRR) es igual (47) al de las ratas controles (83,98-101). En ratas con SN el aumento en la CPR debiera estar acompañada de la depleción renal de renina, sin embargo el CRR permanece sin cambios, lo que sugiere que la síntesis de renina está incrementada, aunque no se descarta que el aumento en la CPR sea resultado de una disminución en el catabolismo de esta enzima o de un aumento en la liberación de renina de fuentes extrarrenales, como se ha reportado en ratas binefrectomizadas en las que se observa un aumento de hasta 46 veces en la liberación de renina por las glándulas adrenales (102). En nuestro estudio los niveles plasmáticos de renina observados en el día 8 muestran que este parámetro en las ratas nefróticas todavía está aumentado, por lo que la degradación por la renina puede ser un factor contribuyente en la disminución del Ao plasmático.

En las ratas controles los tratamientos que afectaron la CPR fueron la NX, el CAP y la ADX; en las ratas nefróticas la CPR se vio afectada por esos mismos tratamientos y por el EE. A consecuencia de la NX los niveles plasmáticos de renina de las ratas controles se redujeron en un 76.3% y los de las ratas nefróticas disminuyeron en un 97.8% ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento con captopril indujo un aumento de 1831% en la CPR de ratas controles y de 1439% en las ratas nefróticas, lo cual coincide con informes que indican que este inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I estimula la síntesis y secreción de renina (48,63,67,103). Se ha informado que la ADX causa un incremento en los niveles plasmáticos de renina (71,74,75,104,105), lo cual fue observado en este trabajo: las ratas controles mostraron un aumento de 1184% en la CPR, sin embargo, la CPR de las ratas nefróticas sometidas a este estímulo disminuyó en un 77.1%. Un aspecto interesante fue el hecho de que la CPR del grupo SN+ADX disminuyó a pesar de que no se extrajeron los riñones, lo que indica que las glándulas adrenales juegan un papel importante en la liberación de renina de los riñones. También se observó que el EE causó una disminución en la CPR de las ratas nefróticas. Sin embargo, el mecanismo por medio del cual sucede esto no se ha establecido.

La pérdida de Ao por orina, otro factor postulado como responsable de la disminución de la CPA en el SN, también se observó en los grupos de ratas nefróticas, lo que coincide con trabajos publicados previamente (49,51,106,107). Esta pérdida es consecuencia de la alteración en la membrana de filtración glomerular; además observamos que hubo cambios en la EUA de las ratas nefróticas en respuesta a los tratamientos con DEX, EE y CAP. De hecho estos cambios ocurrieron en la misma dirección que los cambios observados en el Ao plasmático, lo que indica que los cambios en la EUA son consecuencia de los cambios de Ao en plasma, confirmando que el Ao urinario proviene del plasma. Los tratamientos restantes no ocasionaron ningún cambio en la EUA de las ratas nefróticas y de las ratas controles.

En varios trabajos se han encontrado evidencias de que las variaciones en la CPA son consecuencia de alteraciones en la síntesis y secreción hepática de Ao y no del efecto de la renina (65-70,108,109).

Cada uno de los tratamientos indujo cambios en la CPA de los grupos de ratas CT, estos cambios coinciden con los que se han informado en la literatura: aumentos con DEX (59,62,71), EE (61,69), NX (64,65,75) y T3 (84) mientras que disminuyen con CAP (63,67,72) y con ADX (73-75). En los grupos de ratas nefróticas también ocurrieron cambios en la CPA en respuesta a casi todos estos tratamientos, con excepción de la ADX (SN =  $382 \pm 142$  vs SN+ADX =  $367 \pm 170$  ng Al/mL/h), y dichos cambios ocurrieron en la misma dirección que los que se presentaron en las ratas CT. Sin embargo, la magnitud del cambios en los aumentos o disminuciones fue diferente entre los grupos CT y nefróticos, ya que con DEX, EE y CAP las ratas nefróticas mostraron mayor magnitud de cambio en CPA, mientras que esta magnitud de los cambio fue mayor en las ratas CT en respuesta a la T3 y a la ADX (tabla XII).

Se ha informado que los glucocorticoides, estrógenos y hormonas tiroideas regulan los niveles del ARNm de Ao (52,76-79,110) y gracias a la clonación del gen de Ao de rata (57,111) se ha podido realizar este trabajo para analizar si hay alteraciones en los niveles del ARNm de esta proteína en las ratas nefróticas.



Los resultados obtenidos con la técnica de "slot blot" revelaron que las ratas nefróticas muestran los mismos niveles de ARNm de Ao que las ratas controles, lo que es indicativo de que no hay alteraciones en la expresión del gen de Ao en el SN.

Al comparar la magnitud de los cambios en los niveles del ARNm de Ao observados en respuesta a los tratamientos aplicados en ratas controles y nefróticas, se encontró que la magnitud fue la misma en todos los grupos, a excepción del tratamiento con ADX, en el que las ratas nefróticas mostraron una disminución menor a las ratas controles (CT+ADX  $27 \pm 2\%$  y SN+ADX  $41 \pm 7\%$ ,  $p < 0.05$ ), lo que quiere decir que el hígado de las ratas nefróticas fue capaz de responder de igual manera a los estímulos empleados que el hígado de las ratas normales.

El aumento observado en los niveles hepáticos del mensajero puede ser resultado de los siguientes mecanismos: a) Aumento en la transcripción del gen inducido directamente por la unión de estas hormonas a sitios específicos en la región del promotor del gen (56,76,112-118); b) Alteraciones en procesos pos-transcripcionales como degradación del ARNm o c) Una combinación de estos mecanismos. De hecho, la ocurrencia de esos tres mecanismos se ha demostrado en otros genes como el de oxigenasa de triptofano (119) y metilotionina-II $\alpha$  (120). Otros reportes indican que el aumento del ARNm de vitelogenina (121) y de apo-VLDL II (122) inducido por estrógenos es consecuencia de un aumento en la transcripción y de la prolongación en la vida media del ARNm.

Wong y Oppenheimer (123) han postulado que en el aumento del ARNm de Ao podría contribuir un elemento codificado por otro gen y que se expresara a consecuencia de la estimulación por algunas hormonas, como se ha considerado en el caso del aumento en el ARNm de la glicoproteína ácida  $\alpha 1$  en respuesta a dexametasona (124).

#### **EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ARNm DE Ao.**

Debido a que en las ratas nefróticas la respuesta en los niveles del ARNm de Ao fue similar a la observada en las ratas controles, podemos sugerir que no hay alteraciones en los mecanismos de respuesta a los tratamientos aplicados. Sin embargo el hecho de que los niveles plasmáticos de Ao se observen elevados en los grupos nefróticos tratados con DEX, EE y hormonas tiroideas, a pesar de la pérdida de esta proteína por orina, y que estos niveles sean semejantes a los observados en las ratas controles, indican la posibilidad de que exista un cambio en algún proceso pos-transcripcional como aumento en la velocidad de síntesis de Ao para compensar su pérdida por orina. Particularmente, el grupo de ratas nefróticas estimuladas con EE mostró una EUA muy elevada, mayor que la que se presentó en el grupo SN+DEX, por lo que inferimos que el mecanismo citado pudiera ser de una magnitud mucho mayor en respuesta al EE o incluso que alguna fuente extrahepática de Ao pudiera cooperar con el aumento de la CPA. Esta explicación es posible dado que en condiciones normales no ha podido detectarse la presencia de ARNm de Ao en algunos tejidos (particularmente la glándula pituitaria) sino hasta cuando se estimula su producción con la administración de estrógenos (124).

En los grupos de ratas controles y nefróticas, la respuesta a la nefrectomía fue muy similar y a diferencia de los otros grupos de ratas nefróticas, en este grupo no hubo pérdida de proteínas por orina porque no tenían riñones, lo que nos permite sugerir que el mecanismo de respuesta en estos grupos de animales fue el mismo. Hilgenfeldt y Schwind (75) han propuesto un mecanismo para explicar el aumento de CPA en ratas

binectomizadas el estrés de la cirugía al que se somete al animal causa la liberación de un bolo de renina y la formación de Angiotensina II, esta hormona se unirá a su receptor en hígado para estimular la síntesis de Angiotensina II y además podría unirse a su receptor en las glándulas adrenales para estimular la formación y liberación de un factor adrenal que también favoreciera la síntesis hepática de esta proteína. Esta hipótesis es apoyada por informes que señalan que la Angiotensina II y los glucocorticoides estimulan la síntesis del ARNm de Angiotensina II (110,125-128). Además también se ha informado que en la cromatina del hígado de rata existe un receptor específico de gran afinidad para la Angiotensina II (129) que podría participar en la estimulación de la transcripción del gen de Angiotensina II, y que al añadir actinomicina D a rebanadas de hígado se bloquea la biosíntesis de Angiotensina II, lo que sugiere que la síntesis de Angiotensina II es dependiente de la síntesis hepática de su ARNm (66). En los grupos sometidos a cirugía simulada (CT+C/SIMUL y SN+C/SIMUL) no se detectaron aumentos en el ARNm de Angiotensina II, lo que sugiere que el aumento de la CPA de los grupos sometidos a nefrectomía se debió principalmente a la eliminación de la fuente principal de renina.

Existen evidencias de que los tratamientos con inhibidores de la ECA disminuyen los niveles circulantes de Angiotensina II (48,63,67,103,130) y de su ARNm (82,83) y estimulan la síntesis del ARNm de renina (82,131-137). Nuestros datos de CPA coinciden con los reportados en la literatura, sin embargo, encontramos que los niveles del ARNm de Angiotensina II en las ratas control y nefróticas no cambian. El papel funcional de estos inhibidores es bloquear la formación de Angiotensina II, uno de los factores que estimulan la formación de Angiotensina II. De esta manera, la disminución de la CPA en las ratas control y nefróticas en respuesta al captopril parece deberse a un aumento en la degradación de Angiotensina II por el impresionante aumento en los niveles plasmáticos de renina dado que encontramos que los niveles del ARNm de Angiotensina II no cambian a consecuencia de este tratamiento.

La adrenalectomía es un modelo muy usado para estudiar el sistema renina-angiotensina. A consecuencia de este tratamiento hay una disminución en la CPA (73,74,138,141). Estos datos coinciden con los resultados que obtuvimos en el grupo control donde la CPA disminuyó a un 52%, sin embargo, a diferencia de los otros tratamientos, el grupo de ratas nefróticas sometidas a adrenalectomía no mostró el mismo comportamiento y la CPA se mantuvo en los mismos niveles que las ratas nefróticas. La mayoría de los autores responsabilizan al aumento en la renina circulante de la disminución de la CPA y de hecho nosotros también observamos un aumento en la CPR del grupo CT+C/SIMUL, pero en el grupo SN+ADX, la CPR disminuyó a un 22.8%, lo que refuerza la idea de que la renina es el factor responsable de la disminución de Angiotensina II plasmática, ya que al estar disminuida la CPR del grupo SN+ADX, la CPA no mostró cambios con respecto al grupo SN. Además encontramos que la síntesis del ARNm de Angiotensina II disminuye a un 26% en ratas control y a un 39% en ratas nefróticas. Esta respuesta coincide con las observaciones de Serrna (78) aunque Nasjletti (109), Voigt (81) y Kallnyak (77) han demostrado que la producción de Angiotensina II y de su ARNm no está modificada.

En las ratas del grupo SN+ADX encontramos una respuesta diferente a la observada en las ratas del grupo CT+ADX. En este último grupo la CPA disminuyó y la CPR aumentó, lo que puede indicar que la disminución de la CPA se debió al aumento en su degradación por los niveles elevados de renina plasmática. Además, la deficiencia de glucocorticoides provocada por la remoción de las glándulas adrenales podría estar también implicada en la disminución de la CPA, ya que estos compuestos estimulan la síntesis de Angiotensina II. Sin embargo considerando que la renina actúa sobre el Angiotensinógeno para producir Angiotensina I y que sobre este péptido actúa la ECA

para originar AII, que estimula la síntesis del ARNm de Ao así como de su proteína, el que no haya aumento en los niveles del ARNm de Ao nos indica que hay otros factores que impiden que la AII estimule la liberación de Ao. De esta manera podríamos explicar que la disminución de CPA en el grupo CT+ADX se debió al aumento de la CPR y a la disminución del ARNm de Ao, pero en el grupo SN+ADX el que la CPA no cambie, que la CPR muestre niveles similares a los de las ratas control, que los niveles del ARNm de Ao disminuyan a menos de la mitad y que el Ao se pierda por orina, parecen indicar que la síntesis de esta proteína aún es suficiente para mantener los niveles de CPA semejantes a los de las ratas nefróticas, y de acuerdo a lo observado en las ratas CT+ADX, parece ser que la renina es el factor responsable de la disminución en la CPA.

Hay pocos estudios de la modulación del gen de Ao en situaciones fisiológicas y patológicas. Las alteraciones en la modulación de este gen no están relacionadas necesariamente a sus niveles basales de expresión. En otras palabras, es posible que con niveles basales normales de ARNm de Ao se presenten alteraciones en su modulación, por ejemplo Klett *et al.* (142) encontraron que la respuesta a la administración de DEX y de EE es diferente entre ratas normotensas e hipertensas. Ellos midieron los niveles de ARNm de Ao en el hígado y encontraron que sus niveles basales son similares en esos grupos de ratas, pero el aumento en el ARNm a consecuencia de la administración de dexametasona fue significativamente mayor en las ratas hipertensas. Este mismo comportamiento se ha observado con el ARNm renal de renina de ratas normotensas y espontáneamente hipertensas en respuesta al captopril. Este inhibidor de la ECA provoca un aumento mayor en los niveles del ARNm de esta proteína en las ratas espontáneamente hipertensas (143).

También hay ejemplos de expresión basal y estimulada similares (142) y de expresión basal y estimulada diferentes (144). En el mismo trabajo de Klett (142) donde los niveles hepáticos del ARNm de Ao son similares en ratas normotensas e hipertensas, la respuesta al EE fue también similar en ambos grupos de ratas.

Pratt *et al.* (144) encontraron que en ratas normotensas la expresión basal del ARNm renal de Ao es mayor que en las ratas espontáneamente hipertensas. Cuando estas ratas fueron tratadas con dieta baja en sodio la respuesta o cambios en el ARNm de Ao fue diferente ya que en el grupo de ratas normotensas éste aumentó y en las ratas hipertensas no cambió.

Estos ejemplos ilustran que la modulación de la expresión de renina y de Ao no se puede predecir conociendo su expresión basal.

De esta manera, este trabajo indica que en las ratas con SN no existe alteración en la regulación de la expresión del gen hepático de Ao ya que sus niveles basales son similares a los de las ratas controles y responden de la misma manera que éstas a los tratamientos utilizados aquí, excepto a la ADX y que la disminución de la CPA observada en ratas con SN parece ser consecuencia de la degradación de Ao y de su pérdida por orina.

### 7. RESUMEN DE RESULTADOS.

1.- La administración del ANP indujo SN, el cual se hizo evidente por la presencia de proteinuria, hipoalbuminemia, hipoproteinemia, hipercolesterolemia y aumento en la creatinina sérica así como en el nitrógeno de urea sérico.

2.- En las ratas nefróticas se observaron los siguientes cambios en el sistema renina angiotensina: disminución de la concentración plasmática de angiotensinógeno y aumento en la concentración plasmática de renina.

3.- En las ratas nefróticas se observó que cuando hubo cambios en la CPA éstos se reflejaron en la EUA.

4.- Las ratas nefróticas no presentan alteración en los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno.

5.- Las ratas nefróticas respondieron de la misma manera que las ratas controles a los tratamientos, excepto a la ADX, que no produjo cambios en la CPA.

	CONTROLES		NEFROTICOS	
	CPA	ARNm	CPA	ARNm
DEX	↑ 223±20	↑ 216±51	↑ 274±80	↑ 234±43
EE	↑ 237±20	↑ 183±23	↑ 341±40	↑ 229±17
NX	↑ 254±40	↑ 227±35	↑ 247±70	↑ 262±47
T3	↑ 204±30	↑ 266±24	↑ 164±40	↑ 270±83
CAP	↓ 47±10	SIN CAMBIO	↓ 31±10	SIN CAMBIO
ADX	↓ 51±12	↓ 27±2	SIN CAMBIO	↓ 41±7

**8. CONCLUSIONES.**

La disminución del Ao plasmático en el SN no se debe a cambios en los niveles hepáticos del ARNm de esta proteína ni a cambios en la capacidad de respuesta del hígado a factores regulatorios. Los únicos factores documentados hasta ahora son su elevada excreción urinaria y su elevada degradación por los altos niveles de renina circulante.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Peach MJ. Renin-angiotensin system. *Physiol Rev* 1977;57:313-370.
2. Mitchell KD, Navar LG. The renin-angiotensin-aldosterone system in volume control. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1989;3:393-430.
3. Ballerman BJ, Zeidel ML, Gunning ME, Brenner BM. Vasoactive peptides and the kidney. En: *The kidney*. 4th ed. Brenner BM, Rector FC. Philadelphia: WB Saunders, 1991:510-583.
4. Sealey JE, Laragh JH. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. En: *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Laragh JH, Brenner BM eds. New York: Raven Press, 1990:1287-1317.
5. Lenz T, Sealy JE. Tissue renin systems as a possible factor in hypertension. En: *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Laragh JH, Brenner BM eds. New York, Raven Press, 1990:1319-1328.
6. Samani NJ, Swales JD. Molecular biology of the vascular renin-angiotensin system. *Blood Vessels* 1991;28:210-216.
7. Lindpaintner K, Wilhelm MJ, Jin M, Unger T, Lang RE, Scholkens BA, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. *J Hypertens* 1987;5:33-38.
8. Schunkert H, Hingelinger JR, Dzau VJ. Evolving concepts of the intrarenal renin-angiotensin system in health and disease: contributions of molecular biology. *Renal Physiol Biochem* 1991;14:146-154.
9. Ganten D, Hermann K, Unger T, Lang RE. The tissue renin-angiotensin system: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens* 1983;5(A):1099-1118.
10. Rodríguez MJ. Alteraciones metabólicas en el síndrome nefrótico. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, 1994.
11. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988;33:1184-1202.
12. Humphreys MH. Mechanisms and management of nephrotic edema. *Kidney Int* 1994;45:266-281.
13. Harris RC, Ismail N. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 1994;23:477-497.
14. Cameron JS. Complications of the nephrotic syndrome. En: *The nephrotic syndrome*. JS Cameron, RJ Glassock, Eds. Marcel Dekker, NY & Basel, 1988:849-920.
15. Kaysen GA. Nonrenal complications of the nephrotic syndrome. *Annu Rev Med* 1994;45:210-210.
16. Rabelink TJ, Zwaglinga JJ, Koomans HA, Sixma JJ. Thrombosis and haemostasis in renal disease. *Kidney Int* 1994;46:287-296.
17. Lach F. Hypercoagulability, renal vein thrombosis and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1985;28:429-439.
18. Wheeler DC, Bernard DB. Lipid abnormalities in nephrotic syndrome: causes, consequences and treatment. *Am J Kidney Dis* 1994;23:331-346.
19. Baker BR, Joseph JP, Williams JH. Puromycin synthetic studies. VII. Partial synthesis of amino acid analogs. *J Am Chem Soc* 1954;76:2838.

20. Hoedemaeker PJ. Experimental glomerulonephritis. En: Nephrology. Davidson AM, Eds. Cambridge University Press, 1988;1:424-426.
21. Von Goor H, Diamond JR, Grond J. Renal disease induced in rats by puromycin aminonucleoside. En: Experimental and genetic rat models of chronic renal failure. Gretz N, Strauch M, Eds. Karger, Basel, 1993;68-81.
22. Pedraza-Chaverri J, Calderón P, Cruz C, Peña JC. Electrophoretic analysis of serum and urinary proteins in rats with aminonucleoside induced nephrotic syndrome. *Renal Failure* 1993;15:149-152.
23. Girot R, Jaubert F, Leon M, Bellon B, Arach M, Josso F, Lepelletier O, Beguin S, Monnet JP. Albumin, fibrinogen, prothrombin and antithrombin III variations in blood, urine and liver in rat with nephrotic syndrome (Heymann nephritis). *Thromb Haemost* 1983;49:13-17.
24. Takeda Y, Chen AY. Fibrinogen metabolism and distribution in patients with nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 1967;70:678-685.
25. Jensen H, Bru-Jorgensen K, Jaunum S, Olesen H, Yssing M. Transferrin metabolism in the nephrotic syndrome and in protein-losing gastroenteropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:293-304.
26. Blad WH, Fields M, Goldman R. The turnover rate of serum albumin in the nephrotic syndrome as determined by <sup>131</sup>I-labelled albumin. *J Lab Clin Med* 1955;46:747-752.
27. Sun Y, Martin V, Weiss RH, Kaysen GA. Selective transcriptional augmentation of hepatic gene expression in the rat with Heymann nephritis. *Am J Physiol* 1993;264:F441-F447.
28. Kanwar YS. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest* 1984;51:7-21.
29. Kaysen GA. Plasma composition on the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1993;13:347-359.
30. Sato KA, Gray RW, Lemann Jr. Urinary excretion of 25-hydroxy vitamin D in health and the nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 1982;99:325-330.
31. Chan YK, Mason KS, Parmentier M, Saudie E, Lissner D, Posen S. Vitamin D metabolism in nephrotic rats. *Kidney Int* 1983;24:336-341.
32. Ellis D. Anemia in the course of the nephrotic syndrome secondary to transferrin depletion. *J Pediatr* 1977;90:953-955.
33. Allen AC, Hammond WS. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1990;37:1409-1413.
34. Ito S, Kato K, Ando T, Ichimura T. Thyroid function in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1994;8:412-415.
35. Musa BV, Seal VS, Due RP. Excretion of corticosteroid-binding globulin, thyroxine-binding globulin and total protein in adult males with nephrosis: effect of sex hormones. *J Clin Endocrinol* 1967;27:768-774.
36. Malnero A, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Serum and urinary ceruloplasmin in experimental nephrotic syndrome. *Clin Invest Med* 1992;15:295-300.
37. Peterson PA, Berggard I. Urinary immunoglobulin components in normal, tubular and glomerular proteinuria: quantiles and characteristics of the light chains, IgG, IgA and Fcγ fragment. *Eur J Clin Invest* 1971;1:255-264.

38. Al-Bander H, Martin VI, Kaysen GA. Plasma IgG levels are not defended when urinary protein occurs. *Am J Physiol* 1992;262:F333-F337.
39. Cruz C, Juárez-Nicolás F, Tapia E, Correa-Rotter R, Pedraza-Chaverri J. Abnormalities of coagulation in experimental nephrotic syndrome. *Nephron* 1994;68:489-496.
40. Vaziri ND, Toohey JA, Paule P, Hung E, Darwish R, Barton CH, Alkani S. Urinary excretion and deficiency of prothrombin in nephrotic syndrome. *Am J Med* 1984;77:433-436.
41. Vaziri ND, Paule P, Toohey JA, Hung E, Alkani S, Darwish R, Pahl MV. Acquired deficiency and urinary excretion of antithrombin III in nephrotic syndrome. *Arch Int Med* 1984;144:1802-1803.
42. Vaziri ND, Kaupke CJ, Barton CH, Gonzales E. Plasma concentration and urinary excretion of erythropoietin in adult nephrotic syndrome. *Am J Med* 1992;92:35-40.
43. Zhou XJ, Vaziri ND. Erythropoietin metabolism and pharmacokinetics in experimental nephrosis. *Am J Physiol* 1992;263:F812-F815.
44. Farquhar MG, Palade GE. Glomerular Permeability. II. Ferritin transfer across the glomerular capillary wall in nephrotic rats. *J Exp Med* 1961;114:699-741.
45. Venkatachalam MA, Coltran RS, Karnovsky MJ. An ultrastructural study on glomerular permeability in aminonucleoside nephrosis using catalase as tracer protein. *J Exp Med* 1970;142:1168-1180.
46. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:29-38.
47. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. *In vitro* release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev Invest Clin* 1990;42:120-126.
48. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, on proteinuria and sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:210-216.
49. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC. Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 1991;57:106-108.
50. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 1990;191:175-184.
51. Kato I, Takada Y, Nishimura K, Hiwada K, Kokubu T. Increased urinary excretion of angiotensin-converting enzyme in patients with renal diseases. *J Clin Chem Biochem* 1982;20:473-476.
52. Clauser E, Gallard I, Wei L, Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens* 1989;2:403-410.
53. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986;78:31-39.



54. Dzau VJ, Ellison KE, Brody T. A comparative study of the distribution of renin and angiotensinogen mRNA in rat and mouse tissues. *Endocrinology* 1987;120:2333-2338.
55. Campbell DJ, Habener JF. Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization *in situ*. *Endocrinology* 1987;121:1616-1626.
56. Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem* 1986;261:319-323.
57. Ohkubo H, Kaheyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2196-2200.
58. Doolittle RF. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science* 1983;222:417-419.
59. Krakoff LW. Measurements of plasma renin substrate by radioimmunoassay of angiotensin I: concentration in syndromes associated with steroid excess. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;37:110-117.
60. Hoj-Nielsen A, Knudsen F. Angiotensinogen is an acute-phase protein in man. *Scand J Clin Lab Invest* 1987;47:175-178.
61. Skinner SL, Lumbers ER, Symonds EM. Alterations by oral contraceptives of normal menstrual changes in plasma renin activity, concentration and substrate. *Clin Sci* 1969;36:67-76.
62. Genain C, Bouhnik J, Tewksbury D, Corvol P, Menard J. Characterization of plasma and cerebrospinal fluid human angiotensinogen and des-angiotensin I-angiotensinogen by direct radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:478-484.
63. Rasmussen S, Nielsen MD, Giese J. Captopril combined with thiazide lowers renin substrate concentration: implication for methodology on renin assays. *Clin Sci* 1981;60:591-593.
64. Bing J, Poulsen K. Experimentally induced changes in plasma angiotensinogen and plasma renin. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969;77:389-398.
65. Tateishi H, Nasjletti A, Masson GMC. Role of renin in the regulation of angiotensinogen levels in plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;137:1424-1428.
66. Freeman RH, Rostorfer HH. Hepatic changes in renin substrate biosynthesis and alkaline phosphatase activity in the rat. *Am J Physiol* 1972;223:364-370.
67. Radziwill R, Stulzmann M, Hilgenfeldt U, Hackenthal E. Converting enzyme inhibitor-induced changes of plasma angiotensinogen concentration in the rat. *Eur J Pharmacol* 1986;122:59-64.
68. Page IH, McCubbin JW. Renal Hypertension. Year Book Med. Pub. Chicago, 1968.
69. Dzau VJ, Herrmann HC. Hormonal control of angiotensinogen production. *Life Sci* 1982;30:577-584.
70. Gotoh E, Murakami K, Bahnon TD, Ganong WF. Role of brain serotonergic pathways and hypothalamus in regulation of renin secretion. *Am J Physiol* 1987;253:R179-R185.
71. Nasjletti A, Masson GMC. Effects of corticosteroids on plasma angiotensinogen and renin activity. *Am J Physiol* 1969;217:1396-1401.

72. Unger T, Yukimura T, Marín-Grez M, Lang RE, Rascher W, Ganten D. SA-446 a new orally active converting enzyme inhibitor: antihypertensive action and comparison with captopril in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1982;78:411-415.
73. Nakamura A, Iwao H, Fukui K, Kimura S, Tamaki T, Abe Y. Effect of angiotensin II on angiotensinogen production in adrenalectomized rats. *Life Sci* 1990;46:1657-1660.
74. Clauser E, Bouhnik J, Jaramillo HN, Auzan C, Corvol P, Menard J. Angiotensinogen production and consumption in adrenalectomized rat. *Endocrinology* 1985;116:274-280.
75. Hilgenfeldt U, Schwind S. Changes in the renin-angiotensin system after nephrectomy and adrenalectomy. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993;45:41-47.
76. Chang E, Perlman AJ. Multiple hormones regulate angiotensinogen messenger ribonucleic acid levels in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology* 1987;121:513-519.
77. Kalinyak JE, Pearlman AJ. Tissue-specific regulation of angiotensinogen mRNA accumulation by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987;262:460-464.
78. Sernia C, Clements JA, Funder JW. Regulation of liver angiotensinogen mRNA by glucocorticoids and thyroxine. *Mol Cell Endocrinol* 1989;61:147-156.
79. Kunapuli SP, Benedict CR, Kumar A. Tissue specific hormonal regulation of the rat angiotensinogen gene expression. *Arch Biochem Biophys* 1987;254:142-146.
80. Iwao H, Kimura A, Tamaki T, Ohkubo H, Nakanishi S, Abe Y. Elevated angiotensinogen mRNA levels in rat liver by nephrectomy. *Am J Physiol* 1990;258:E413-E417.
81. Voigt J, Koster F. Immunochemical studies on biosynthesis of rat plasma angiotensinogen and its regulation by cortisol. *Biochim Biophys Acta* 1985;842:100-107.
82. Nakamura A, Iwao H, Fukui K, Tamaki T, Kimura J, Yamamoto A. Effect of a single dose of enalapril on renin gene expression in the kidney and angiotensinogen gene expression in the liver of rats. *Clin Exp Hypertens* 1988;A10:1283-1284.
83. Iwao H, Fukui K, Kim S. Sodium balance effects on renin, angiotensinogen and atrial natriuretic polypeptide mRNA levels. *Am J Physiol* 1988;255:E129-E136.
84. Kimura S, Iwao H, Fukui K, Abe Y, Tanaka S. Effects of thyroid hormone on angiotensinogen and renin messenger RNA levels in rats. *Japan J Pharmacol* 1990;52:281-285.
85. Carretero O, Gross F. Renin substrate in plasma under various experimental conditions in the rat. *Am J Physiol* 1967;213:695-700.
86. Pedraza-Chaverri J, Zúñiga-Estrada A, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Producción de anticuerpos policlonales para la cuantificación del péptido angiotensina I por radioinmunoanálisis. *Rev Invest Clin* 1988;40:365-377.
87. Dumas B, Watson W, Biggs H. Albumin standard and this measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87-96.
88. Chomczynsky P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.

89. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
90. Lynch KR, Simnad VI, Ben-Ari ET, Garrison JC. Localization of preangiotensinogen messenger RNA sequences in the rat brain. *Hypertension* 1986;8:540-543.
91. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. En: Contemporary issues in nephrology. Vol 9. Brenner BM, Stein JH, Eds. New York, Churchill Livingstone 1982:85-120.
92. Frenk S, Antonowics I, Craigh JM, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.
93. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis. *J Lab Clin Med* 1957;40:437-446.
94. Vernier RL, Papermaster BW, Blood RA. Aminonucleoside nephrosis. I. Electronmicroscopic studies of the renal lesions in rats. *J Exp Med* 1959;109:115-126.
95. Glasscock RJ. The nephrotic syndrome. *Hosp Pract* 1979;14:105-129.
96. Schnapper HW, Robson AM. Nephrotic syndrome minimal change disease, focal glomerulosclerosis and related disorders. En: Diseases of the kidney. Vol II, 4th edition. Schrier RW, Gottschalk CW, Eds. Boston Little Brown 1988:1949-2004.
97. Baillie MD. Nephrotic edema. *Sem Nephrol* 1983;3:249-255.
98. Nakane H, Nakane Y, Corvol P, Menard J. Sodium balance and renin regulation in rats: role of intrinsic renal mechanisms. *Kidney Int* 1980;17:607-614.
99. Nakamura N, Soubrier F, Menard J, Panthier JJ. Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content and rat renin messenger RNA. *Hypertension* 1985;7:855-859.
100. Antonaccio MJ, Harris D, Goldberg H. Differences in kidney renin content between normotensive and spontaneously hypertensive rats: effect of captopril treatment. *Eur J Pharmacol* 1984;103:157-159.
101. Fernández-Repollet E, Tapia E, Martínez-Maldonado M. Effects of angiotensin converting inhibition on altered hemodynamics induced by low protein diet in the rat. *J Clin Invest* 1987;80:1045-1049.
102. Mizuno K, Hoffman LH, McKenzie JC, Inagami T. Presence of renin secretory granules in rat adrenal gland and stimulation of renin secretion by angiotensin II but not by adrenocorticotropin. *J Clin Invest* 1988;82:1007-1016.
103. Kokubu T, Ueda E, Ono M, Kawabe T, Hayashi Y, Kan T. Effect of captopril (SQ 14,225) on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal rats. *Eur J Pharmacol* 1980;62:269-275.
104. Geelhoed GW, Vander AJ. The role of aldosterone in renin secretion. *Life Sci* 1967;6:525-532.
105. Berns AS, Pluss RG, Erickson AL. Renin-angiotensin system and cardiovascular homeostasis in adrenal
106. Yayama K, Konishi K, Ohta A, Takano M, Ohtani R, Itoh N, Okamoto H. Elevation of plasma angiotensinogen in rats with experimentally induced nephrosis. *Nephron* 1993;63:89-93.
107. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Sandoval AA, Tapia E, Peña JC. Effect of captopril on urinary excretion of renin and angiotensinogen in aminonucleoside nephrosis. *Renal Failure* 1992;41:155-159.

108. Helmer OM, Griffith RS. Biological activity of steroids as determined by assay of renin-substrate (hypertensinogen). *Endocrinology* 1951;49:154-158.
109. Nasjletti A, Masson GMC. Studies on angiotensinogen formation in a liver perfusion system. *Circ Res* 1972;187[Suppl 2]:30-31.
110. Ben-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1988;255:E70-E79.
111. Tanaka T, Ohkubo H, Nakanishi S. Common structural organization of angiotensinogen and the  $\alpha$ -1-antitrypsin genes. *J Biol Chem* 1984;259:8063-8065.
112. Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochem* 1984;23:3603-3609.
113. Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 1989;8:87-99.
114. Ben-Ari ET, Lych KR, Garrison JC. Glucocorticoids induce the accumulation of novel angiotensinogen gene transcripts. *J Biol Chem* 1989;264:13074-13079.
115. Fukamizu A, Takahashi S, Seo MS, Tada M, Tanimoto K, Uehara S. Structure and expression of the human angiotensinogen gene. *J Biol Chem* 1990;265:7576-7582.
116. Clouston WM, Lyons IG, Richards RI. Tissue specific and hormonal regulation of angiotensinogen minigenes in transgenic mice. *EMBO J* 1989;8:3337-3343.
117. Clouston WM, Evans BA, Haralambides J, Richards RI. Molecular cloning of the mouse angiotensinogen gene. *Genomics* 1988;2:240-248.
118. Hackenthal E, Klett C, Munter K. Control of angiotensinogen synthesis and secretion by the liver. *Med Sci Res* 1988;16:7-10.
119. Danesch U, Hashimoto S, Renkawitz R, Scutz G. Transcriptional regulation of the tryptophan oxygenase gene in rat liver by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1983;258:4750-4753.
120. Karini M, Haslinger A, Holtgreve H, Cathalo G, Slater E, Baxter JD. Activation of a heterologous promoter in response to dexamethasone and cadmium by metallothionein gene 5'-flanking DNA. *Cell* 1984;36:371-379.
121. Wolfe AP, Perlman AJ, Tata JR. Transient paralysis by heat shock of hormonal regulation of gene expression. *EMBO J* 1984;3:2763-2770.
122. Wiskocil R, Bensky P, Dower W, Goldberger RF, Gordon JI, Deeley RG. Coordinate regulation of two estrogen-dependent genes in avian liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4474-4478.
123. Wong NCW, Oppenheimer JH. Multihormonal regulation and kinetics of induction of a hepatic mRNA sequence which is slowly responsive to triiodothyronine. *J Biol Chem* 1986;261:10387-10393.
124. Healy DP, YE M-Q, Yuan L-X, Schachter BS. Stimulation of angiotensinogen mRNA levels in rat pituitary by estradiol. *Am J Physiol* 1992;263:E355-E361.
125. Iwao H, Nakamura A, Fukui K, Kimura S, Tamaki T, Abe Y. Endogenous angiotensin II regulates hepatic angiotensinogen production. *Life Sci* 1990;47:2343-2349.
126. Klett C, Hackenthal E. Induction of angiotensinogen synthesis and secretion by angiotensin II. *Clin Exp Hypertens* 1987;A9:2027-2047.

127. Hackenthal E, Klett C. Angiotensin II and dexamethasone regulate angiotensinogen mRNA by different mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45:33-40.
128. Klett C, Hellman W, Suzuki F, Nakanishi S, Ohkubo H, Ganten D. Induction of angiotensinogen mRNA in hepatocytes by angiotensin II and glucocorticoids. *Clin Exp Hypertens* 1988;A10:1009-1022.
129. Vizard DL, Brown J, Bryan SE. Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;119:220-227.
130. Pedraza-Chaverrí J, Sánchez MCC, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Niveles de angiotensina II en ratas sometidas a estímulos del sistema renina-angiotensina. *Rev Invest Clin* 1988;40:253-258.
131. Ludwig G, Suzuki F, Murakami K, Ganten D, Hackenthal E. Kidney renin mRNA, renin secretion and plasma renin following adrenalectomy, salt depletion or enalapril treatment in the rat. *Hypertension* 1986;4:S431-S433.
132. Ludwig G, Ganten D, Murakami K, Fasching U, Hackenthal E. Relationship between renin mRNA and renin secretion in adrenalectomized, salt-depleted or converting enzyme inhibitor-treated rats. *Mol Cell Endocrinol* 1987;50:223-229.
133. Johns DW, Peach MJ, Gómez RA, Inagami T, Carey RM. Angiotensin II regulates renin expression. *Am J Physiol* 1990;259:F882-F887.
134. Barret GL, Morgan TO, Smith M, Alcorn D, Aldred P. Effect of converting enzyme inhibition on renin synthesis and secretion in mice. *Hypertension* 1989;14:385-395.
135. Gómez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol* 1990;259:F660-665.
136. Kitami Y, Hiwada K, Kobubu T. Kidney renin gene expression in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1989;7:727-731.
137. Gómez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N. Renin and angiotensinogen expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* 1988;254:F900-F906.
138. Gaudino NM. Acción de las glándulas suprarrenales sobre el hipertensinógeno. *Rev Soc Arg Biol* 1954;20:259-262.
139. Haynes FW, Forsham PH, Hume DM. Effects of ACTH, cortisone, deoxycorticosterone and epinephrine on the plasma hypertensinogen and renin concentration in the dogs. *Am J Physiol* 1953;172:265-269.
140. Bouhnik J, Clauser E, Gardes J, Corvol P, Menard J. Direct radioimmunoassay of rat angiotensinogen and its application to rats in various endocrine states. *Clin Sci* 1982;62:355-360.
141. Clauser E, Bouhnik J, Coezy E, Corvol P. Synthesis and release of immunoreactive angiotensinogen by rat liver slices. *Endocrinology* 1983;112:1188-1193.
142. Klett C, Hellmann W, Hackenthal E, Ganten D. Modulation of tissue angiotensinogen gene expression by glucocorticoids, estrogens, and androgens in SHR and WKY rats. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:683-708.

143. Kitami Y, Hiwada K, Kokubu T. Kidney renin gene expression in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1989;7:727-731.

144. Pratt RE, Zou WM, Naftilan AJ, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Altered sodium regulation of renal angiotensinogen mRNA in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1989;256:F469-F474.

## 10. APÉNDICE A.

## REACTIVOS:

- **Albúmina sérica bovina (ASB) grado RIA al 5%:**

- **8-dihidroxiquinoleína al 6.6%:**

8-dihidroxiquinoleína 0.66 g

Aforar a 10 mL con agua destilada.

Guardar a 5°C.

- **Dímercaprol al 3.4%:**

Dímercaprol 340 µl

Benzoato de bencilo 160 µl

Aceite de cacahuete 9.5 mL

Guardar a 5°C.

- **Amortiguador de ensayo Tris 0.1 M pH 7.38:**

Trizma base 6.055 g

Aforar a 500 mL y ajustar el pH.

- **Amortiguador de maleatos 0.2 M pH 6.0:**

Acido maleico 5.805 g

Aforar a 250 mL y ajustar el pH.

- **Carbón activado:**

Carbón activado 3 g

Dextrán 0.3125 g

Aforar a 500 mL con amortiguador de ensayo.

Disolver en frío.

Guardar a 4°C.

- **Renina porcina:**

Se prepara de acuerdo a la información de la etiqueta del frasco.

Ejemplo:

Información de la etiqueta: 1.1 Unidades; 0.26 mg Sólido; 0.131 mg proteína; 4.2 Unidades/mg Sólido;

8.4 Unidades/mg Proteína.

Cálculos:

Hay 4.2 unidades por mg sólido:

4.2 Unidades - 1 mg

x - 0.26 mg

x = 1.09 Unidades Hay 1.09 unidades en 0.26 mg

En 100 µg hay 1 unidad:

1 Unidades - 100 µg

x - 1 µg

x = 0.01 Unidades En 1 µg hay 0.01 unidades

Si queremos colocar 0.01 unidades en 5  $\mu$ l:

5  $\mu$ l - 0.01 Unidades

x - 1.09 Unidades

x = 840  $\mu$ l

(840  $\mu$ l)(5  $\mu$ l) = 4200  $\mu$ l de agua destilada. Dividir en alícuotas de 50  $\mu$ l.

**- H<sub>2</sub>O-DEPC**

DEPC 1 mL

Aforar a 1 L y dejar en baño María a 37°C durante 12 h.

**- Amortiguador MOPS 12X pH 7.0**

MOPS 56.51 g

Acetato de sodio 1 M 60 mL

EDTA disódico 0.5 M 4 mL

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O-DEPC.

**- Amortiguador MOPS 10X pH 7.0**

MOPS 41.86 g

Acetato de sodio 1 M 6.8 g

EDTA 0.5 M 20 mL

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O-DEPC.

Esterilizar por filtración.

**- Solución desnaturalizante de electroforesis: (Para 10  $\mu$ g de ARN)**

Formamida 10  $\mu$ l/muestra

MOPS 10X 2  $\mu$ l/muestra

Formaldehído 4  $\mu$ l/muestra

Azul de bromofenol 2  $\mu$ l/muestra

**- Azul de bromofenol:**

Glicerol 1 mL

EDTA 0.5 M 40  $\mu$ l

Azul de bromofenol 5 mg

Xylene clanol 5 mg

H<sub>2</sub>O-DEPC 960  $\mu$ l



**- Bromuro de etidio:**

Bromuro de etidio	2.5 mg
H <sub>2</sub> O-DEPC	1 mL

**- Amortiguador de corrida pH 7.0**

MOPS 12X	83.3 mL
----------	---------

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O-DEPC.

**- Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 6.5:**

Monofosfato de sodio	120 g
Difosfato de sodio	142 g

Ajustar el pH y aforar a 2 L con agua esterilizada.

**- Amortiguador de transferencia de fosfatos 0.025 M pH 7.0:**

A. de fosfatos 0.5 M pH 6.5	20 mL
Agua esterilizada	980 mL

No ajustar el pH.

**- Amortiguador SSC 20X pH 7.0:**

NaCl 3M	175.32 g
Citrato de sodio 0.3 M	88.23

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O-DEPC.

**- Amortiguador de transferencia SSC 10X:**

SSC 20X:	500 mL
H <sub>2</sub> O esterilizada	500 mL

**11. APÉNDICE B.****Preparación de la Al-125:**

En el paquete de la Al-125 se incluye la tabla de decaimiento del 125 para calcular su % de actividad transcurridos cualquier número de días. Se calculó ese dato y se obtuvo la masa radiactiva (MR):

$$MR = \frac{\text{Actividad}}{\text{Actividad específica}}$$

Los RIAs de Al realizados en el laboratorio generalmente constan de 170 tubos, a cada uno de ellos se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de una solución de Al-125 con una concentración de 100  $\text{pg/ml}$ , por lo que se necesitan 8.5 mL de solución y 850  $\text{pg}$  de Al-125 para cada RIA.

Dividir la masa radiactiva entre 850  $\text{pg}$  para obtener el número de RIAs de 170 tubos que pueden realizarse de acuerdo a la actividad de la Al-125.

Reconstituir la Al-125 con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. La actividad de Al-125 deseada es de 50  $\mu\text{Ci/ml}$ , de acuerdo a la actividad calculada del 125 calcular el volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  necesaria usando la siguiente relación:

$$\mu\text{L de H}_2\text{O} = \frac{\text{Actividad actual}}{50 \mu\text{Ci/ml}}$$

Dividir este dato entre el número de RIAs calculado para obtener el número de alícuotas de Al-125 que se obtendrán.

Guardar las alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$ .

## 12. APÉNDICE C.

### Cálculo de la actividad específica de la sonda marcada.

Se armó un sistema de vacío con un matraz kitasato, en cuya boca se colocó un filtro y sobre éste un filtro de fibra de vidrio en el que se adicionaron 2 µl de la sonda marcada. Después de 2 min se lavó con HCl 0.1 M y con alcohol absoluto 3 veces.

En un vial para contador de radiaciones beta se agregaron 5 mL de líquido de centelleo y sumergir en él el filtro de fibra de vidrio.

Se repitió el procedimiento con otro filtro de fibra de vidrio con excepción del lavado con ácido y alcohol.

Los viales se colocaron en un contador de radiaciones beta y con los datos obtenidos se empleó la siguiente fórmula para calcular la actividad específica de la sonda marcada:

$$AE = \frac{(\mu Ci) (2.2 \times 10^9) (P)}{Mi + [(1.3 \times 10^3) (P) (\mu Ci/AE)]}$$

Donde:

AE = Actividad específica (dpm/µg)

µCi = Cantidad de nucleótido marcado presente en la mezcla de reacción (en µCi).

P = Proporción de nucleótido marcado incorporado a la sonda y calculado de la siguiente

manera:

$$\frac{\text{cpm filtro lavado}}{\text{cpm filtro no lavado}}$$

Mi = Cantidad de ADN templado (ng)

AE = Actividad específica del nucleótido marcado (Ci/mmol) ó (µCi/nmol)

NOTA: Multiplicando los µCi por  $2.2 \times 10^9$  se calcula el número total de dpm en la reacción. Este cálculo también convierte el valor final de AE de dpm/ng a dpm/µg. Se multiplica el valor resultante por P para calcular la proporción de dpm incorporadas a la sonda.