



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ANGIOTENSINA I PLASMATICA EN LA  
INSUFICIENCIA RENAL CRONICA**

266

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

**Aida Marina Loaiza Gómez**

México, D. F.

1976



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

... LAS Tesis  
... ABO 1976  
... FECHA 1976  
... PAGO \_\_\_\_\_  
... \_\_\_\_\_

264



**QUÍMICA**

PRESIDENTE: Q.F.B. RAMON GUEVARA ESTRADA  
V O C A L : Q.F.B. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO  
JURADO SECRETARIO: Q.F.B. GPE. LETICIA CARRASCO RIVERA  
1er. SUPLENTE: Q.F.B. JOSEFINA PIEDRAS ROSS  
2do. SUPLENTE: Q.F.B. LUZ MA. HERNANDEZ BELTRAN

Sitio donde se desarrolló el tema: DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA  
HOSPITAL GENERAL  
DEL CENTRO MEDICO NACIONAL  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Nombre del sustentante: AIDA MARINA LOAIZA GOMEZ

Nombre del asesor del tema: Q.F.B. RAMON GUEVARA ESTRADA

A mis padres:

Sr. Luis Loaiza Marín

Sra. Concepción Gómez de Loaiza

A mis tios y abuelitos

Con agradecimiento a los señores:

Q.F.B. Ramón Guevara Estrada

Dr. Manuel Torres Zamora

A la Señorita Q.B.P. Ma. Luisa Gutiérrez

## C O N T E N I D O

- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- GENERALIDADES
  - a) De la insuficiencia renal crónica
  - b) Estudios de laboratorio en la insuficiencia renal crónica.
  - c) Del método de Radioinmunoensayo.
- IV.- SELECCION DE LOS PACIENTES
- V.- DESCRIPCION DEL METODO DE RADIOINMUNOENSAYO PARA MEDIR ANGIOTENSINA I PLASMATICA
- VI.- RESULTADOS
- VII.- ANALISIS BIOESTADISTICO
- VIII.- RESUMEN
- IX.- CONCLUSIONES
- X.- BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I



## INTRODUCCION

En los últimos años se ha observado que el método de radioinmunoensayo en estudios biológicos ofrece muchas ventajas, sobre otros métodos, que incluyen: precisión, exactitud, sensibilidad y rapidez.

El método de radioinmunoensayo se basa en la capacidad que tiene una hormona protéica marcada con  $^{125}\text{I}$  - (antígeno) para competir con el anticuerpo específico - (en cantidad limitada), y así inhibir la unión del anticuerpo con dicha hormona.

Por lo tanto el motivo de este trabajo es demostrar que se puede determinar la actividad de renina - - plasmática, midiendo la generación de angiotensina I -- con el método de radioinmunoensayo, que resulta ser superior a otros métodos para determinación de actividad de renina plasmática.

Este estudio se planeó en pacientes con insuficiencia renal crónica porque se ha visto que la retención de sodio y los valores de angiotensina plasmática son los factores más importantes en el mantenimiento --

de la hipertensión arterial en este padecimiento.

## ANTECEDENTES

Al final del siglo pasado, Tigerstedt y Bergman - observaron que la inyección intravenosa de un extracto de tejido renal producía un aumento lento y sostenido - de presión sanguínea. Ellos llamaron "RENINA" al princi - pio activo. Luego se demostró que la inyección repetida re renina cruda producía respuestas presoras cada vez - menores, propiedad llamada "taquifilaxia". Se observó - más tarde que la purificación de la proteína activa au- mentaba su actividad presora cuando se inyectaba por -- vía intravenosa, pero disminuía su capacidad de con- -- traer los vasos de la oreja de un conejo cuando se per- fundía con solución de Ringer-Locke. Sin embargo, la -- adición de plasma al líquido de perfusión que contenía renina purificada tenía por resultado una constricción intensa de la oreja.

Dos investigadores, Page en Estados Unidos de Nor- teamérica y Houssay en Argentina demostraron que la re- nina es una enzima proteolítica que reacciona con un -- componente plasmático para producir una sustancia preso- ra, denominada por esos grupos de investigadores "Angio

tonina" e "Hipertensina", respectivamente.

Por acuerdo posterior, esta substancia se denominó "ANGIOTENSINA". Investigaciones más recientes han de mostrado que el substrato plasmático es una alfa 2 globulina; que el producto inicial de su desdoblamiento -- por la renina, es un decapeptido llamado angiotensina I con actividad presora débil o nula. Este decapeptido es transformado en un octapeptido de gran actividad presora, que es la angiotensina II; acción debida a una enzima plasmática llamada convertina, cuya actividad requiere la presencia de cloruros<sup>1</sup>.

Cuando se inyecta por vía intravenosa una pequeña cantidad de angiotensina II, la presión sanguínea aumenta notablemente y sigue alta por 5 ó 10 minutos aproximadamente. En cambio, la inyección de renina purificada produce un aumento lento de presión y se mantiene este nivel elevado de 40 á 60 minutos, la acción prolongada de la renina se debe a formación lenta, continua, de angiotensina en el plasma sanguíneo circulante. Existe -- también en muchos órganos, entre ellos riñón, intestino e hígado, enzimas angiotensinasas que destruyen el octapeptido presor. La angiotensina II es relativamente resistente al calor, se disuelve en agua y alcohol, y es dializable.

Se han aislado de plasma de cerdo unos 5 substratos diferentes de renina, que difieren sólomente por el carbohidrato de la molécula de glucoproteína. La renina rompe un enlace leucina-leucina que une los ácidos aminados 10 y 11 de la proteína para formar el decapeptido angiotensina I. La enzima transformadora extrae la histidina y la leucina de la terminal C de este péptido para formar el octapeptido activo angiotensina II cuya estructura es la siguiente:



Las angiotensinasas del cerdo y del caballo son idénticas; la del carnero difiere, en cuanto al ácido aminado de posición 5, donde se encuentra valina en lugar de isoleucina<sup>2</sup>. Se han sintetizado una serie de análogos de angiotensina, y se han definido los requerimientos para su actividad biológica<sup>3</sup>.

Por varios métodos de investigación, como técnica de anticuerpos fluorescentes, cultivo de tejidos, centrifugación diferencial y examen citológico, se ha encontrado que el sitio de producción de renina son -- las células granulares de la arteriola aferente, a nivel del polo vascular glomerular. Sin embargo, en diferentes estudios se ha mencionado que la renina se puede encontrar también en la mácula densa. Todos los es-

tudios indican que el sitio de producción de renina son las células yuxtaglomerulares.

En las investigaciones de Hartroft se ha establecido la relación entre el aumento de la granulación de las células yuxtaglomerulares y el aumento de la actividad plasmática de renina.

Hay varias pruebas a favor de que la renina sea secretada por las células yuxtaglomerulares:

- 1.- En las ratas hipertensas por maniobra de Goldblatt, el riñón cuya arteria se encuentra en constricción, presenta células yuxtaglomerulares ricas en gránulos, (alta actividad secretora). Las células yuxtaglomerulares del otro riñón, cuya perfusión es normal, contienen menos gránulos que los riñones de ratas testigo (actividad secretora disminuida).
- 2.- También en la rata, los riñones aislados perfundidos con sangre a alta presión pierden la granulación de las células yuxtaglomerulares. En riñones perfundidos con presiones normales o bajas la granulación persiste. Estas dos observaciones sugieren que una disminución de la presión en arteriola aferente, mediante ligadura parcial de la arteria renal, estimula la secreción de renina por las célu--

las yuxtaglomerulares. La formación de angiotensina II en la sangre circulante produce un aumento compensador de la presión arterial; en cambio una presión aumentada en la arteria renal disminuye la producción basal de renina.

3.- Una alimentación rica en sal, y la inyección de desoxicorticosterona (DOCA) producen hipertensión acompañada por desaparición de los gránulos de las células yuxtaglomerulares. Una alimentación sin sodio, así como la suprarrenalectomía, disminuyen la presión arterial. Ambos procedimientos aumentan notablemente la cantidad de gránulos en las células yuxtaglomerulares.

4.- Puede obtenerse renina de la corteza renal que contiene glomérulos, pero no de la médula ni de la papila donde sólo hay túbulos.

El aislamiento de los glomérulos y vasos correspondientes (con un dispositivo magnético) después de inyectar partículas de hierro ha mostrado que la fuente de renina es, el glomérulo o bien los vasos unidos a él.

5.- La cantidad de renina que puede obtenerse de los riñones es paralela a la cantidad de gránulos que se

encuentran en células juxtaglomerulares.

- 6.- Los anticuerpos contra renina de conejo marcados con fluoresceína, se localizan específicamente en los gránulos de las células juxtaglomerulares.

Todas estas pruebas sugieren: que el polo vascular glomerular es un órgano que al mismo tiempo percibe la presión y secreta hormonas; que los gránulos de las células juxtaglomerulares contienen la RENINA; que la compresión de una arteria renal aumenta la secreción de RENINA, produciendo un aumento compensador de la presión arterial de perfusión.

Algunos trabajos recientes han relacionado la angiotensina con la regulación normal de la presión arterial en distintos estados funcionales, además se sabe que la angiotensina es fundamental en la regulación de secreción de aldosterona, facilitando así indirectamente la conservación de sodio por el túbulo renal y el aumento del volumen extracelular. Al actuar directamente sobre los túbulos renales, la angiotensina disminuye la reabsorción de sodio y contrarresta la conservación indirecta de este ión producida por la aldosterona.

Las distintas funciones de la renina y angioten--



sina que acabamos de mencionar hacen poco probable que la actividad del sistema se encuentre bajo influencia de un factor único. Vander ha revisado los mecanismos principales que intervienen en la regulación de la liberación de renina, los cuales son:

- a).- Los cambios de presión dentro de arteriolas aferentes.
- b).- Los cambios de composición del líquido tubular a nivel de la mácula densa.
- c).- Los impulsos nerviosos simpáticos.
- d).- Las catecolaminas y otras sustancias humorales conocidas o no.

Skeggs (1951) en su primer intento para determinar angiotensina en sangre utilizó un riñón artificial y los dializados obtenidos fueron purificados y su actividad presora fué probada en la rata. Más tarde desarrolló un método para medir la angiotensina en sangre utilizando 250 ml que fueron extraídos rápidamente de la arteria y puestos en alcohol. Los filtrados alcohólicos fueron purificados por extracción y cromatografía, obteniéndose un 50 á 60% de pureza. Posteriormente el método fué aplicado para el ensayo de sangre arterial en sujetos humanos. Se observó que la concentra

ción de angiotensina en sangre en casos de hipertensión maligna es mucho más alta que en sujetos normotensos y pacientes con hipertensión benigna<sup>4</sup>.

Paladini (1959) introdujo un método que requiere solamente 50 ml de sangre para el ensayo de angiotensina. La recuperación fué de 63%. Buchner (1964) describió un método más corto para la determinación de angiotensina en sangre arterial; con muestras de 50 a 100 - ml de sangre obtuvo extractos que fueron tratados por cromatografía sobre papel, después eluidos, evaporados secados y finalmente ensayados en ratas.

Debido al bajo peso molecular de la angiotensina, es difícil la producción de anticuerpos por lo que, -- Deodhar (1960), entrelazando químicamente este polipéptido a una proteína indujo la producción de un antisueero en conejos con reacción cruzada con angiotensina II. Goodfriend usó un conjugado con carbodimida para producir complejos de angiotensina II-proteína. Haber, -- por medio de radioinmunoensayo empleando filtración en gel fué capaz de obtener pequeñas cantidades de angiotensina, haciendo reaccionar la angiotensina marcada con <sup>131</sup>I con anticuerpos producidos en conejos mediante la inyección de un polímero angiotensin-poli-L-licina. Al adicionar angiotensina sin marcar a la mezcla

antígeno-anticuerpo, una parte de la angiotensina marcada se desplazó del complejo y se encontró una relación cuantitativa, entre la cantidad de angiotensina no marcada añadida, libre, y la angiotensina marcada resultante del complejo.

También para la renina se practicaron bioensayos, existiendo dos métodos para su determinación, directo e indirecto. El primer método está fundamentado en el efecto presor, inyectando intravenosamente a un animal una solución de renina. Los extractos no estaban libres de angiotensinasas. Haas, en 1966, pensó que el animal ideal para el ensayo era el perro porque no requiere anestesia complicada o procedimientos quirúrgicos largos, además los perros responden a la inyección intravenosa de la renina de todos los mamíferos. Nair, en 1959, usó un método similar para el ensayo de renina usando, en lugar de perros conejos entrenados sin anestesia.

En el método indirecto la renina es incubada con una cantidad relativamente grande de substrato apropiado. Para un ensayo preciso tanto renina como substrato no deben contener angiotensinasas. Haas realizó esta prueba con substrato de suero humano, eliminando angiotensinasas por procedimientos que incluyen tratamien--

tos con EDTA, fraccionamiento con sulfato de amonio y diálisis. El suero ya libre de angiotensinasas fué in cubado 10 horas a 38° C y a un pH de 6.9. La cantidad de angiotensinasas que fueron eliminadas para este mé todo y con las condiciones experimentales antes ex- - puestas se utilizaron para el ensayo presor directo - en perros preparados.

Para obtener el sustrato de renina en altas concentraciones, Alonso fraccionó plasma obtenido de perros en los que se había practicado nefrectomía.

Cook y Lee descubrieron que la preparación - -- ideal de sustrato para obtención de renina debería - tener las siguientes propiedades: 1) una alta actividad en términos de angiotensina producida por mg de - proteína presente; 2) ser estable; 3) no regenerar -- sustancias vasoactivas cuando sea incubada sola; 4) estar libre de angiotensinasas. Tuvieron éxito preparando dichos sustratos de plasma, bajo condiciones - esteriles, de conejos en los que se había practicado nefrectomía. El suero fué purificado por cromatogra-- fía usando técnica estéril. Si esta técnica no se hubiera usado, la angiotensina hubiera aparecido activa mente en las soluciones al ser contaminadas por micro organismos. Como la renina estándar fué obtenida de -

conejo en etanol seco, la relativa sensibilidad de este método no puede ser comparada al usado por Haas.

Se vió entonces que la obtención de renina en plasma en el hombre y animales es más complicado que la obtención en el tejido de riñón<sup>4</sup>.

Los métodos de bioensayo que se han descrito nos servirán para hacer una comparación con el método de Radioinmunoensayo que se utilizó en este trabajo y poder ver las ventajas que reúne este método, tanto en sensibilidad como en la disminución del tiempo empleado en otros métodos más complicados.

C A P I T U L O    I I I

## GENERALIDADES

### a) De la insuficiencia renal crónica

La función primordial del riñón es la de mantener en sus límites normales las condiciones físicas y químicas del plasma sanguíneo, siendo la orina el producto de la actividad del riñón donde se excretan los productos metabólicos.

La insuficiencia renal crónica generalmente avanza lentamente y dura a menudo meses o años antes de que sus síntomas se desarrollen. El padecimiento se caracteriza por la reducción gradual de las funciones renales causando retención de productos metabólicos y disturbios en el medio, y como la pérdida de la función renal es gradual el cuadro clínico es diferente al de la insuficiencia renal aguda.

Dentro de lo que caracteriza a la insuficiencia renal crónica, la retención nitrogenada (elevación de los valores en sangre de urea, creatinina, nitrógeno total no protéico y nitrógeno residual) es consecuencia de la disminución de la filtración glomerular. La

retención nitrogenada solo alcanza un nivel moderado - cuando la filtración glomerular ha descendido por debajo del 50% de su valor normal, posteriormente alcanza cifras elevadísimas que expresadas en urea sobrepasan los 500 y 600 mg% cuando la filtración glomerular está por debajo de 10 ml/minuto.

En la aparición de la hiperazoemia (aumento de - sustancias nitrogenadas en la sangre) y el comienzo - de la enfermedad renal causal puede mediar un período de tiempo considerable que puede ser de 15 a 20 años - en algunas glomerulonefritis crónicas. Sin embargo de un modo general la retención nitrogenada es más precoz y acentuada en las nefropatías glomerulares que en las tubulointersticiales, debido a que en aquellas lo primero en afectarse son los glomerulos, en tanto que en estas la afectación glomerular es secundaria y tardía.

Otra de las características de la insuficiencia renal crónica es que se altera la capacidad de producir una orina concentrada, que clínicamente se manifiesta por poliuria con orina de baja densidad.

Los síntomas iniciales de una insuficiencia renal son variados pero son frecuentes: la fatiga física y mental, la inapetencia y el estado nauseoso. Avanzando el proceso, el organismo entero acusa las consecuen



parte de las enfermedades renales que cursan con insuficiencia renal presentan también hipertensión arterial y el síndrome secundario de la misma es decir la enfermedad cardiovascular hipertensiva.

Dentro de los síntomas respiratorios, la disnea con respiración profunda, de Kussmaul, o la forma rítmica de Cheyne-Stokes, es frecuente en los períodos avanzados, el enfermo es insensible a su disnea, permanece tranquilo y quieto; estas modificaciones del ritmo respiratorio son debidas a la acidosis sistémica.

Dentro de las alteraciones hematológicas la anemia es un signo casi constante de la insuficiencia renal crónica, aún cuando esta no sea muy importante, es frecuente encontrar cifras de hematíes entre 3.5 y 3 millones en casos de insuficiencia renal avanzada con disminución de la filtración glomerular por debajo de los 30 ml/minuto, la anemia puede llegar a menos de los 2 millones, es normocítica y normocrómica, con sideremia normal o ligeramente elevada.

La tendencia hemorrágica de la insuficiencia renal se caracteriza por gingivorragias, petequias, equimosis, epistaxis, hematemesis y melenas.

En la insuficiencia renal crónica de larga dura-

ción se producen alteraciones esqueléticas en casi el 50% de los casos que se conocen como osteodistrofia renal.

Las manifestaciones psíquicas del cuadro urémico son muy variables hay enfermos que conservan su lucidez mental hasta el momento de entrar en coma; otros en cambio tienen confusión mental y desorientación espacial y temporal mucho tiempo antes de presentarse el estado de coma. Es posible que en estos últimos casos influya también el aporte defectuoso de oxígeno a las células cerebrales debido a la anemia, así como a la presencia de sustancias tóxicas que inhiben los procesos enzimáticos de las neuronas.

El coma es el estadio final del síndrome urémico. Este cuadro es cada vez menos frecuente, quizá porque las alteraciones bioquímicas y electrolíticas son mejor conocidas y pueden ser corregidas adecuadamente.

Las causas de la insuficiencia renal crónica en un 60% son principalmente: 1) la glomerulonefritis 2) hipertensión maligna y 3) pielonefritis crónica.

La glomerulonefritis es una enfermedad que afecta las asas capilares del glomérulo. Durante la glome

En la nefritis crónica la velocidad de filtración glomerular disminuye progresivamente. Aparece hiperazoemia relativamente importante cuando la velocidad de filtración glomerular llega a ser menor de 40 ml/minuto.

Pueden explicarse satisfactoriamente la retención de nitrógeno y el aumento de las cifras sanguíneas de sulfato, urato, creatinina, etc., por la disminución de la velocidad de filtración glomerular.

La hipertensión maligna tiene la triada clásica de:

- 1).- Presión sanguínea diastólica que excede de 130 - mm. Hg.
- 2).- Neurorretinopatías hipertensivas.
- 3).- Daño renal demostrado por proteinuria y elevación de la urea sanguínea<sup>6</sup>.

La pielonefritis es una manifestación de infección bacteriana de los riñones. El microorganismo responsable es *E. coli*<sup>5</sup>.

b) Estudios de laboratorio en la insuficiencia renal crónica.

Los principales son: Determinación plasmática de  $\text{CO}_2$ , sodio, potasio, cloruros, urea, creatinina y osmolaridad en sangre, además de biometría hemática.

Otro estudio de importancia es el exámen general de orina que normalmente se practica en una orina reciente, prefiriéndose la primera de la mañana y en orina de 24 horas se determina: sodio, potasio, cloruros y creatinina.

Ultimamente se ha visto que la determinación de angiotensina es muy importante ya que los efectos de esta proteína son varios: entre ellos podemos mencionar un efecto presor, el efecto estimulante de la secreción de aldosterona y un efecto directo sobre la hemodinámica renal y la excreción de sodio.

c) Método de radioinmunoensayo.

Uno de los descubrimientos que más han contribuido al desarrollo de la endocrinología en las últimas décadas, ha sido indudablemente el radioinmunoensayo, que ha permitido al fisiólogo conocer nuevos y diferentes mecanismos de regulación hormonal y al clí

nico efectuar valoraciones más objetivas de las diferentes endocrinopatías asociadas con hiper ó hiposecreción de ciertas hormonas. En un principio las hormonas protéicas, debido a sus características estructurales y a que circulan en concentraciones pequeñísimas (del orden de nanogramos y picogramos), resultaban muy difíciles de valorar mediante bioensayos específicos porque la mayoría exhibían poca especificidad y el número de muestras que se podían analizar era limitado. Fue hasta 1960 cuando Yalow y Berson publicaron por primera vez el método radioinmunológico para medir insulina en plasma humano.<sup>8</sup> Con algunas modificaciones al método original se han determinado más de veinte hormonas protéicas, ocho o diez hormonas no protéicas y aún sustancias no hormonales, tales como vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico.<sup>9</sup>

El principio general del radioinmunoensayo se puede resumir fácilmente en dos reacciones de tipo competitivo (Figura 1). La hormona marcada con el radioisótopo (Ag) se une al anticuerpo específico (Ac) para formar un complejo radioactivo antígeno-anticuerpo. El radioinmunoensayo, se basa en la capacidad que tiene la hormona (Ag) (no marcada con radioisótopos) presente en el plasma o en la solución tipo para competir con la hormona radioactiva por el anticuerpo es

pecífico y por lo tanto inhibir su unión con dicho anticuerpo. Como consecuencia de esta unión competitiva, la proporción entre hormona radioactiva unida al anticuerpo (B) y hormona radioactiva no unida al anticuerpo (F) va disminuyendo conforme aumenta la concentración de la hormona no radioactiva, presente en el líquido biológico que se analiza. La concentración de la hormona no radioactiva, por ejemplo en el plasma, se obtiene al comparar la inhibición que dicho plasma ocasionó entre la unión de la hormona radioactiva y el anticuerpo específico (B:F), con la inhibición obtenida por las soluciones tipo que contienen concentraciones conocidas de dicha hormona.<sup>10</sup>

Existen diferentes maneras de expresar los resultados de esta unión competitiva. Una de ellas fué propuesta por Yalow y Berson<sup>8</sup> y consiste en expresarlas como la proporción entre la hormona radioactiva unida al anticuerpo (B) y la no unida al anticuerpo o libre (F):  $B/F$  y los resultados expresados gráficamente en escala aritmética (figura 2). También se puede expresar como el porcentaje de la hormona unida al anticuerpo (por ciento B) usando escala aritmética o semilogarítmica (figura 3).

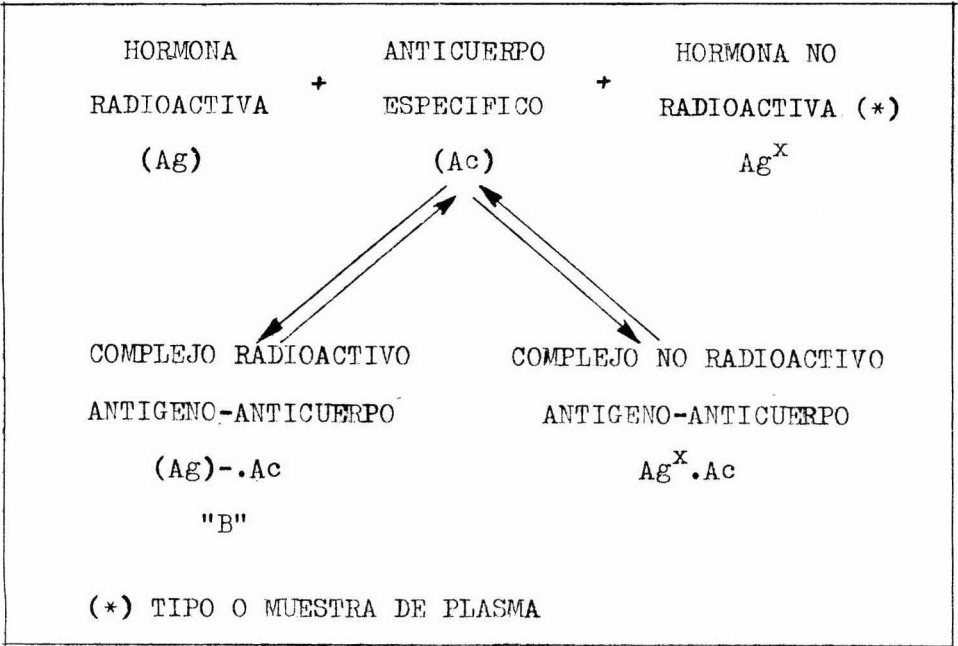


FIGURA I

Esquema que ilustra el principio básico del radioinmunoensayo.

Existen dentro del radioinmunoensayo términos - que son importantes conocer:

**Yodación:** La mayoría de las hormonas peptídicas tienen cuando menos un residuo tirosina, el cuál puede ser marcado con yodo radioactivo. La razón por la cual se usa yodo radioactivo en lugar de otros radioisótopos (carbón<sup>14</sup> ó tritium), es debido a que se obtiene una actividad específica elevada, necesaria - para los fines particulares del radioinmunoensayo. El

método más comunmente usado para la yodación de hormonas protéicas es el descrito por Greenwood y Hunter.<sup>11</sup> La yodación debe restringirse a un átomo de yodo por cada molécula de la hormona.

**Actividad específica:** Este término se refiere a la proporción de la hormona protéica que se a vuelto radioactivo como consecuencia de la yodación. Una gran actividad específica se correlaciona con una gran radioactividad. La actividad específica se puede expresar como cuentas por minuto/unidad de masa o bién como curies o microcuries/unidad de masa.

**Daño:** Indica la proporción de moléculas de la hormona protéica, que han sido alteradas durante el proceso de la yodación, y que se comportan como si ya estuvieran unidas al anticuerpo. Este daño puede ser ocasionado por la radioación interna del yodo radioactivo o por un exceso cuanti ó cualitativo del agente oxidante.

**Eficiencia:** Se refiere a la proporción en que el yodo radioactivo se ha unido a la hormona protéica. Por ejemplo: una eficiencia del 70%, significa que la mayor parte del yodo radioactivo se ha unido a la hormona al final de la reacción, por lo tanto la hormona así marcada tendrá una elevada actividad específica



y un gran número de cuentas por minuto.

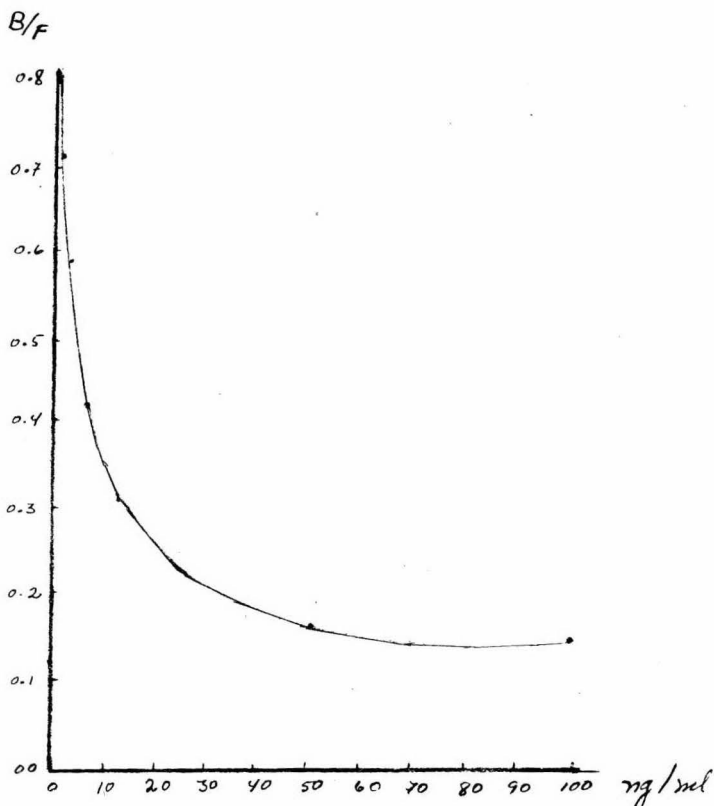


FIGURA II

Curva típica en papel aritmético. Cada punto representa el promedio de cada una de las concentraciones

Fracción unida (B): Hace referencia a la proporción de la hormona protéica radioactiva unida al anticuerpo, existiendo diferentes métodos para separar esta fracción:

a) Cromatoelectroforesis en papel, la fracción

"B" se localiza en el extremo opuesto al sitio de aplicación de la muestra.

b).- Doble anticuerpo, la fracción "B" se encuentra en el precipitado.

c).- Carbón-dextrán, la fracción "B" se localiza en el sobrenadante.

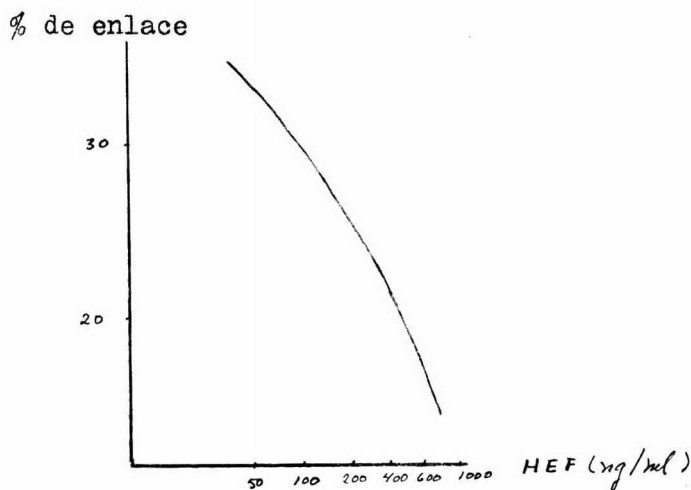


FIGURA III

Curva típica donde se expresa el porcentaje de unión de la hormona radioactiva al anticuerpo, en relación a las concentraciones de HEF\*, expresadas en escala semilogarítmica

\* Hormona estimulante del folículo

Fracción libre: (F): Es la proporción de la hormona protéica radioactiva, que no se ha unido al anticuerpo y que no está dañada. En la cromatoelectrofore-

sis en papel, la fracción "F" se localiza en el origen; en el sistema de separación con doble anticuerpo se encuentra en el sobrenadante; en el sistema de separación con carbón-dextrán, se localiza en el precipitado.<sup>12</sup>

Para el desarrollo apropiado del radioinmunoensayo es preciso que se cumplan ciertos requisitos:

1) Precisión. Es la habilidad para diferenciar concentraciones diferentes de la hormona. Una manera de conocer la precisión es por medio de la estimación del coeficiente de variación, el cual se obtiene al dividir la desviación estándar entre el promedio de la concentración. Un radioinmunoensayo no debe tener un rango de variación superior al 3%.

2) Sensibilidad. Está definida por la concentración más pequeña de hormona que puede ser diferenciada claramente de la concentración "cero" de hormona. Un modo sencillo de conocer la sensibilidad es presentar gráficamente los resultados obtenidos para la curva estándar usando una escala semilogarítmica y observar qué concentraciones abarca la porción recta de dicha curva. Sin embargo, es obvio que solo el análisis estadístico de los resultados puede demostrar cuál es el límite de sensibilidad tanto en concentraciones --

altas como bajas de la hormona.

3) Especificidad. Se refiere a la capacidad del sistema para determinar exclusivamente la hormona que se desea cuantificar, o bien aquellas estructuralmente semejantes a la estudiada; por lo mismo un radioinmunoensayo determinado no debe detectar otras hormonas protéicas diferentes.

4) Reproducibilidad. Es la capacidad que tiene una prueba para producir un mismo punto de la gráfica tipo. La única manera de conocerla, es tener resultados a lo largo de varios meses de trabajo y analizar los valores obtenidos para ese punto de la gráfica. - Es deseable que el máximo coeficiente de variación -- sea del 20% para concentraciones altas y bajas de la hormona y del 10% para concentraciones medias de la misma.

5) Variabilidad intraensayo. Se puede conocer fácilmente si se analizan varias veces (por ejemplo - duplicado) cada una de las diferentes muestras de - - plasma o suero humano, o bien diferentes concentraciones del patrón. Al analizar los resultados, se obtiene el promedio y la desviación estándar para conocer el grado de variabilidad intraensayo.

6) Variabilidad interensayo. Este parámetro se puede determinar al investigar diversas muestras de plasma o suero humano que contienen diferentes concentraciones de la hormona en estudio, las cuales se analizan en radioinmunoensayos realizados en diferentes días o meses. Una vez que se tiene un número suficiente de ensayos, se calcula el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos en cada una de las muestras analizadas y en esta forma se conoce el grado de variabilidad interensayo.

7) Finalmente se recomienda el uso de una carta de control de calidad con objeto de poder tener un conocimiento preciso del radioinmunoensayo que se empleó.<sup>13</sup>

Una vez cumplidos estos requisitos se puede decir que el radioinmunoensayo es un método muy útil no sólo para el diagnóstico de la deficiencia o exceso de una hormona determinada, sino también para estudiar diferentes aspectos de la fisiología humana.

CAPITULO IV

## SELECCION DE LOS PACIENTES

Se determinó actividad de renina plasmática por el método de radioinmunoensayo en 13 pacientes, con diagnóstico de insuficiencia renal crónica, secundaria a nefropatías parenquimatosas, con o sin hipertensión arterial secundaria.

El estudio se realizó con un número mayor de pacientes, pero debido a que algunos no soportaron ni las menores dietas de cloruro de sodio a las que estuvieron sometidos, solamente en 13 de ellos fué posible llevar a cabo el estudio completo.

A cada paciente se le determinó actividad de renina al final de 3 períodos de 6 días; en el primer período los pacientes recibieron una dieta hiposódica estricta (15 mEq/día) en su alimentación; en el segundo período se les mantuvo con dieta hiposódica estricta igual que en el primer período más 5.85 g. de NaCl (100mEq/día) administrados en forma de cápsulas, y en el tercer período se les mantuvo a dieta hiposódica (igual que antes), más 10 g. de NaCl (171 mEq/día) también como cápsulas.

En el quinto y sexto día de cada período, a los pacientes, se les determinó angiotensina I plasmática a las 8 a.m. en decúbito y a las 12 a.m. en posición de pié después de 4 horas de ambulación. Al quinto día se tomó muestra de sangre para medir urea, creatinina,  $\text{CO}_2$ , sodio y potasio. En la orina recolectada de 24 horas, el quinto y sexto día de cada período se midió excreción urinaria de sodio, potasio y depuración de creatinina. Además se midió la presión arterial a las 12 a.m. con esfigmomanómetro de mercurio.

En la tabla II se encuentran los datos del diagnóstico clínico, edad, promedio de creatinina y depuración de creatinina en los pacientes estudiados, de los que el 100% corresponden al sexo femenino.



TABLA II

No.	Edad (años)	Diag.	Cr. P. mg %	D.cr. ml/min.
1	47	P.N.C.	18.9	1.5
2	54	G.N.C.	14.6	3.0
3	19	G.N.C.	18.4	1.8
4	47	P.N.C.	23.5	0.6
5	19	G.N.C.	11.2	4.8
6	56	R.P.	22.5	1.6
7	59	N.T.	2.0	33.0
8	23	G.N.C.	20.4	3.0
9	43	G.N.C.	13.2	5.9
10	31	G.N.C.	25.8	1.1
11	56	P.N.C.	9.7	3.6
12	48	P.N.C.	9.0	2.2
13	37	G.N.C.	2.5	18.8

Cr.P. = creatinina plasmática

D.cr. = depuración de creatinina

R.P. = riñón poliquistico

N.T. = nefritis tóxica (Kanamicina)

P.N.C. = pielonefritis crónica

G.N.C. = glomerulonefritis crónica

C A P I T U L O   V

DESCRIPCION DEL METODO DE RADIOINMUNOENSAYO  
PARA MEDIR ANGIOTENSINA I PLASMATICA

A) Fundamento:

El método de radioinmunoensayo para determinar - actividad de renina está basado en la medida del grado de generación de angiotensina I, como se ve en siguiente patrón metabólico:

Angiotensinógeno -----renina----- Angiotensina I

Angiotensina I ---enzima convertina--- Angiotensina II

Angiotensina II ---angiotensinasas--- Polipéptidos inac-  
tivos

La elaboración de esta secuencia proporcionó las bases para considerar este trabajo y poder definir su significado clínico.<sup>14</sup> La angiotensina II estimula la secreción de aldosterona en la glándula suprarrenal y todo el sistema contribuye a la regulación del balance normal de sodio. Conn y colaboradores<sup>15</sup> sugieren - que la medición de la actividad de la renina en plas-

ma en pacientes hipertensos puede ayudar en el diagnóstico diferencial de hiperaldosteronismo primario y secundario.

La actividad elevada de la renina es inducida en personas normales por una dieta baja de sodio, terapia diurética o postura erecta, mientras que la baja actividad de la renina es inducida por una dieta alta de sodio, esteroides retenedores de sodio o la posición de decúbito.

#### B) Principios de la prueba:

El equipo de radioinmunoensayo de la actividad de la renina de La Clinical Assays Inc. significa un método simple y preciso para la determinación de la actividad de la renina por la medida del nivel de generación de angiotensina I en plasma. El equipo incluye todos los reactivos requeridos en el proceso.

El ensayo que es una modificación del método de Haber<sup>16</sup>, involucra una competencia obligatoria de angiotensina marcada con  $^{125}\text{I}$  con otra que no es marcada por el anticuerpo específico a la angiotensina I. La separación de angiotensina I marcada con  $^{125}\text{I}$  unida al anticuerpo y la angiotensina I marcada con  $^{125}\text{I}$  libre es obtenida por precipitación de la fracción del enla-

ce con un segundo anticuerpo. El uso de la técnica de la separación de un doble anticuerpo adquiere un significado especial al separar la porción libre de la porción agregada, el doble anticuerpo precipita solamente material no dañado que ha sido enlazado por el anticuerpo de la angiotensina I<sup>17</sup>.

Después de la centrifugación el enlace de radioactividad contenido en el precipitado es medido en un contador de rayos gamma y solamente el precipitado se cuenta. La especificidad del método de separación elimina la necesidad de contar tanto la porción libre como la porción enlazada.

El ensayo tiene una sensibilidad de 30 pg aunque los niveles bajos cercanos a 10 ng pueden ser cuantificados.

### C) REACTIVOS:

#### A.- Tris tampón

- Disolver: 1.0 g de trizma en 50 ml de agua. Ajustar a pH 7.4 con NaOH 0.1 N ó con ácido acético glacial, usando un medidor de pH.
- Adicionar: Agua a un volumen de 100 ml en matríz volumétrico.
- Guardar: En refrigerador.

Estabilidad: 2 meses

B.- Solución patrón de 100 ng/ml

Adicionar: 1.0 ml de tris tampón a el tubo -- que contiene angiotensina I patrón quedando una solución de 100 ng/ml Mezclar suavemente.

Guardar: Reconstituir un frasco de solución patrón cada vez que se use y conservar en refrigerador.

C.- Antisuero de angiotensina I

Adicionar: 1.0 ml de agua a el frasco que con tiene antisuero de angiotensina I. Mezclar suavemente evitando la for mación de espuma.

Guardar: En refrigerador

Estabilidad: Mínima de un mes después de reconstituido.

D.- Angiotensina I marcada con  $^{125}\text{I}$

Adicionar: 10 ml de tris tampón a el frasco - que contiene angiotensina I marcada. Mezclar suavemente y evitar la formación de espuma.

Guardar: En refrigerador

Estabilidad: Dos meses.

E.- Suero humano tratado

Adicionar: 5 ml de agua al frasco que contie-

ne suero humano tratado. Mezclar suavemente y evitar formación de espuma.

Guardar: En congelador.

Estabilidad: Mínimo tres meses.

F.- Suero normal de conejo

Adicionar: 10 ml de tris tampón al tubo que contiene suero normal de conejo. - Mezclar suavemente.

Guardar: En congelador

Estabilidad: Mínimo tres meses

G.- Suero de cabra anti-conejo

Contenido: 10 ml de suero de cabra anti-conejo con preservativo.

Guardar: En congelador

Estabilidad: Mínimo tres meses

H.- Solución de sulfato de 8-hidroxi-quinoleína

Contenido: Solución de 660 mg de 8-hidroxi-quinoleína en 10 ml de agua.

Guardar: En refrigerador y en frasco oscuro.

I.- Solución de dimercaprol

Contenido: 10% de 2, 3-dimercaptopropanol en aceite y conteniendo 20% de benzoato de bencilo.

Estabilidad: Por tiempo indefinido

J.- Solución de hidróxido de soio 0.1 N

K.- Acido acético glacial Q.P.

L.- Agua deionizada

#### D) MATERIAL

Tubos de vidrio de 12 x 75

Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 5, 10 ml.

Pipeta graduada de 1 ml.

Micropipeta de 5, 10, 50, 100 lamdas

Matráz volumétrico de 100 ml.

#### E) APARATOS

Potenciómetro

Agitador vortex

Centrífuga refrigerada

Baño de agua

Contador de rayos gamma

#### F) OBTENCION DE LAS MUESTRAS

La sangre del paciente debe ser recolectada en -  
tubos de vidrio conteniendo EDTA como anticoagulan-  
te a una concentración de 1 mg/ml de sangre y colo-  
cados en hielo.



La muestra debe ser centrifugada inmediatamente a  $4^{\circ}$  C y el plasma transferido a un tubo de plástico y guardado en congelador.

#### G) PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1).- A 2 ml. de plasma del paciente que se ha mantenido en congelación, agregar 10 lamdas de solución de sulfato de 8 hidroxiquinoleína y 5 lamdas de solución de dimercaprol. Mezclar bien.

2).- Dividir los 2 ml. de plasma en dos porciones la primera es rotulada cuatro y guardada entre  $0$  y  $4^{\circ}$  C en un baño de hielo, exactamente durante 3 horas. - La segunda porción es rotulada 37 y es incubada a  $37^{\circ}$  C en un baño de agua durante 3 horas exactamente.

3).- Al término de las 3 horas, se juntan todos los tubos para colocarlos en un baño de hielo y así seguir trabajando la técnica.

#### H) PREPARACION DE LAS SOLUCIONES TIPO

Se parte de un frasco rotulado A, el cuál contiene una solución patrón de angiotensina de 100 ng/ml.

Dentro de los tubos rotulados del B al G se pipetea 1 ml. de tris amortiguador y se continúa como si--

gue:

Dentro del tubo B pipetear 0.5 ml. de la solución patrón del frasco A y mezclar con vortex.

Transferir 0.5 ml. del tubo B al tubo C.\*

Transferir 0.5 ml. del tubo C al tubo D.\*

Transferir 0.5 ml. del tubo D al tubo E.\*

Transferir 0.5 ml. del tubo E al tubo F.\*

Transferir 0.5 ml. del tubo F al tubo G.\*

\* Mezclar perfectamente bien con vortex.

Tenemos entonces 7 diluciones del tipo de angiotensina I como sigue:

TABLA I

Tubo	Angiotensina I concentración ng/ml	Angiotensina I contenido en 0.1 ml.
A	100	10 ng
B	33.3	3.33 ng
C	11.1	1.11 ng
D	3.70	370 pg
E	1.23	123 pg
F	0.410	41.0 pg
G	0.137	13.7 pg

## I) PREPARACION DE LA GRAFICA DE CALIBRACION

Para la gráfica se preparan 20 tubos numerados - del 1 al 18 y  $T_1$  y  $T_2$  . Los tubos 1 y 2 son controles no contienen antisuero ni tipo, también pueden llamarse blanco ("B", como lo referiremos posteriormente en los cálculos).

Los números 3 y 4 son controles del máximo de en lace y no contienen tipo. (para los cálculos se registran con las letras "CME").

Los tubos numerados 5 al 18, debidamente apareados, servirán para colocar en cada par los tipos marca dos "A" a "G", (y se controlan para fines de cálculos con las concentraciones especificadas en la tabla I).

Los tubos rotulados  $T_1$  y  $T_2$ , corresponden al sobrenadante de los tubos 1 y 2, como adelante se indica (sus literales para los cálculos son CT).

Guardar todos los tubos en un baño de hielo durante la adición de los reactivos, como ya se dijo anteriormente.

La adición de los reactivos es como sigue:

- 1).- Pipetear solución tris tampón a los tubos en la forma siguiente: 0.9 ml a los tubos 1 á 4; y 0.8

ml a los tubos 5 á 18.

- 2).- Adicionar suero humano tratado, reactivo "E", a los tubos 1 al 18, 0.05 ml; mezclar con vortex.
- 3).- Agregar las soluciones tipo preparadas como se indicó anteriormente (tabla I), 0.1 ml de cada una, a los tubos 5 y 6 al par 17 - 18.
- 4).- Agregar 50 microlitros de angiotensina I marcada con <sup>125</sup>I. Mezclar con vortex.
- 5).- Tapar los tubos 1 y 2 para evitar la adición del antisuero durante el siguiente paso.
- 6).- Agregar 10 microlitros de antisuero de conejo a todos los tubos excepto al 1 y 2 (como se indico en el inciso 5).
- 7).- Pipetear a todos los tubos 50 microlitros de suero de cabra anti-conejo.
- 8).- Agregar 100 microlitros de suero normal de conejo a todos los tubos.
- 9).- Mezclar todos los tubos completamente e incubar de 18 á 22 horas a 4°C.

Los tubos contienen ahora los reactivos como se observa en la tabla III.

- 10).- Después de la incubación se centrifugan todos -- los tubos durante 30 minutos a 1600 G., en cen-- trífuga refrigerada.
- 11).- Decantar los sobrenadantes de los tubos 1 y 2 -- dentro de los tubos marcados  $T_1$  y  $T_2$ .
- 12).- En los siguientes tubos se desecha el sobrenadante y los tubos se invierten dejándolos un tiempo en el refrigerador con el objeto de que escurra todo el sobrenadante, posteriormente secar el exceso con papel filtro.
- 13).- Contar cada tubo en un contador de rayos gamma - durante 1 minuto.

#### CALCULOS:

- $CPM_B$  Blanco: El promedio de cuentas de los tubos 1 y 2.
- $CPM_{CT}$  Cuentas totales: El promedio de las cuentas de los tubos  $T_1$  y  $T_2$ . Normalmente deben estar en el rango de 2,000 á 5,000 -- c.p.m.
- $CPM_{CME}$  Control máximo de enlace: El promedio de cuentas de los tubos 3 y 4

CPM<sub>A-G</sub> Cuentas obtenidas por tubo: El promedio de las cuentas en cada par de tubos de la solución tipo que se indica en la ta bla I.

Gráfica de calibración.

El porcentaje de enlace (% E<sub>A-G</sub>) para cada concentración de tipo es calculado de la siguiente manera:

$$\% E_{A-G} = \frac{CPM_{A-G} - CPM_B}{CPM_{CME} - CPM_B} \times 100$$

Los datos de porciento de enlace de cada tipo se registran contra la concentración de angiotensina I de cada tubo, en papel semilogarítmico de 3 ciclos, uniendo los puntos con una línea curva característica como se observa en los ejemplos que se dan en el capítulo siguiente.

Capacidad de enlace del contenido de cada equipo de -- reactivos:

Los reactivos han sido preparados para poder tra bajar con cada equipo durante un tiempo determinado, - cuando el porcentaje de enlace empieza a decaer nos inin

dica que los reactivos están deteriorándose, y no es conveniente usarlos, este se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje total de enlace} = \frac{\text{CPM}_{\text{CME}} - \text{CPM}_{\text{B}}}{\text{CPM}_{\text{CT}} - \text{CPM}_{\text{B}}} \times 100$$

En general el porcentaje total de enlace debe ser entre 50 - 60%.

#### J) DESARROLLO DE LA TECNICA CON LAS MUESTRAS PROBLEMA

Cuando se corre un ensayo clínico se trabajan -- las muestras de los pacientes (por duplicado) paralela<sup>mente</sup> a la gráfica, se trabajan alrededor de 8 á 12 -- muestras por cada curva de calibración que se corre, - obteniéndose un total de 3 curvas por cada equipo de - de reactivos.

En G) se ha descrito la parte correspondiente a preparación de la muestra, como se observa por cada - muestra se necesitan cuatro tubos, dos para la muestra que fué incubada a 37°C y dos para la de 4°C.

Una vez que las muestras fueron incubadas durante tres horas a 37°C y a 4°C la técnica a seguir es:

- 1).- Pipetear en los cuatro tubos para cada muestra - 0.9 ml de tris tampón.
- 2).- Agregar 50 microlitros de suero o plasma que fué incubado a 4°C a los dos primeros tubos y el mismo volumen pero del suero que fué incubado a 37°C al segundo par de tubos. Mezclar con vortex.
- 3).- A cada tubo continuar con el desarrollo de la técnica en la misma forma descrita para la gráfica, a partir del paso 3 hasta el paso 13, en que se hace la cuenta de rayos gamma.

#### CALCULOS:

El porcentaje de enlace de cada muestra es calculado similarmente usando la misma ecuación ( $\% E_4$  ;  $\% E_{37}$ )

El porcentaje de enlace obtenido es convertido a valores de angiotensina I interpolando en la gráfica trazada como quedó señalado. Se obtienen los valores de las muestras a 4°C y a 37°C.

La diferencia entre los valores de angiotensina I ( en ng), obtenida de los valores calculados para los tubos a 37°C menos el de los tubos a 4°C es la -- concentración de angiotensina I formada por las mues-



tras en 3 horas.

Es necesario conocer la cantidad de angiotensina I por ml. de muestra, y se usa la fórmula siguiente:

$$\text{ng A/ml} = (A_{37^{\circ}} - A_{4^{\circ}}) \times \frac{1.0 \text{ (ml. de muestra)}}{0.05 \text{ (vol. de la muestra)}}$$

Además es necesario conocer la actividad de la muestra en una hora, ya que nuestro proceso se lleva a cabo en 3 horas, el valor anterior se divide entre 3:

$$\text{ng A/ml/hr} = \frac{\text{ng A/ml}}{3} = \text{ng} (A_{37^{\circ}} - A_{4^{\circ}}) \times \frac{1.0}{0.05} / 3$$

$$\text{o sea: ng A/ml/hr} = (A_{37^{\circ}} - A_{4^{\circ}}) \times \frac{20}{3}$$

Donde:

$A_{37}$  = Es la cantidad de angiotensina I presente en la alicuota de 50 lamdas de plasma incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ .

$A_4$  = La cantidad de angiotensina I presente en la muestra a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente, debe calcularse la actividad de la renina, que es la directamente responsable del cambio de angiotensinógeno en angiotensina I. Para ello es -- que se dan las dietas hiposódicas y se toman las muestras en posición decúbito y de pié.

#### RANGO NORMAL DE ACTIVIDAD DE RENINA

Para 110 mEq de sodio, en decúbito:  $1.0 \pm 0.2$  ng/ml/hr

de pié:  $1.8 \pm 0.4$  ng/ml/hr

Para 10 mEq de sodio, en decúbito:  $2.2 \pm 0.5$  ng/ml/hr

de pié:  $5.9 \pm 0.4$  ng/ml/hr

C A P I T U L O   V I

## RESULTADOS

En las tablas IV, V y VI, se encuentran resumidos los datos obtenidos con los pacientes sometidos a cada una de las dietas, sin embargo, estos valores -- han sido procesados matemáticamente para conocer la -- concentración de angiotensina I plasmática.

A continuación se exponen las secuencias en que fueron utilizadas las fórmulas anotadas en el capítulo V, para los cálculos correspondientes, así como -- cada una de las operaciones que se realizan al seguir la técnica cuantitativa, con los datos que aparecen -- en la tabla III, en la que se encuentran los números de los tubos para la gráfica de calibración,  $T_1$  y  $T_2$  y con los números 21 - 22 la muestra de un paciente -- tomada a las 8 hrs. en decúbito, incubada a  $4^{\circ}\text{C}$ ; los tubos 23 y 24, la misma muestra pero incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para el par marcado 25 - 26, la muestra del mismo paciente, tomada a las 12 horas de pie, incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  y el par 27 - 28, la misma muestra incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Estos cuatro pares de tubos representan al cál-

culo para la actividad de renina de un solo paciente -  
y al aplicar las fórmulas obtenemos:

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje total de enlace} &= \frac{\text{CPM}_{\text{CME}} - \text{CPM}_{\text{B}}}{\text{CPM}_{\text{CT}} - \text{CPM}_{\text{B}}} \times 100 \\ &= \frac{863.5 - 22.5}{1599 - 22.5} \times 100 \\ &= 53.3460 \end{aligned}$$

$$\text{Porcentaje de enlace para AI}_s = \frac{\text{CPM}_{\text{A-G}} - \text{CPM}_{\text{B}}}{\text{CPM}_{\text{CME}} - \text{CPM}_{\text{B}}} \times 100$$

$$10 \text{ ng: } \frac{44 - 22}{863 - 22} \times 100 = 2.6 \%$$

$$3.33 \text{ ng: } \frac{75 - 22}{863 - 22} \times 100 = 6.3 \%$$

$$1.11 \text{ ng: } \frac{146 - 22}{863 - 22} \times 100 = 14.7 \%$$

$$370 \text{ pg: } \frac{328 - 22}{863 - 22} \times 100 = 36.3 \%$$

$$123 \text{ pg: } \frac{722 - 22}{863 - 22} \times 100 = 83.2 \%$$

$$41 \text{ pg: } \frac{805 - 22}{863 - 22} \times 100 = 93.1 \%$$

$$13.7 \text{ pg: } \frac{844 - 22}{863 - 22} \times 100 = 97.7 \%$$

Los datos así obtenidos sirven para trazar la gráfica de calibración (gráfica No. 1).

Ahora se calcula para las muestras, usando la misma fórmula y el promedio de las CPM de cada par, y con este resultado se calcula el porcentaje de enlace y este se traslada a la gráfica para conocer la concentración de angiotensina I plasmática, en la siguiente forma:

$$\text{Tubos 21/22} = \frac{862 - 22}{863 - 22} \times 100 = 99\% \quad R = 10 \text{ pg}$$

$$\text{Tubos 23/24} = \frac{382 - 22}{863 - 22} \times 100 = 42\% \quad R = 355 \text{ pg}$$

y así sucesivamente, hasta obtener todos los valores

representados en el cuadro de la tabla III

El siguiente paso es calcular la concentración en ng/ml/hr., tanto para los valores de las muestras a 4°C como para las de 37°C, aplicando la fórmula correspondiente.

$$(\text{ng } A_{37^{\circ}} - \text{ng } A_{4^{\circ}}) \times 20/3 = \text{conc. de A.I. en ng/ml/hr.}$$

$$(355 - 10) \times \frac{20}{3} = 2,300 \text{ pg} = 2.3 \text{ ng}$$

$$(230 - 10) \times \frac{20}{3} = 1,460 \text{ pg} = 1.46 \text{ ng}$$

$$(370 - 10) \times \frac{20}{3} = 2,393 \text{ pg} = 2.393 \text{ ng}$$

$$(210 - 10) \times \frac{20}{3} = 1,306 \text{ pg} = 1.306 \text{ ng}$$

$$(88 - 10) \times \frac{20}{3} = 520 \text{ pg} = 0.52 \text{ ng}$$

$$(210 - 10) \times \frac{20}{3} = 1,313 \text{ pg} = 1.313 \text{ ng}$$

Estas cifras representan nanogramos de Angiotensina I por mililitro de muestra en una hora de incubación.

Las cifras primera, tercera, y quinta representan la actividad de las muestras tomadas a las 8 horas en decúbito, las cifras segunda, cuarta y sexta las muestras tomadas a las 12 horas de pié.

Las cifras primera y segunda el final del primer período; las cifras tercera y cuarta el final del segundo período; las cifras quinta y sexta el final del tercer período.

Con los resultados de los pacientes estudiados, se llevó a cabo este mismo sistema de cálculos que se encuentran resumidos en las tablas IV, V, VI, correspondiendo cada tabla a un período respectivamente, -- siendo estos de: primer período, dieta de 15 mEq de sodio al día, segundo período dieta hiposódica estricta más 5.85 g. de NaCl y el tercer período, dieta hiposódica estricta más 10 g. de NaCl. Así mismo se encuentran en estas tablas los resultados de excreción urinaria de sodio y de potasio y la presión arterial.



TABLA III

TUBOS	TRIS. REG.	PATRON INHB.	SUERO TRATADO	125 <sub>T</sub> TRAZADOR	ANTI-SUERO CON.	SUERO NOR. CON.	S. CABRA Vs. CON.	CPM	$\bar{X}$ CPM	(S)	% ENLACE	(PROB)
1/2	0.9		0.05	0.05		0.1	0.05	25/20	22.5	B		
3/4	0.9		0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	827/900	863.5	CME		
5/6	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	32/56	44	10 ng.	2.6	10 ng.
7/8	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	78/72	75	3.33 ng.	6.3	3.33 ng.
9/10	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	152/141	146.5	1.11 ng.	14.7	1.11 ng.
11/12	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	340/316	328	370 pg.	36.7	370 pg.
13/14	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	721/723	722	123 pg.	83.2	123 pg.
15/16	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	792/819	805.5	41 pg.	93.1	41 pg.
17/18	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.1	0.05	893/796	844.5	13.7 pg.	97.7	13.7 pg.
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>								1591/1607	1599	CT	53.3	
21/22	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	820/905	862		99	10 pg.
23/24	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	402/363	382		42	355 pg.
25/26	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	865/857	861		99	10 pg.
27/28	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	506/500	503		57	230 pg.
29/30	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	847/877	862		99	10 pg.
31/32	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	387/335	361		40	370 pg.
33/34	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	863/836	849		98	14 pg.
35/36	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	921/906	913		105	10 pg.
37/38	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	742/752	747		86	88 pg.
39/40	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	835/851	843		97	13 pg.
41/42	0.9	0.05		0.05	0.01	0.1	0.05	542/534	538		61	210 pg.

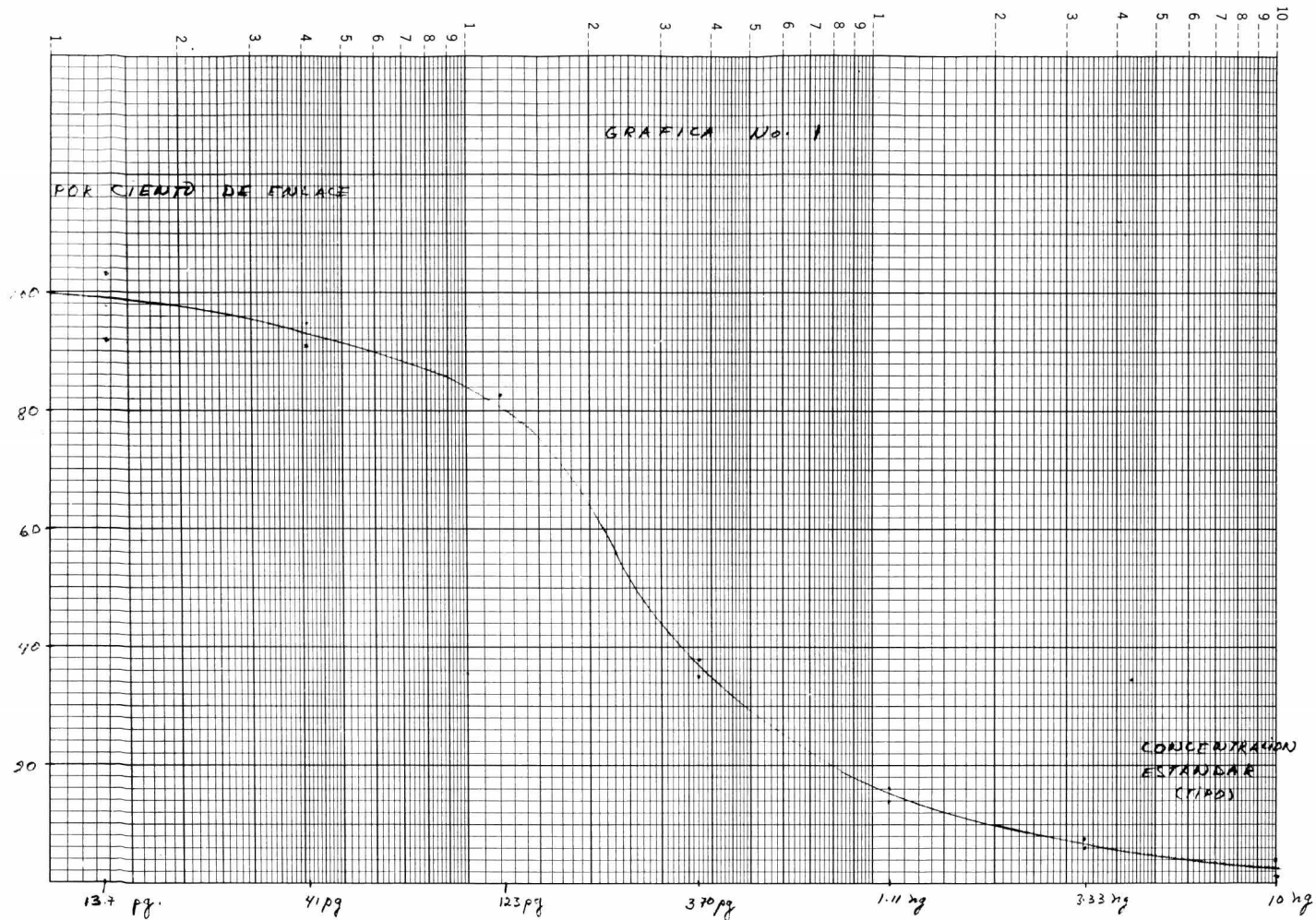


TABLA IV

Dieta de 15 mEq. de sodio al día

Paciente No.	Ang I (ng/ml/hr)		U <sub>Na</sub> V mEq/día	U <sub>K</sub> V mEq/día	P.A.(12 a.m.) mm. Hg
	8 a.m.	12 a.m.			
1	2.15	7.02	40.2	9.4	107/67
2	0.64	1.53	37.3	20.4	140/85
3	0.86	1.38	16.3	14.4	153/107
4	1.41	3.32	11.8	8.7	200/107
5	0.48	1.43	41.8	30.0	120/90
6	2.30	2.80	77.0	23.0	130/87
7	0.98	4.79	7.4	38.3	150/97
8	3.84	3.34	49.0	29.0	137/90
9	0.73	1.72	16.0	30.7	140/105
10	1.07	2.26	24.2	17.6	170/107
11	2.35	1.39	5.4	22.4	127/80
12	0.93	1.28	30.5	19.8	113/73
13	0.60	1.12	16.3	25.3	105/70

Ang I = angiotensina I

U<sub>Na</sub>V = excreción urinaria de sodioU<sub>K</sub>V = excreción urinaria de potasio

P.A. = presión arterial

TABLA V

Dieta de 15 mEq/día más 5.85 gr. de NaCl (100 mEq/día)

Paciente No.	Ang I (ng/ml/hr)		U <sub>Na</sub> V mEq/día	U <sub>K</sub> V mEq/día	P.A. (12 a.m.) mm. Hg
	8 a.m.	12 a.m.			
1	1.21	1.77	51.2	9.7	111/71
2	0.64	0.51	40.2	22.0	132/83
3	0.0	0.60	15.1	10.5	155/95
4	1.18	6.30	20.0	8.3	210/110
5	0.29	0.63	50.0	38.0	130/90
6	3.26	4.56	53.0	15.0	157/90
7	0.12	0.80	48.8	24.2	115/80
8	3.25	3.94	41.7	19.8	120/80
9	0.32	0.30	29.8	23.9	155/105
10	2.63	1.70	26.9	15.5	173/107
11	0.86	0.73	21.7	17.9	130/85
12	1.13	2.13	21.3	13.7	93/63
13	0.39	0.00	64.7	25.4	127/95

Ang I = angiotensina I

U<sub>Na</sub>V = excreción urinaria de sodioU<sub>K</sub>V = excreción urinaria de potasio

P.A. = presión arterial

TABLA VI

Dieta hiposódica estricta más 10 gr. de NaCl (171 mEq/día)

Paciente No.	Ang I (ng/ml/hr)		U <sub>Na</sub> <sup>V</sup> mEq/día	U <sub>K</sub> <sup>V</sup> mEq/día	P.A. (12 a.m.) mm. Hg
	8 a.m.	12 a.m.			
1	1.46	1.93	81.4	11.0	120/70
2	0.05	0.0	100.6	27.5	135/95
* 3	-	-	-	-	-
4	0.0	2.46	33.4	7.7	215/112
5	0.38	0.57	156.0	40.0	140/100
* 6	-	-	-	-	-
7	0.40	0.05	114.3	38.5	150/87
8	2.77	3.61	79.2	20.0	120/90
9	0.0	0.0	100.6	21.2	177/127
* 10	-	-	-	-	-
11	0.15	0.13	90.6	19.8	145/85
12	0.0	0.0	61.2	14.4	97/63
13	0.0	0.0	159.0	26.4	127/90

\* Estos pacientes no soportaron esta dieta

Ang I = angiotensina I

U<sub>Na</sub><sup>V</sup> = excreción urinaria de sodioU<sub>K</sub><sup>V</sup> = excreción urinaria de potasio

P.A. = presión arterial

C A P I T U L O   V I I

## ANALISIS BIOESTADISTICO

Valores de angiotensina I plasmática obtenidos en  
cada período.

$A_1$	$B_1$	$A_2$	$B_2$	$A_3$	$B_3$
2.15	7.02	1.21	1.77	1.46	1.93
0.64	1.53	0.64	0.51	0.05	0.0
0.86	1.38	0.0	0.60	-	-
1.41	3.32	1.18	6.30	0.0	2.46
0.48	1.43	0.29	0.63	0.38	0.57
2.30	2.80	3.26	4.56	-	-
0.98	4.79	0.12	0.80	0.40	0.05
3.84	3.34	3.25	3.94	2.77	3.61
0.73	1.72	0.32	0.30	0.0	0.0
1.07	2.26	2.63	1.70	-	-
2.35	1.39	0.86	0.73	0.15	0.13
0.93	1.28	1.13	2.13	0.0	0.0
0.60	1.12	0.39	0.0	0.0	0.0
N = 13	13	13	13	13	13
$\bar{X} = 1.41$	2.568	1.175	1.844	0.521	0.875

S = 0.98	1.725	1.147	1.929	0.908	1.312
$S_{\bar{X}} = 0.272$	0.478	0.318	0.318	0.287	0.415

A/B	t 2.102	1.075	0.702
	p p < 0.05	N.S.	N.S.

	1/2	1/3	2/3
A	t = 0.564 N.S.	t = 2.226 p < 0.05	t = 1.479 N.S.
B	t = 1.009 N.S.	t = 2.578 p < 0.05	t = 1.361 N.S.

En cada uno de los tres períodos se determinó la media y la desviación estándar para excreción urinaria de -- sodio y potasio así como para la presión arterial, obteniéndose los siguientes resultados:

Primer período = Dieta 15 mEq/día

	$U_{NaV}$	$U_{KV}$	P.A.
Media =	28.71	22.23	137.8/89.6
Desviación St=	20.2	8.59	26.5/14.4



Segundo período = Dieta 15 mEq/día más 5.85 gr. de NaCl  
(100 mEq/día)

	$U_{Na}^V$	$U_K^V$	P.A.
Media =	37.3	18.76	139.1/88.8
Desviación St=	15.7	8.13	30.6/13.9

Tercer período = Dieta 15 mEq/día más 10 gr. de NaCl  
(171 mEq/día)

	$U_{Na}^V$	$U_K^V$	P.A.
Media =	97.63	22.65	142.6/99.1
Desviación St=	38.8	10.7	33.2/18.6

	$U_{Na}^V$	
1/2	T = 1.210	(N.S.)
1/3	T = 5.524	(p 0.001)
2/3	T = 5.111	(p 0.001)

Los cambios de excreción urinaria de K y los cambios de P.A., estadísticamente no fueron significativos.

C A P I T U L O   V I I I

## RESUMEN

- 1).- Se describe el principio básico del radioinmunoensayo.
- 2).- Se definen algunos vocablos técnicos utilizados con regularidad.
- 3).- Se analizan las características y ventajas que tiene el radioinmunoensayo para la medición de la actividad de renina basada en la cuantificación de la angiotensina I.
- 4).- Se clasifican en forma adecuada a los pacientes para la investigación planeada.
- 5).- Se analizan a cada uno de ellos siguiendo la técnica descrita, así como cuantificando su excreción de sodio y potasio, y la medición de la presión arterial.
- 6).- Se establecen las condiciones necesarias para -- que el método se realice en forma satisfactoria, revisando previamente todos los equipos y mate--

rial empleado.

- 7).- Se agrupan los resultados obtenidos para efectuar los cálculos necesarios para la cuantificación de la Angiotensina I y actividad de renina.
- 8).- Se analizan los resultados estadísticamente obteniendo los valores de promedio, desviación típica, varianza y error, los que sirven de base para el cálculo de probabilidades en la Prueba de Student.

C A P I T U L O    I X

## CONCLUSIONES

- 1).- El método de radioinmunoensayo a pesar de que emplea marcadores radioactivos, en sí es sencillo y pueden efectuarse determinaciones en un tiempo mínimo relativamente.
- 2).- Tiene la ventaja de ser reproducible por lo que - sus posibilidades de error son mínimas, aunque pa - ra ello es importante el hacer un lavado adecuado del material utilizado, de las manipulaciones que se realizan durante el ensayo y el control de la temperatura que debe llevarse a cabo sobre todo - en la incubación a 37° C.
- 3).- Tiene la ventaja de efectuar cuentas por minuto - en blanco, en capacidad máxima de enlace y en - - cuenta total que permiten reconocer el momento en que el juego de reactivos sea desechado, además - de cuantificar concentraciones mínimas en el ran - go de nanogramos y picogramos, característica que puede atribuirse a su especificidad.
- 4).- De los puntos anteriores se puede inferir que el

método reúne las características que lo califican como muy buena clínica ya que es preciso, sensible y específico.

- 5).- Analizando a los pacientes en el período en que se les administraba una dieta hiponatémica estricta (15 mEq/día) se observa que a pesar de padecer insuficiencia renal crónica su comportamiento es similar al de los sujetos normales.
- 6).- Los valores encontrados en el período con dieta de 100 mEq/día fueron menores a los valores obtenidos en el primer período en angiotensina.

CAPITULO X



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Page, I, H., y Brumpus, F.M.: Angiotensin, *Physiol. Rev.* 41:331, 1961
- 2.- Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Lentz, K., y Shumway, N. P., The Preparation, Purification, and amino Acid Sequence of a Polypeptide Renin Substrate *J. Exp. Med.*; 106:439, 1957
- 3.- Dr. Robert F. Pitts, *Fisiología del riñón y líquidos corporales*, 2a. ed., 1969
- 4.- J.W. Fisher, *Hormons Kidney*, Academic press London New York ; 97, 1971
- 5.- Farrera Rozman, *Medicina Interna*, 8a., ed., 1972
- 6.- Roger Gabriel, *Nephrology Postgraduate* Butterworth 1974
- 7.- Dr. Manuel Torres Zamora, *El sistema renina-angiotensina- en el balance de sodio y la regulación de la presión arterial*, *Revista Médica del I.M.S.S.*
- 8.- Yalow, R.S. y Berson, S.A.: *Inmunoassay of endoge-*

- nous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39: 1157, 1960
- 9.- Berson, S.A. y Yalow, R.S.: General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 22:51, 1968
- 10.- Parra, A.: Radioinmunoensayos. Gac. Méd. Méx. 101: 623, 1971
- 11.- Greenwood, F.C. y Hunter, W.M.: The preparation of  $I^{131}$ -labeled human growth hormone of high radioactivity. Biochem. J. 89:114, 1963
- 12.- Parra, A.: Hormona de crecimiento, I. Radioinmunoensayo. Gac. Méd. Méx. 101:591, 1971
- 13.- Rodbard, D.: Rayford, P.L.; Cooper, J.a., y Ross, G.t.: Statistical Quality control of radioimmunoassay. J. Clin. Endocr., 28:1412, 1968
- 14.- Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Kahn, J.R. y Shumway - N.P.: The Synthesis of a Tetradecapeptide Renin - Substrate. J. Exp. Méd. 108:283, 1958
- 15.- Conn, J.W., Cohen, E.L. y Rovner, D.R.: Absence of plasma Renin Activity in Primary Aldosteronism. Importance in Distinguishing Primary from Secondary Aldosteronism in Hipertensive Disease. J.A.M. A. 190:213, 1964

- 16.- Haber, E., Koerner, T., Page, L.B., Kliman, B., -  
y Purnode, A.: Application of a Radioimmunoassay  
for Angiotensina I to the Physiologic Measurement  
of Plasma Renin Activity in Normal Human Subjects.  
J. Clin. Endocr., 29:1349, 1969
- 17.- Emanuel, R.I., Cain, J.P., y Williams, G.H. : Douu  
ble Antibody Radioimmunoassay of Renin Activity -  
and Angiotensin II in Human Peripheral Plasma J.-  
Lab. Clin. Méd. 84:632. 1973