

2ej.  
139



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**PRODUCCION DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACION  
DE ANGIOTENSINA I HUMANA POR  
RADIOINMUNOANALISIS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**Químico      Farmacéutico      Biólogo**  
P R E S E N T A:  
**ARMIDA ZUÑIGA ESTRADA**

MEXICO, D. F. 1986



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

PRESIDENTE

PROFRA. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA

VOCAL

DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

SECRETARIO

PROFR. SATURNINO DE LEON CHAPA

1er. SUPLENTE

PROFRA. PATRICIA CALDERON GOMEZ

2do. SUPLENTE

PROFRA. MAGDALENA CARRILLO SANTIN

DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

"SALVADOR ZUBIRAN"

EL ASESOR DE LA TESIS

EL SUSTENTANTE

  
DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

  
ARMIDA ZUNIGA ESTRADA

## INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO. . . . .	1
I.- INTRODUCCION . . . . .	1
1. El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona . . . . .	1
1.1. Generalidades . . . . .	1
1.2. Bioquímica . . . . .	1
1.3. Componentes . . . . .	3
1.3.1. Renina . . . . .	3
1.3.2. Angiotensinógeno . . . . .	7
1.3.3. Angiotensina I . . . . .	7
1.3.4. Angiotensina II . . . . .	10
1.3.5. Enzima Convertidora de Angiotensina I . . . . .	11
1.3.6. Aldosterona . . . . .	11
1.4. El Sistema y la Hipertensión . . . . .	13
2. Radioinmunoanálisis . . . . .	15
2.1. Antecedentes . . . . .	15
2.2. Fundamento . . . . .	16
2.3. Técnica . . . . .	18
2.4. Cálculo de Resultados . . . . .	20
2.5. Isótopos Radiactivos usados para marcar . . . . .	21
2.6. Métodos de Medición . . . . .	23
2.7. Control de Calidad . . . . .	26
2.8. Estandarización . . . . .	27
3. Producción de anticuerpos . . . . .	27
3.1. Preparación del Inmúnógeno . . . . .	28
3.2. Vía de Inoculación . . . . .	29
3.3. Selección de las especies animales . . . . .	29
3.4. Dosis . . . . .	30
3.5. Pureza de la preparación . . . . .	31
3.6. Parámetros del suero de importancia en RIA . . . . .	31
II. OBJETIVOS. . . . .	34
III. MATERIALES Y METODOS . . . . .	35

	PAGINA
1.- Materiales . . . . .	35
1.1. Material de vidriería . . . . .	35
1.2. Material biológico . . . . .	35
1.3. Equipo . . . . .	35
1.4. Reactivos . . . . .	36
1.5. Soluciones . . . . .	37
2.- Métodos . . . . .	39
2.1. Obtención y Caracterización de los Anticuerpos . . .	39
2.1.1. Síntesis del Antígeno . . . . .	39
2.1.2. Inmunización . . . . .	41
2.1.3. Esquema de Inmunización . . . . .	42
2.1.4. Sangría de prueba . . . . .	42
2.1.5. Determinación del título de Anticuerpos en el suero.	43
2.1.6. Sangría de cosecha . . . . .	43
2.1.7. Almacenamiento de los sueros . . . . .	43
2.1.8. Determinación del título de Anticuerpos a los sue- ros congelados y liofilizados . . . . .	45
2.2. Obtención y Caracterización del Antígeno marcado - radioactivamente. . . . .	45
2.2.1. Marcaje radioactivo de angiotensina I . . . . .	45
2.2.2. Separación de <sup>125</sup> I-angiotensina I de la mezcla de reacción . . . . .	47
2.2.3. Propiedades inmunológicas del antígeno marcado . . .	48
2.2.4. Almacenamiento del antígeno marcado . . . . .	48
2.3. Método para determinar Angiotensina I por RIA . . .	48
2.4. Pruebas de especificidad . . . . .	53
2.5. Pruebas de sensibilidad. . . . .	53
2.6. Preparación de las soluciones patrón de angioten- sina I. . . . .	56
2.7. Preparación de los inhibidores . . . . .	56
2.8. Parámetros estadísticos . . . . .	57
2.8.1. Precisión . . . . .	57
2.8.2. Comparación de APR usando reactivos del estuche comercial y los producidos en el laboratorio. . . . .	57

	PAGINA
IV. RESULTADOS . . . . .	58
V. DISCUSION . . . . .	80
VI. CONCLUSIONES . . . . .	87
VII. BIBLIOGRAFIA . . . . .	88

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ACF	.....	Adyuvante completo de Freund
AIF	.....	Adyuvante incompleto de Freund
APR	.....	Actividad plasmática de renina
°C	.....	Grados centígrados
cols.	.....	Colaboradores
cpm	.....	Cuentas por minuto
d	.....	Daltones
DEAE	.....	Dietil amino etil
E.C.	.....	Enzyme Comission
ed.	.....	Editor
EDC	.....	Cloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	.....	Acido etiléndiamino tetraacético
mg	.....	Miligramos
g	.....	Gramos
ng	.....	Nanogramos
h.	.....	Horas
l	.....	Litro(s)
ml	.....	Mililitro(s)
μl	.....	Microlitro(s)
M	.....	Molar
mCi	.....	Milicurie(s)
μCi	.....	Microcurie(s)
cm	.....	Centímetro(s)
mm	.....	Milímetro(s)
min	.....	Minuto(s)
pp	.....	Páginas
p	.....	Página
PM	.....	Peso Molecular
RIA	.....	Radioinmunoanálisis
rpm	.....	Revoluciones por minuto
Tris	.....	Tris(hdroximetil)aminometano
Arg	.....	Arginina

Asn	.....	Asparagina
His	.....	Histidina
Ile	.....	Isoleucina
Asp	.....	Acido aspártico
Leu	.....	Leucina
Phe	.....	Fenilalanina
Pro	.....	Prolina
Ser	.....	Serina
Tir	.....	Tirosina
Val	.....	Valina



## I. INTRODUCCION

## I INTRODUCCION

### 1.- El Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona

#### 1.1. Generalidades.

Desde el descubrimiento de la enzima renina por Tigerstedt y Bergmann en 1898 (1), la investigación continua durante los años siguientes y principalmente en las últimas décadas ha proporcionado extraordinarios avances en el conocimiento de la bioquímica y fisiología del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Así, el sistema tal como es conocido hoy, se resume en la figura 1 (1), en donde se observa que las moléculas componentes son:

- enzimas:    a. renina (E.C. 3.4.99.19).  
               b. convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4.15.1).  
               c. angiotensinasas.
- péptidos:  a. angiotensina I (decapéptido).  
               b. angiotensina II (octapéptido).  
               c. angiotensina III (heptapéptido).
- glucoproteína: angiotensinógeno (sustrato de renina).  
 hormona esteroide: aldosterona.

Estas moléculas constituyen un sistema que se activa en forma de cascada, el cual juega un papel importante en la homeostasis de la presión sanguínea y en la regulación del volumen sanguíneo circulante.

#### 1.2. Bioquímica:

Las moléculas componentes del sistema interactúan de la siguiente forma: la disminución del volumen de plasma o de sodio (administración de diuréticos o pérdida de sal) con la consiguiente disminución de la presión arterial, estimulará a los riñones a liberar renina. La renina activa, que se sintetiza principalmente en el riñón, es una proteasa que escinde un enlace Leu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup> de su sustrato angiotensinógeno, una glucoproteína que se produce principalmente en el hígado. (El enlace que se rompe por acción de la renina en el humano es Leu<sup>10</sup>-Val<sup>11</sup>, la secuencia de aminoácidos en el extremo amino es His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Val<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-His<sup>13</sup>, la secuencia Leu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup> se encuentra en caballo y cerdo) (2). El producto de la reacción renina-angiotensinógeno es angiotensina I

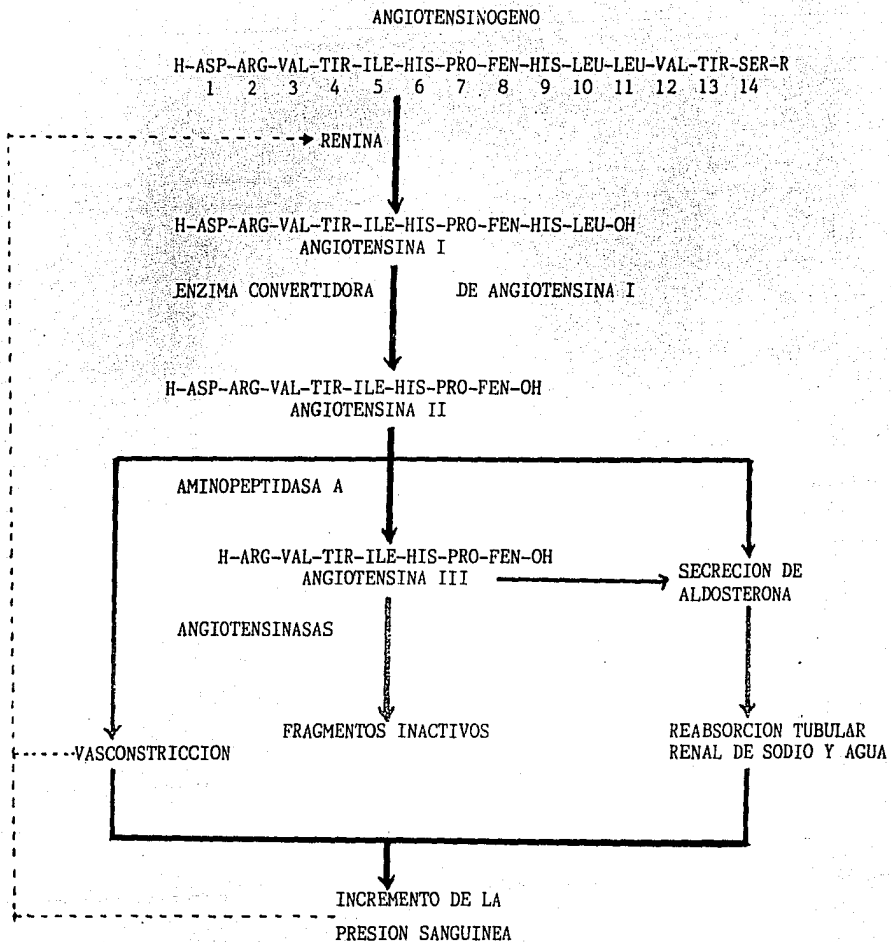


FIGURA 1. COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (3)

—— SEÑAL POSITIVA  
 - - - - SEÑAL NEGATIVA

un péptido de poca o nula actividad biológica. Este decapeptido no es una sustancia vaso presora, pero al pasar a través de la circulación pulmonar principalmente y en la circulación periférica se convierte en el octapéptido angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina, una sustancia vasopresora muy potente que actúa causando constricción del músculo liso arteriolar. Además de esta acción directa, la cual incrementa la presión sanguínea, angiotensina II actúa sobre la corteza adrenal para causar la liberación de la hormona aldosterona. La vida media de la angiotensina II circulante es corta, aproximadamente de 30 segundos debido a una rápida degradación por angiotensinasas que circulan en la sangre, las cuales constituyen un grupo de enzimas hidrolíticas (aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas) que degradan las angiotensinas a aminoácidos. La remoción del ácido -- aspártico N-terminal de la molécula de angiotensina II produce el heptapéptido angiotensina III que es menos potente que la angiotensina II para estimular la biosíntesis de aldosterona y posee solo una quinta parte de su potencia -- vasopresora (3). A través de éstas acciones, resumidas en la figura 1, el sistema renina-angiotensina-aldosterona juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y del volumen y composición del líquido extracelular.

### 1.3. Componentes.

#### 1.3.1. Renina:

La enzima renina es una glucoproteína con actividad de carboxil proteasa que escinde el enlace  $\text{leu}^{10} - \text{leu}^{11}$  de su sustrato angiotensinógeno para producir angiotensina I. Se sintetiza como una preproenzima cuya secuencia de aminoácidos ha sido determinada (4). Está formada por 406 residuos de aminoácidos. El peso molecular de la preprorenina humana es de 45067 daltones y de la renina humana de 37 235 daltones. Es la enzima limitante de la velocidad del sistema, que está presente en grandes cantidades en tejido renal.

Se ha encontrado que parte de la renina circulante se encuentra en estado inactivo y de un peso molecular superior a la renina madura ó activa (5).- La renina inactiva se transforma en una enzima activa por tratamiento con -- ácidos o proteasas. Además de las diversas especies de renina activa, se ha -- encontrado una forma inactiva de renina, que constituye del 10-50% de la con-

centración total de renina plasmática en una persona normal. Se ha postulado, pero no demostrado, que la renina inactiva es prorenina.

El riñón es la principal fuente de renina circulante, aunque se ha demostrado que el cerebro, músculo liso uterino, tejido placentario, glándulas sublinguales y ciertos tumores también la producen (6).

La renina es producida, secretada y almacenada por células del aparato yuxtaglomerular, que son células musculares lisas modificadas, localizadas en las paredes de cada arteriola renal aferente adyacente al glomérulo (figura 2 y referencia 7) y que se han descubierto en todas las especies estudiadas incluyendo reptiles, pájaros y peces. Se almacena en forma de gránulos en las células yuxtaglomerulares las cuales contienen retículo endoplásmico y aparato de Golgi, característico de las células secretoras. Un área de túbulo distal, la mácula densa, permanece en estrecho contacto con las células yuxtaglomerulares en el hilio del glomérulo. Las células YG están ricamente inervadas por nervios simpáticos. Son particularmente sensibles a cambios en la presión sanguínea.

En un principio, cabía sospechar que las células YG produjeran la renina y que los gránulos en ella contenidos fueran de renina o de su precursor. En 1939 en Bélgica, Goormaghtigh fue el primero en exponer la hipótesis de que las células YG producían una sustancia hipertensora. Dunihue, en Estados Unidos (9), también halló señales de hipertrofia del aparato YG en animales hechos experimentalmente hipertensos. Hoy sabemos que las células YG intervienen en un mecanismo homeostático que guarda relación con el control de la presión arterial. El papel fundamental de las células YG es, por lo tanto, responder a una caída de presión arterial secretando renina, que al producir angiotensina II actúa elevando la presión arterial hasta valores normales. El efecto no es permanente porque la cantidad, extra de sodio en la sangre y el aumento de presión dentro de la arteriola, actúan haciendo que las células YG disminuyan su actividad secretora. Estos mecanismos de retroalimentación negativa evitan que la presión arterial se conserve en valores excesivamente altos (Fig. 3).

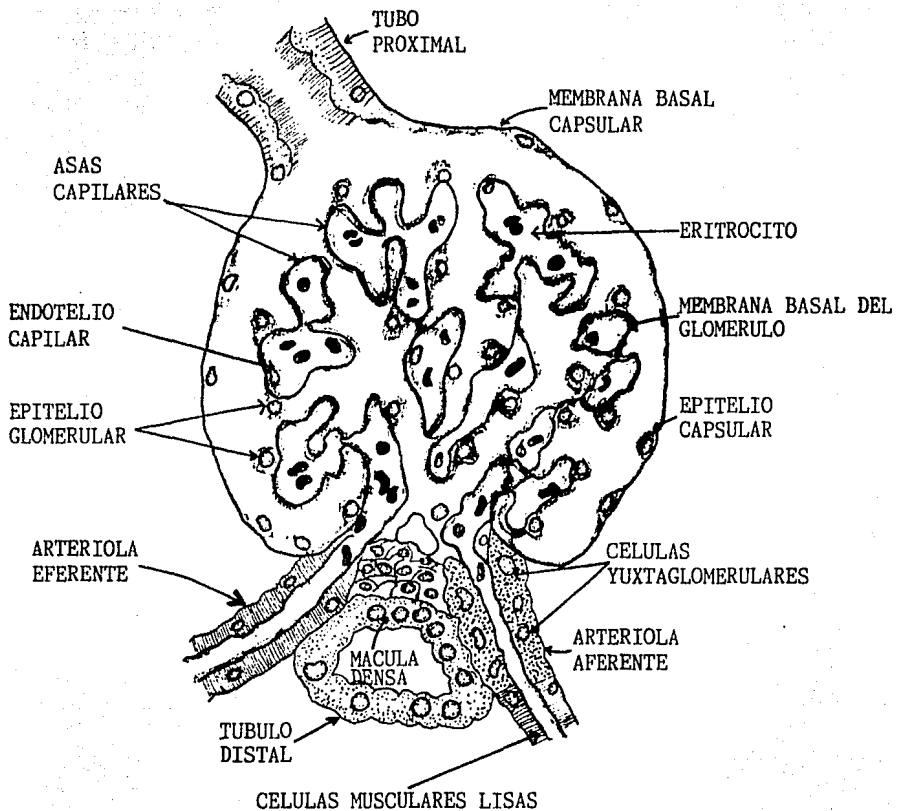


FIGURA 2. MICROANATOMIA DEL APARATO YUXTAGLOMERULAR MOSTRANDO LAS CELULAS YUXTAGLOMERULARES DE LA ARTERIOLA AFERENTE (8).

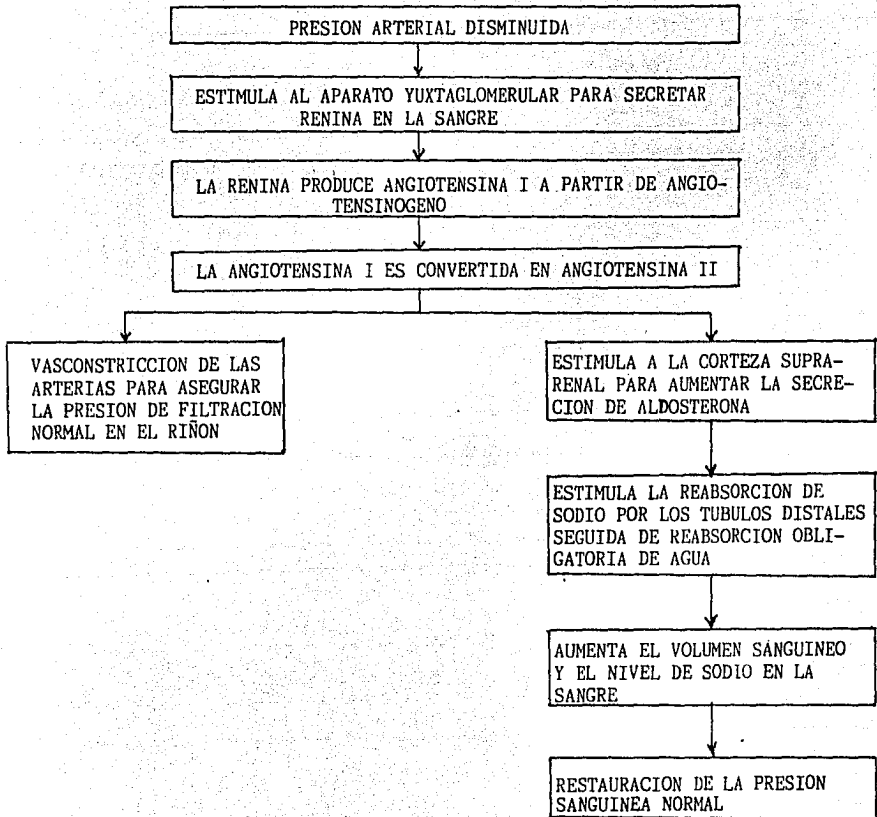


FIGURA 3. PAPEL DEL APARATO YUXTAGLOMERULAR EN EL MANTENIMIENTO DEL VOLUMEN SANGUINEO NORMAL (10)

Básicamente, los cuatro mecanismos que regulan la liberación de renina - incluyen:

- a). Un receptor renal vascular que responde a cambios en la tensión arterial de la arteriola aferente.
- b). Un receptor en la mácula densa que detecta cambios en la velocidad de liberación de iones sodio y cloruros al túbulo distal.
- c). Factores hormonales, como angiotensina II circulante, prostaglandinas.
- d). El sistema nervioso central, vía los nervios renales y las catecolaminas circulantes.

### 1.3.2. Angiotensinógeno:

El angiotensinógeno humano puro es una glucoproteína de peso molecular - de 65000 daltones y el de la molécula libre de carbohidratos es de 49548 daltones (11). Es la molécula que sirve como sustrato de la enzima renina para - producir angiotensina I.

Diversos estudios indican que el angiotensinógeno circulante se produce en el hígado, así se ha demostrado que se libera de:

- a. hígado perfundido (12)
- b. rebanadas de hígado (13)
- c. hepatocitos aislados (14)

además, "in vivo" se ha demostrado que la concentración plasmática de angio-- tensinógeno disminuye después de la hepatectomía.

La concentración en plasma es de 4-7 mg/ml. Sus niveles permanecen relativamente constantes, excepto cuando la producción se incrementa después de - la administración de estrógenos, glucocorticoides, insulina, prostaglandinas, angiotensina II y binfrectomía (15,16,17). También se ha demostrado que la tiroidectomía y la adrenalectomía disminuyen el nivel plasmático de angiotensinógeno.

### 1.3.3. Angiotensina I:

El producto de la reacción renina-angiotensinógeno es angiotensina I, un decapeptido de poca o nula actividad biológica. En la figura 4 se muestra la secuencia de aminoácidos de la angiotensina I humana, y en la figura 5 se - - ilustra la estructura de la angiotensina I en varias especies de vertebrados,



ASP---ARG---VAL---TIR---ILE---HIS---PRO---FEN---HIS---LEU  
 1        2        3        4        5        6        7        8        9        10

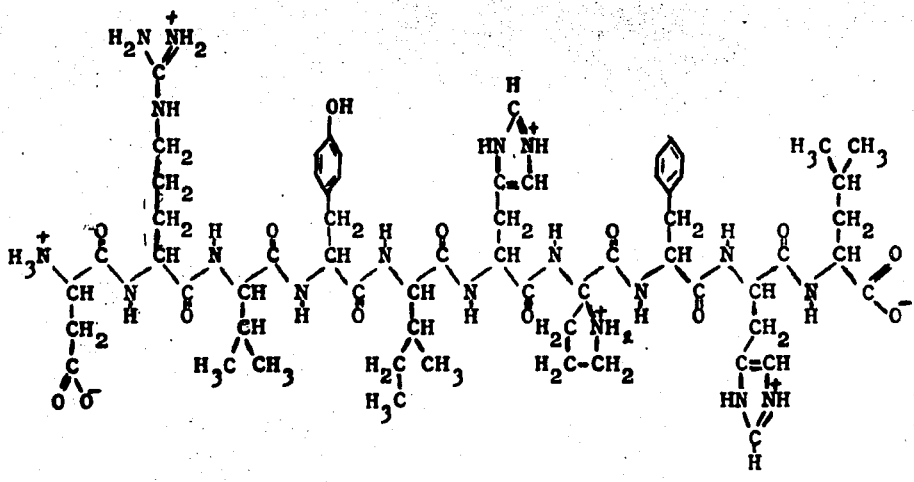


FIGURA 4.- SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA ANGIOTENSINA I

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pez teleostato aglomerular (pez ganso)	<u>Asn</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Val</u>	- His	- Pro	- Fen	- <u>His</u>	- Leu
Pez teleostato glomerular (salmón)	<u>Asn</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Val</u>	- His	- Pro	- Fen	- <u>Asn</u>	- Leu
Anfibios (rana toro)	<u>Asp</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Val</u>	- His	- Pro	- Fen	- <u>Asn</u>	- Leu
Reptil (serpiente)	<u>Asp</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Val</u>	- His	- Pro	- Fen	- <u>Tir</u>	- Leu
Pájaro (pollo)	<u>Asp</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Val</u>	- His	- Pro	- Fen	- <u>Ser</u>	- Leu
Mamífero (Bovino)	<u>Asp</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Val</u>	- His	- Pro	- Fen	- <u>His</u>	- Leu
Mamífero (caballo, cerdo, rata, perro, conejo, caballo, humano).	<u>Asp</u>	- Arg	- Val	- Tir	- <u>Ile</u>	- His	- Pro	- Fen	- His	- Leu

Figura 5: Estructura de Angiotensina I en Diferentes  
Especies Representativas de Vertebrados. (11)

observándose que los aminoácidos que cambian en las diferentes especies son el 1, el 5 y el 9.

La primera preparación pura de angiotensina se obtuvo por incubación in vitro de renina cruda preparada de plasma de caballo (18). Pronto se conoció su composición y secuencia de aminoácidos (19).

#### 1.3.4. Angiotensina II:

Aproximadamente en 1940 dos grupos de investigadores trabajando independientemente: Page y Helmer en Estados Unidos (20) y Braun-Menéndez en Argentina (21), mostraron que la renina por sí misma no es una sustancia vasoconstrictora. Encontraron que la renina presente en plasma produce una nueva sustancia estable al calor, de acción corta y vasoconstrictora. Page y Helmer denominaron a la nueva sustancia "angiotonina"; Braun-Menéndez usaron el término "hipertensina". Durante muchos años los investigadores de todo el mundo se dividieron en dos escuelas, cada una con su propia terminología, hasta que llegaron a un acuerdo de adoptar el término "angiotensina", en el año de 1961.

Angiotensina II es el componente activo del sistema, posee diferentes acciones fisiológicas importantes, la primera de ellas se identificó fué su acción presora, razón por la cual durante muchos años se pensó que la única función del sistema era la regulación de la presión sanguínea. Fué hasta 1960 -- cuando se descubrió que además, estimula la secreción de aldosterona. Esta molécula eleva la presión sanguínea de dos maneras: 1) ejerce acción directa sobre las arteriolas estimulando sus paredes musculares para que se contraigan, lo cual disminuye el calibre de las luces arteriolas y esto eleva la presión arterial en el sistema circulatorio en conjunto y 2) estimula a la corteza -- suprarrenal para producir aldosterona, la cual actúa sobre las porciones tubulares de las nefronas obligándolas a conservar más sodio y agua; esto aumenta el contenido de líquidos del sistema. Como resultado, aumenta la reabsorción-obligatoria de agua, aumenta el volumen sanguíneo y disminuye el volumen de -- la orina.

### 1.3.5. Enzima Convertidora de Angiotensina:

La enzima convertidora de angiotensina I (peptidil dipéptido hidrolasa - (E.C. 3.4.151) es una exopeptidasa que cataliza la ruptura de unidades peptídicas del extremo carboxilo de varios péptidos sintéticos y naturales. Los sustratos fisiológicos son angiotensina I y bradiquinina (Figura 6 y referencia-22). Su actividad varía en las diferentes especies estudiadas (23,24). Es una glucoproteína de peso molecular de 130,000-140,000 daltones. Convierte el decapeptido inactivo angiotensina I al octapéptido vasoconstrictor angiotensina II; esta reacción ocurre por remoción del dipéptido c-terminal his-leu de angiotensina I. La actividad enzimática requiere de iones cloruro que in vitro pueden ser sustituidos por otros aniones monovalentes como bromuros, fluoruros y nitratos; es inhibida por EDTA, indicando esto que la enzima es una metaloproteína.

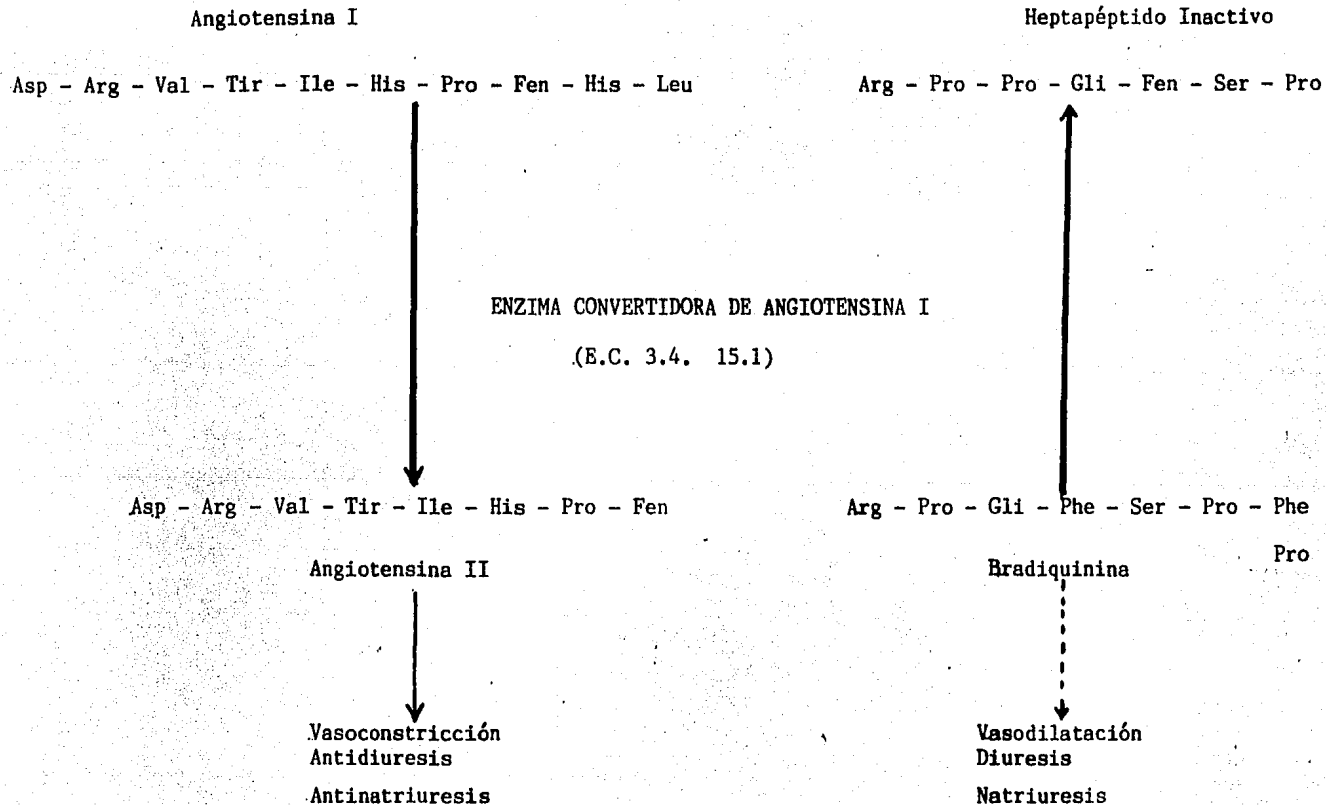
Fue descubierta en 1950 en plasma de caballo (25). Existe en una amplia variedad de organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Está presente en todos los órganos y líquidos corporales de los mamíferos, principalmente en el endotelio vascular del pulmón (22).

Además de convertir angiotensina I a angiotensina II, también inactiva a la bradiquinina. La hidrólisis de bradiquinina procede por remoción de los dipéptidos Phe-Arg y Ser-Pro del extremo COOH-terminal del péptido. De esta forma, la misma enzima que produce la sustancia vasoconstrictora, también inactiva otro péptido con potentes efectos vasodilatadores.

Existen inhibidores específicos de la enzima (26) los cuales suprimen la respuesta vasopresora de angiotensina II, potencian los efectos vasodilatadores de bradiquinina y revierten la hipertensión experimental dependiente de renina. Uno de éstos inhibidores es el captopril (SQ-14,225).

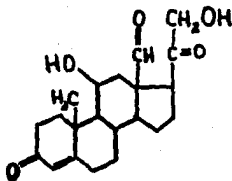
### 1.3.6. Aldosterona:

Aldosterona, una hormona natural secretada por la zona glomerular de la corteza adrenal es el más potente regulador de la secreción de electrolitos, ya que en el organismo promueve retención de sodio y agua y facilita la excreción de potasio. Su peso molecular es de 360.4 daltones y se clasifica, en --



**FIGURA 6: Reacciones Fisiológicas Catalizadas por la**  
**Enzima Convertidora de Angiotensina. (22)**

base a su estructura dentro del grupo de las hormonas esteroides por tener la siguiente fórmula química:



En el túbulo distal, la acción de la aldosterona se manifiesta por la -- reabsorción incrementada de sodio y cloruros con incremento en la secreción -- de potasio. La reabsorción de sodio y cloruros tiende a incrementar la osmola-- ridad del líquido extracelular. El mecanismo que regula la secreción de aldoste-- rona es responsable de los cambios en la hidratación del cuerpo. Importan-- tes estudios han establecido el hecho de que el sistema renina-angiotensina-- aldosterona es el principal mediador de la respuesta adrenocortical a cambios en la hidratación del cuerpo (27).

La secreción de aldosterona está inversamente relacionada con el volumen del fluido extracelular (especialmente en plasma) y con el contenido total de sodio del cuerpo. La restricción de sodio en el hombre causa un aumento de -- unas cinco veces en la secreción de aldosterona, mientras que una dieta alta-- en sodio reduce evidentemente dicha secreción.

Las condiciones que reducen el volumen del líquido extracelular y las -- que resultan en pérdida de sangre venosa, tienden a estimular la producción -- de renina de este modo se incrementa la formación de angiotensina.

#### 1.4. El Sistema y la Hipertensión.

Tigerstedt y Bergmann en 1898, mostraron que cuando se administraban in-- travenosamente extractos salinos de riñón en animales de experimentación, se-- producía una sorprendente elevación de la presión sanguínea. Sin embargo, la-- investigación del mecanismo que mantiene tal incremento ha sido amplia desde--

los trabajos clásicos de Goldblatt y Cols. (28) al descubrir que si se disminuía moderadamente el flujo sanguíneo a los riñones al colocar una pinza de plata en las arterias renales, la presión arterial del animal aumentaba. Comprobaron que ello dependía de que el riñón en estas condiciones de isquemia vertía en la sangre una sustancia denominada renina, cuyo efecto era pasajero de modo que para producir hipertensión sostenida debía formarse de manera continua (29).

Actualmente se conoce que el trastorno denominado presión arterial alta o hipertensión se presenta en aproximadamente una de cada cinco personas en algún momento de la vida. La hipertensión se debe a que están contraídas las arteriolas del cuerpo, razón por la cual se eleva la presión en todo el sistema arterial. En un número elevado de casos, las células de las paredes arteriolas enferman y a su alrededor aparecen depósitos de sustancias anormales, estos disminuyen la luz de los vasos y poco a poco los van haciendo más estrechos. Este tipo de hipertrofia se acompaña casi siempre de enfermedad renal; la relación causal que existe entre enfermedad renal e hipertensión ha sido tan manifiesta a través de los años que cada una de ellas se ha considerado indiscutiblemente causa de la otra. Cualquier factor que lesione los riñones puede causar hipertensión renal; en estos casos, los riñones lesionados secretan grandes cantidades de renina que a su vez origina la formación angiotensina, y esta causa vasoconstricción, la cual actúa correspondiendo al efecto del volumen sanguíneo elevado que tiene lugar en las enfermedades del riñón originando una hipertensión muy grave (30).

En sujetos normales, el sistema es vital para mantener la presión sanguínea durante la privación de sodio o durante la pérdida excesiva de volumen circulante. El papel del sistema en estados fisiológicos normales y en estados de hipertensión se ha descubierto mediante el uso de inhibidores del sistema (31,32).

## 2.- Radioinmunoanálisis.

### 2.1. Antecedentes:

El Radioinmunoanálisis (RIA), método analítico de alto grado de especificidad y sensibilidad, tuvo sus inicios en 1960 cuando los doctores Yallow y - Berson (33) reportaron sus resultados sobre la determinación de insulina endógena en suero por este método desarrollado por ellos. Antes de su desarrollo no se disponía de técnicas uniformes para determinar cuantitativamente muchas moléculas de importancia biológica en fluidos corporales y en especial de hormonas, y el intentar hacerlo resultaba un serio problema técnico dado que se requerían grandes cantidades de muestra y los resultados obtenidos eran difíciles de reproducir. Predominantemente se usaron métodos de bioensayo los cuales consisten en medir un efecto específico hormonal en un sistema vivo y la respuesta se compara con aquella producida por una preparación patrón de hormona. Debido a la naturaleza del bioensayo, era necesario asignar un sistema separado para cada hormona; además pocos bioensayos combinan una especificidad adecuada con una sensibilidad suficientemente aguda para medir bajas concentraciones de hormona, principalmente peptídicas para las cuales no se disponía de bioensayos.

La aplicación del RIA ha sido amplia y extensa durante los años posteriores a su desarrollo, de tal forma que actualmente se pueden estudiar por ésta técnica una amplia gama de sustancias como: hormonas peptídicas, fármacos, vitaminas, nucleótidos cíclicos, enzimas, proteínas séricas, virus, etc. Hay un número cada día más grande de moléculas que están siendo cuantificadas en fluidos biológicos como sangre, orina y líquido cefalorraquídeo.

Desde un punto de vista práctico, el RIA provee una determinación in vitro en la que pueden manejarse cientos o miles de muestras simultáneamente en cualquier laboratorio equipado para mediciones de radioactividad. En la actualidad ya no es sorprendente el interés que tanto los laboratorios de investigación, como los clínicos han establecido que es una herramienta invaluable para trazar los mecanismos y modelos de regulación hormonal y los clínicos han aprovechado su utilidad en la evolución y diagnóstico de varias anomalías endócrinas asociadas con hipo o hipersecreción.



De esta forma, el RIA ha solucionado muchos problemas técnicos siendo considerados en la actualidad como una metodología rápida, exacta, reproducible, de manejo relativamente sencillo por cuanto a requerir cantidades mínimas de muestra y principalmente por reunir los atributos de alta sensibilidad y especificidad, para la evaluación de todas las hormonas peptídicas y de una variedad de otras sustancias biológicamente importantes, antigénicas y no antigénicas.

## 2.2. Fundamento:

El RIA se define como un método analítico que combina la elevada sensibilidad de los métodos radioquímicos con la exquisita especificidad de las reacciones inmunoquímicas, basado en la competencia entre una hormona marcada radiactivamente y la hormona no marcada para unirse con el anticuerpo específico (34), en una de sus modalidades (RIA Competitivo).

Así, una muestra desconocida de antígeno no marcado se mezcla con una -- cantidad constante y conocida del mismo antígeno marcado radiactivamente. A esta mezcla se adiciona una cantidad constante de solución conteniendo anticuerpos preparados contra el antígeno que se va a medir. Es conocido que los anticuerpos, en virtud de la complementariedad estructural reaccionan específicamente con el antígeno que estimuló su producción. Es importante adicionar cantidades suficientemente pequeñas de anticuerpo, tal que el sistema esté en condiciones de exceso de antígeno. Ya que el sistema está limitado por la cantidad de anticuerpo (que une el 50% del antígeno marcado), la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno no marcado presente.

En breve, el RIA explota la habilidad de la hormona no marcada presente en el plasma u otras soluciones para competir con la hormona marcada por el anticuerpo y con esto inhibir la unión de la hormona marcada. Como resultado de esta inhibición competitiva, la relación anticuerpo-hormona marcada unida (B) a hormona marcada libre (F), denominada B:F, disminuye conforme la concentración de hormona no marcada aumenta. Esto se ilustra en la figura 7. La concentración en una muestra desconocida se obtiene por comparación de la inhibición observada en esa muestra con aquella producida por una serie de soluciones patrón conteniendo cantidades conocidas de hormona no marcada.

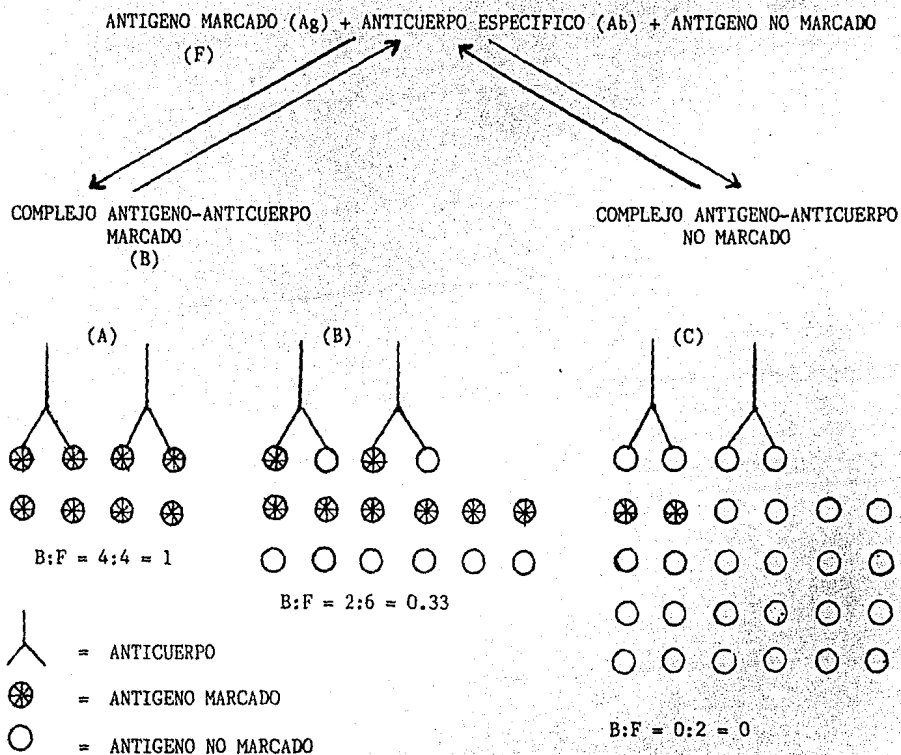


FIGURA 7. En este esquema se ilustra el fundamento del radioinmunoanálisis, en un ensayo por competencia, donde la cantidad de anticuerpo es fija. En (A) - solo hay antígeno marcado, la cantidad de antígeno marcado que está unido es igual a la que permanece libre. Cuando se adiciona suficiente antígeno no marcado (B) para competir igualmente con la hormona marcada, la relación B:F disminuye a 0.33. Si la muestra es rica en hormona no marcada -- (C), tal que la concentración de la hormona marcada es despreciable, B:F se aproxima a cero (35).

Es posible medir cantidades de nanogramos o menos de una hormona específica en presencia de concentraciones billones de veces más altas de otras proteínas plasmáticas presentes en la muestra; lo que significa que este método es capaz de detectar cantidades traza de cualquier sustancia que pueda actuar como antígeno o hapteno. La resolución está limitada principalmente por la especificidad de la preparación del anticuerpo y por la actividad específica del antígeno marcado.

### 2.3. Técnica.

Una determinación por RIA comienza con la preparación de una serie de patrones y muestras desconocidas en tubos de ensayo. Generalmente se pueden trabajar una docena de patrones y las muestras desconocidas, todos en soluciones amortiguadas. Como se mencionó anteriormente el RIA consiste en una competencia química, razón por la cual todos los tubos contienen cantidades constantes de anticuerpo y antígeno marcado radiactivamente. Para la curva patrón, - se adicionan cantidades progresivamente mayores de antígeno no marcado; esto obviamente da lugar a que, también en el mismo orden, se presente una competencia cada vez más fuerte entre los antígenos para unirse al anticuerpo; así, en los primeros tubos de la serie hay un exceso franco de antígeno radiactivo por lo cual el resultado neto es la formación de complejos antígeno-anticuerpo en su mayoría radiactivos, mientras que en los últimos tubos de la serie - el antígeno no marcado es el que se encuentra en exceso y por lo tanto con mayor probabilidad de ganar los sitios afines del anticuerpo. Si consideramos - la inclusión de algunos tubos más a esta serie, en los cuales la cantidad de antígeno no marcado es desconocida y se mantienen constantes todos los demás - parámetros entonces vemos de inmediato la posibilidad de poder deducir la concentración del antígeno presente en dicha muestra, por la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo que se formen.

Después de unas horas de incubación, las fracciones libre y unida de la hormona marcada se separan. Para ello se debe contar con un método de separación de los complejos, con objeto de poder medir la radiactividad contenida - en ellos. Los métodos que han sido aplicados para tales fines incluyen: electroforesis, cromatografía, precipitación química, resinas de intercambio iónico, carbón-dextrán, doble anticuerpo, anticuerpo unido a fase sólida, etc. Este procedimiento se ilustra en la figura 8.

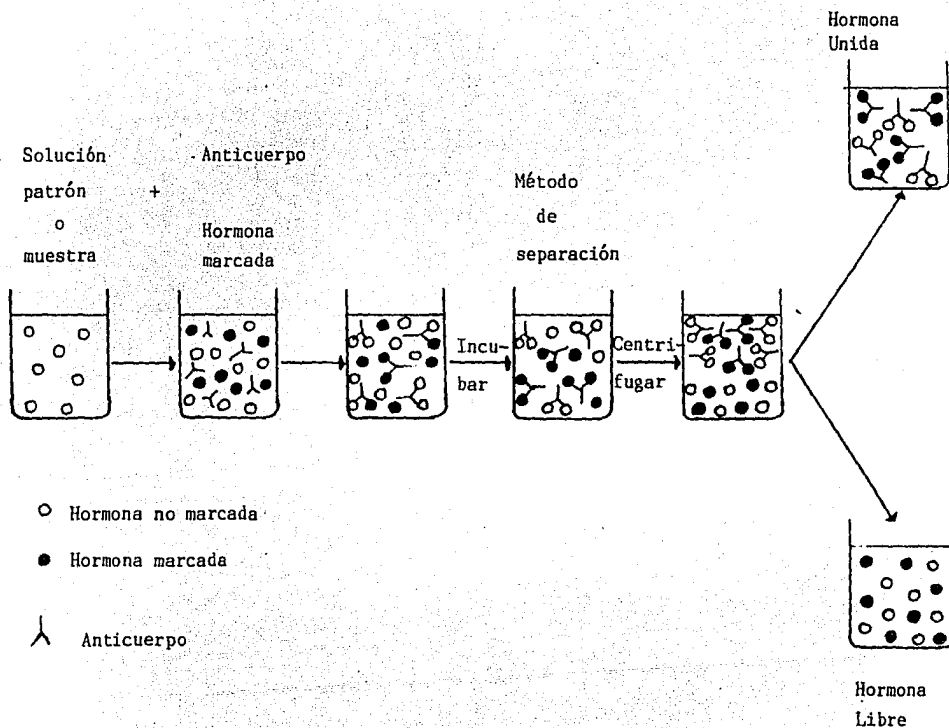


FIGURA 8.- En éste esquema se ilustran los pasos de un RIA competitivo aplicado a la medición de - hormona circulante (35).

## 2.4 Cálculo de Resultados:

Tomando en cuenta que prácticamente todos los métodos de RIA se llevan a cabo empleando curvas patrón, el cálculo de los resultados es bastante sencillo, ya que implica tan solo una adecuada interpolación de los datos de la muestra problema en la curva patrón.

### Pasos a seguir:

1. En un contador, medir la radiactividad presente en cada tubo.
2. Restar la radiación de fondo.
3. Calcular el promedio de las cpm.
4. Calcular las cuentas netas promedio para los patrones y muestras sustrayendo el promedio de las cuentas del blanco.
5. Calcular la relación  $B_0/B_t$ .
6. Calcular la relación  $B/B_0$ .
7. Trazar las curvas patrón.
8. Interpoliar los datos problema.
9. Corrección de lectura por concepto de volumen y/o dilución empleada.

$B$  = Cantidad de radiactividad unida en presencia de patrones o muestras problema.

$B_0$  = Fracción de radiactividad unida por el tubo que contiene nula concentración de antígeno no radiactivo. Representa directamente a la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo formados en este tubo.

$B_t$  = Cantidad de radiactividad total adicionada al tubo.

$B_0/B_t \times 100$  = Cociente de la fracción de radiactividad representativa de los complejos antígeno-anticuerpo formados en el tubo del patrón "0" con la cantidad total de radiactividad adicionada a cada tubo. Representa un índice del estado funcional de los reactivos-empleados, y normalmente se encuentra en el rango de 30 a 50%.

$B/B_0 \times 100$  = Cociente que relaciona la fracción de radiactividad unida por cada patrón o muestra con la del tubo patrón "0". Representa en sí la fracción porcentual unida en cada tubo con respecto al máximo, que es el registrado en el patrón "0" ( $B_0$ ).

### Curvas Patrón:

Una vez obtenidos los datos de conteo radiactivo y calculado B/Bo de las muestras patrón, es posible proceder a trazar las gráficas de la curva patrón en varias formas:

-- Curva lineal: En este caso se traza en papel milimétrico normal, con lo -- cual se obtiene una curva similar a la ilustrada en la figura 9.

Una curva de este tipo si bien es útil y muy empleada, tiene el problema -- de que en sus extremos resulta muy difícil interpolar adecuadamente los da tos problema. Debido a ello se han desarrollado otros métodos para mejorar esta situación.

-- Curva semilogarítmica. Una forma de mejorar la sensibilidad de la curva pa trón es trazarla semilogarítmicamente, en forma similar a la que se repre-- senta en la figura 10.

Esto da lugar a una curva más lineal, ampliando con ello la zona de inter-- polación.

-- Curva logit-log. Este método es significativamente más complicado y gene-- ralmente solo se usa cuando se dispone de una computadora para el procesa-- miento de datos. Consiste en trazar en una gráfica el logaritmo decimal de la concentración de antígeno no radiactivo contra el logit (36) de los co-- cientes B/Bo. La fórmula para calcular el logit es la siguiente:

$$\text{Logit (B/Bo)} = \log_{10} \left( \frac{B/Bo}{1-B/Bo} \right)$$

Con éste método se logra una linearización total de la curva permitiendo -- una más sensible interpolación de los datos en toda su longitud, como se -- observa en la figura 11.

### 2.5. Isótopos radiactivos usados para marcar.

Las propiedades físicas de un isótopo radiactivo determinan su uso como-- agente de diagnóstico y en determinaciones clínicas. Las tres más importantes son vida media, modo de caída y energía de caída.

FIGURA 9.- CURVA LINEAL

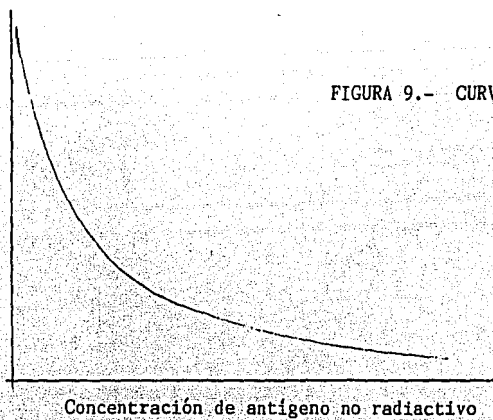
Escala  
Lineal $\% \frac{B}{B_0}$ Escala  
Lineal

FIGURA 10.- CURVA SEMILOGARITMICA

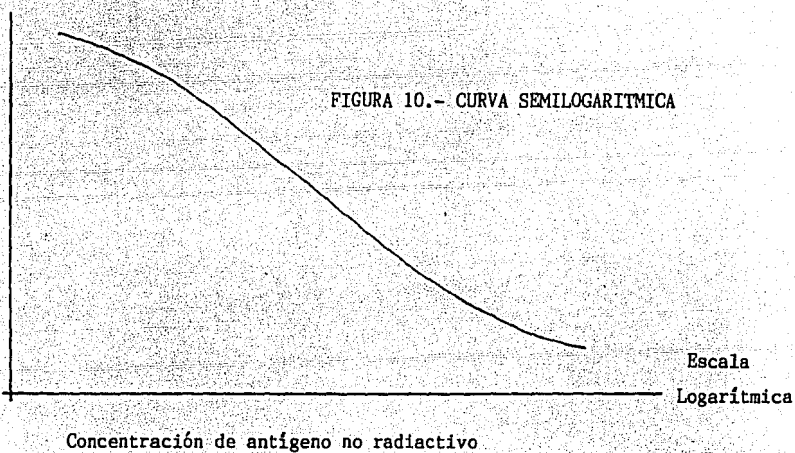
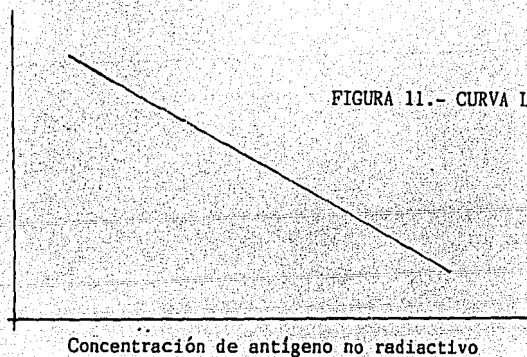
Escala  
Lineal $\% \frac{B}{B_0}$ Escala  
Logarítmica

FIGURA 11.- CURVA LOGIT-LOG

Escala  
Logit.Logit  $\frac{B}{B_0}$ Escala  
Logarítmica

Los isótopos más empleados para éste fin, son los siguientes:

RADIO ISOTOPO	VIDA MEDIA	MODO DE CAIDA
$^3\text{H}$	12.35 años	$\beta$
$^{14}\text{C}$	5730 años	$\beta$
$^{35}\text{S}$	87.4 días	$\beta$
$^{36}\text{Cl}$	$3.01 \times 10^5$ años	$\beta, \gamma$
$^{32}\text{P}$	14.3 días	$\beta$
$^{131}\text{I}$	8.04 días	$\beta, \gamma$
$^{125}\text{I}$	60.0 días	$\gamma$
$^{57}\text{Co}$	270.9 días	$\gamma$
$^{58}\text{Co}$	70.8 días	$\beta$
$^{75}\text{Se}$	118.5 días	

Uno de los radioisótopos más usados para marcar moléculas de importancia biológica es el  $^{125}\text{I}$ , debido a su estabilidad y eficiencia de conteo. La vida-media del  $^{125}\text{I}$  es de 60 días, comparado con 8 días del  $^{131}\text{I}$ , el otro isótopo de yodo disponible.

#### 2.6. Métodos de Medición:

Dada la necesidad de llevar a cabo conteos de radiactividad como parte del proceso del RIA es conveniente conocer, por lo menos superficialmente, el principio funcional de los detectores de radiaciones beta y gamma.

Detectores beta (centelleo líquido): una radiación beta es una partícula nuclear emitida por ciertos isótopos radiactivos y que es indiferenciable por cuanto a masa y carga eléctrica de un electrón. En los contadores de centelleo líquido el principio de detección es similar al de los cristales de centelleo-



solo que en este caso se trata de un líquido centelleador, lo cual permite un contacto íntimo entre la muestra radiactiva y la solución centelleante, permitiendo detectar a la radiación beta que es de menor energía. La solución normalmente, está compuesta por un disolvente orgánico, conteniendo uno o dos -- "fluor" (compuesto que convierte la energía de excitación molecular en fotones de luz), acompañado de un detergente que hace que toda la solución sea -- miscible, en el caso de que se estén contando muestras acuosas. La energía de las partículas beta emitidas se transfiere vía el disolvente al soluto primario y algunas veces a un soluto secundario, el cual emite entonces la energía como fotones de luz. Estos fotones se miden usando un fotomultiplicador - - - (37,38).

**Detectores gamma (cristales de centelleo sólido):** las radiaciones gamma--son aquellas de tipo electromagnético que son emitidas por el núcleo de algunos isótopos inestables como resultado del reacomodo posicional de los nucleos. Los contadores de centelleo son hoy en día los más empleados en el laboratorio clínico. La figura 12 es un boceto de un detector de centelleo y muestra los dos principales componentes: el cristal de centelleo y el tubo fotomultiplicador. La muestra que va a contarse puede estar suspendida en solución o en forma de pastilla. Una vez que la muestra está bien introducida en el contador, queda colocada junto a un cristal de yoduro de sodio, conteniendo cantidades traza de cloruro de talio. Los rayos gamma emitidos por la muestra pasan a través de la pared del tubo de ensayo, y algunos de ellos chocan con el cristal de centelleo y colisionan con los electrones en el cristal -- transfiriéndole parte o toda su energía al electrón. Esta energía se transforma a su vez en un centelleo, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de energía perdida por el fotón de radiaciones gamma. La luz se desplaza a través del cristal de centelleo al tubo fotomultiplicador adyacente, donde es detectada.

Los cristales de yoduro de sodio activados con talio son los mejores detectores de radiaciones gamma, sobre todo porque el número atómico del yodo -- es lo suficientemente elevado para facilitar una absorción fotoeléctrica eficaz y también porque la absorción de una cantidad determinada de energía produce la emisión de un destello de luz más claro que otros detectores. Hay dos ventajas en el uso de un contador gamma: primero, el tiempo requerido para -- acumular velocidades de conteo estadísticamente significativas es usualmente-

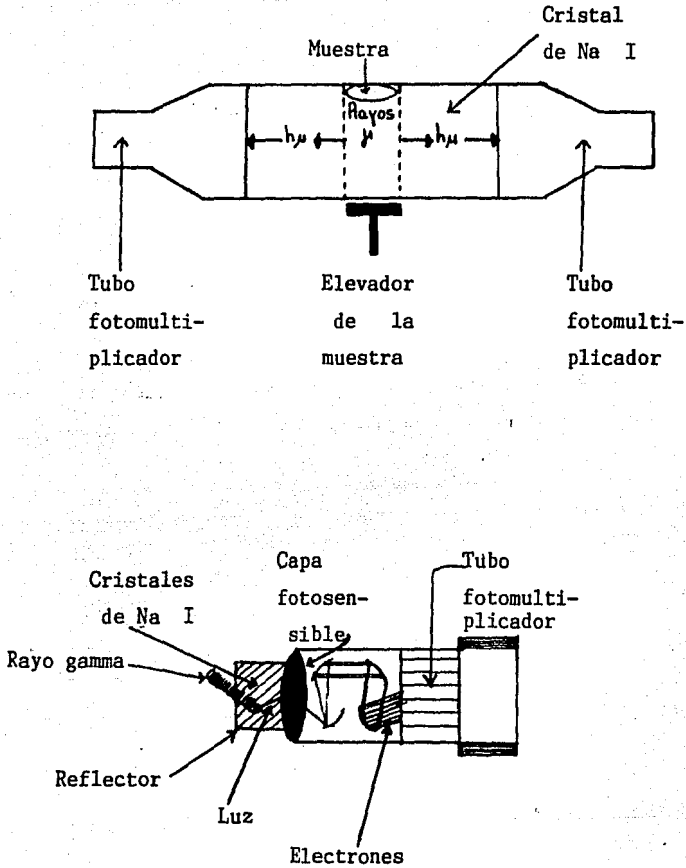


FIGURA 12.- Diagramas esquemáticos que ilustran la organización y operación de los elementos sensibles a las radiaciones gamma de un contador de centelleo (37,38).

bastante pequeño, incrementando así el número de muestra que pueden ser procesados por unidad de tiempo; segundo, son menos complejos electrónicamente, no requieren el uso de frascos de centelleo y por consiguiente, considerablemente menos costosos en cuanto a adquisición, operación y mantenimiento - (37,38).

### 2.7. Control de Calidad:

Es conveniente que todo el laboratorio que lleva a cabo determinaciones por medio de RIA, observe un escrupuloso programa de control de calidad, el cual de una manera muy general debe observar los siguientes puntos:

- Se tendrá una clara definición de la calidad que se requiere de cada uno de los reactivos empleados en la determinación, generalmente el reactivo más variable es el antígeno marcado radiactivamente del cual es muy importante conocer exactamente su tiempo de vida media. Los laboratorios que producen sus propios reactivos, deberán caracterizarlos muy bien antes de usarlos.
- Otro aspecto, consiste en mantener en buenas condiciones el equipo. Los dilutores y micropipetas se ajustarán para obtener mediciones exactas y precisas; a los congeladores, refrigeradores y centrifugas refrigeradas se les vigilará la temperatura y a los contadores de radiaciones se checarán en cuanto a eficiencia y contaminación. Si esta verificación se hace rutinariamente se evitarán muchos problemas y se ahorrará tiempo.
- Vigilar las condiciones óptimas en la realización de la técnica tales como temperatura, tiempo y pH óptimos tanto de reacción como de incubación; método de separación, etc.
- Cada que se procesen muestras de pacientes se procederá a verificar tanto la exactitud del ensayo, como la precisión del intraensayo mediante su control por duplicado.
- Al paso de los días se procederá a la valoración de la reproducibilidad inter-ensayo, de cada una de las pruebas efectuadas (39).

## 2.8. Estandarización:

El fin de la estandarización es procurar resultados exactos y reproducibles, a diferentes tiempos, con diferentes reactivos y en diferentes laboratorios. Esto involucra el uso de cierta disciplina basada en el entendimiento de que los resultados del ensayo pueden estar ampliamente influenciados por la variabilidad de los reactivos y las condiciones de ensayo. Estandarización no significa que el mismo sistema de ensayo o reactivos deben usarse por todos los laboratorios.

Es muy aconsejable que todo laboratorio que produce sus propios reactivos para una determinación por RIA, debe estar consciente de los criterios en los requerimientos que estos deben cumplir, y trate de diseñar su sistema de acuerdo con ellos.

Otros aspectos en la estandarización es la simple disciplina de un procedimiento de laboratorio correcto, el uso de muestras control y el control de calidad interno (40).

## 3.- Producción de Anticuerpos

El éxito o fracaso de la metodología implicada en la obtención de anticuerpos frente a un antígeno determinado, está ampliamente marcado por el paso inicial que consiste en la preparación del inmunógeno. Los sistemas inmunes de muchos animales son extremadamente sensibles, detectando hasta las más pequeñas trazas de contaminantes.

La interacción del inmunógeno con los linfocitos y macrófagos es importante en la respuesta inmune. Aunque los linfocitos están relacionados con la producción de inmunoglobulinas, el macrófago juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune ya que asegura la presentación a las células inmunocompetentes de antígenos parcialmente degradados. Si bien el macrófago no ejerce una función específica en el reconocimiento del antígeno (función propia de los linfocitos), esta cooperación celular que realiza mar

ca el inicio de la reacción inmunitaria.

Bajo la influencia de los órganos linfoides centrales, las células linfoides se hacen inmunocompetentes, es decir, capaces de reaccionar específicamente con los determinantes antigénicos que les han sido presentados por los macrófagos. Para las células B, el receptor responsable del reconocimiento del antígeno es una inmunoglobulina; para las células T, hasta 1985 se conoció la naturaleza de éste receptor, que es un heterodímero unido por puentes disulfuro. De esta forma, los linfocitos B, responsables de la reacción inmunitaria de tipo humoral, dan origen a las células secretoras de anticuerpos. En cuanto a los linfocitos T, son los que originan aquellas células sensibilizadas al antígeno que intervienen en la reacción inmunitaria de tipo celular; además intervienen en la reacción humoral mediante fenómenos de cooperación celular entre T y B. Los linfocitos T cooperan en la síntesis de anticuerpos frente a antígenos timodependientes (linfocitos T auxiliares). Por otra parte, ciertos linfocitos T ejercen un control inhibiendo las respuestas inmunitarias humorales: son los llamados linfocitos T supresores (41).

### 3.1. Preparación del inmunógeno.

La potencia inmunológica de los antígenos solubles puede elevarse considerablemente si persisten dentro de los tejidos del animal de prueba. Esto puede llevarse a cabo aplicando múltiples inyecciones del antígeno al animal, cierto período de tiempo. Otro método es mediante el empleo de adyuvantes. Este término se usa para denotar cualquier sustancia que incremente la respuesta inmune hacia el antígeno inyectado. Los geles inorgánicos como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio fueron los adyuvantes usados inicialmente; los inmunógenos se absorben sobre su superficie y esta mezcla es la que se inyecta. Posteriormente, éstos compuestos fueron reemplazados por los adyuvantes desarrollados por Freund, donde se forma una emulsión aceite-agua. Después de la inyección subcutánea o intramuscular de la emulsión estable, se formarán pequeñas gotas, las cuales se distribuyen desde el sitio de inyección; la emulsión estable produce muy baja liberación del inmunógeno, duradera en algunas ocasiones hasta varios meses.

El adyuvante completo de Freund contiene bacilos tuberculosos muertos y se usa generalmente para la primera inmunización; si se utiliza para las siguientes inyecciones puede producirse una intensa reacción granulomatosa en el sitio de inyección. El adyuvante incompleto se usa para las inyecciones posteriores; contiene aceites pero carece de los bacilos tuberculosos. El uso de tales adyuvantes tiene dos propósitos fundamentales: primero, previene el rápido catabolismo del antígeno, por lo que una exposición más prolongada del antígeno incrementa la respuesta inmunológica, y segundo: la emulsión incrementa la exposición del antígeno a los macrófagos, ya que reaccionan al ser atraídos por un cuerpo extraño. La presencia de microbacterias muertas por el calor en el adyuvante completo de Freund sirve generalmente para estimular el sistema retículo endotelial completo del animal incrementando la respuesta de los macrófagos y promoviendo la actividad de las células T cooperadoras (38,41).

### 3.2. Vía de inoculación:

El objetivo principal que se persigue al inyectar el inmunógeno en un animal de prueba es, de hecho, introducir el antígeno en un medio potencialmente rico en macrófagos. Las vías intramuscular, intradérmica y subcutánea satisfacen este objetivo. La vía intravenosa es muy buena para obtener respuesta humoral, pero mala para respuesta celular.

En muchos casos, en la primera inoculación usando adyuvante completo de Freund la inyección intramuscular provee rápido acceso al sistema circulatorio linfático. Las inyecciones secundarias en presencia de adyuvante incompleto pueden administrarse por vía intramuscular o subcutánea. Esta última es ventajosa ya que el antígeno se absorbe lentamente, minimizando la posibilidad de choque anafiláctico (38,41).

### 3.3. Selección de las especies animales.

Los animales comúnmente usados en el laboratorio para la producción de anticuerpos son: conejos, cabras, cerdos, gallos, ratas, burros y caballos; los más usados con los conejos blancos Nueva Zelanda jóvenes, principalmente

cuando se requieren pequeñas cantidades de suero.

Si las preparaciones de anticuerpos se van a usar en estudios que requieren baja o mediana especificidad, se colectará el suero de un número de conejos inmunizados con la misma preparación. Si se requiere de alta especificidad en la preparación es recomendable usar animales grandes dado que el estudio completo puede necesitar preparaciones de anticuerpos bien caracterizados obtenidos, de preferencia, de una sola sangría de cosecha. (Esto se explica porque éstas preparaciones difieren de animal a animal y algunas ocasiones dentro del mismo animal en cierto periodo de tiempo).

Así, la obtención de sueros de alto título y alta afinidad para usarse en RIA puede depender, en cierto modo, de la suerte en elegir una cepa animal genéticamente capaz de producir anticuerpos de alta afinidad contra la región antigénica de interés. El título y afinidad del anticuerpo varían ampliamente de animal (38,41) a animal y generalmente solo un animal producirá un suero óptimo.

#### 3.4. Dosis:

La dosis del antígeno tiene una influencia importante sobre la respuesta en cuanto a la producción de anticuerpos. Después de aplicar la inyección inicial, un gran número de linfocitos son capaces de producir inmunoglobulinas que reconocen el sitio antigénico de interés, pero solo un pequeño número de estos linfocitos están destinados a producir anticuerpos de alta afinidad. Para obtener un suero de alta afinidad, éstas células deberán activarse selectivamente antes de replicarse. La replicación se inicia cuando una globulina receptora localizada sobre la superficie del linfocito se une al antígeno; esta globulina receptora tiene el mismo sitio de reconocimiento antigénico (y afinidad) que la globulina secretada por la clona de linfocitos. Una pequeña dosis de antígeno proveerá suficiente péptido para saturar las globulinas receptoras situadas en la superficie solo de aquellos linfocitos destinados a producir globulinas de alta afinidad. Con altas dosis de antígeno, las células de alta y baja afinidad tendrán suficientes receptores de superficie ocupados para activarse. Así, se recomienda usar una pequeña dosis de

antígeno en la primera inmunización. De modo igual si la primera dosis es pequeña para inducir títulos de anticuerpos detectables, puede disparar selectivamente la proliferación inicial de clonas de alta afinidad, las cuales -- responderán vigorosamente a la siguiente dosis de antígeno.

El intervalo de tiempo óptimo al cual se aplican las dosis de refuerzo depende de la dosis, ruta de administración y adyuvante empleado. Generalmente, la práctica consiste en dar dosis de refuerzo solo después de que el título ha alcanzado la cúspide de la curva y empieza a descender, usualmente a intervalos de 4 semanas.

Dosis demasiado bajas o demasiado altas no inducen ninguna reacción inmunitaria. La inyección de tales dosis más bien produce un animal refractario -- ante la inmunización posterior hecha con dosis normalmente inmunógenas: se ha provocado una parálisis inmunitaria, es decir, un estado de tolerancia frente a este antígeno (42).

### 3.5. Pureza de la preparación:

El grado de pureza del inmunógeno puede ser también una consideración -- importante. La administración concomitante de diversos antígenos puede disminuir la respuesta antigénica hacia el inmunógeno de interés. Esta "competencia antigénica" se conoce poco, pero posiblemente involucra un efecto supresor de células sobre células.

El adyuvante completo de Freund deberá usarse sólo si se dispone de antígenos muy purificados: si no se tiene en cuenta ésta condición, el organismo estimulado desencadenará una reacción inmunitaria inútil dirigida contra estas impurezas (41).

### 3.6. Parámetros del suero de importancia en el RIA:

La evaluación de un suero para usarse como reactivo en RIA en forma óptima involucra la determinación de tres características básicas: título, sensibilidad y especificidad.



El primer paso a seguir en la evaluación del suero obtenido de animales inmunizados es examinar la presencia de los anticuerpos. Incubando la hormona marcada con diferentes diluciones del suero que varían de 1:50 a 1:50 000, bajo condiciones similares a aquellas planeadas para el RIA se determina el título, que se define como la dilución del suero a la cual el 50% de la hormona marcada está unida al anticuerpo. Generalmente los sueros con títulos -- por debajo de 1:1000 son de valor limitado; tales sueros, también exhiben baja avidez. En orden de magnitud, el título de los sueros usados en RIA va -- rian de  $10^3$  a  $10^8$ , es decir, más altos que aquellos reportados para otras -- técnicas inmunológicas. El título es función del número de moléculas inmuno -- globulinas presentes, de su afinidad para el antígeno y de la actividad espe -- cífica del antígeno marcado.

Después de la determinación del título, la siguiente propiedad del sue -- ro a examinar es la sensibilidad. La sensibilidad es función de la afinidad -- y actividad específica del antígeno marcado. Una manera fácil de determinar -- la consiste en probar concentraciones suficientemente bajas de la solución -- patrón, así la sensibilidad corresponde al límite de detección, o sea la más -- baja concentración de la solución patrón que está significativamente por en -- cima del patrón "cero", lo cual puede determinarse estadísticamente.

El título y la sensibilidad están influenciados por las condiciones ba -- jo las cuales se realiza el ensayo, si suponemos que un pequeño péptido sin -- tético se usa como antígeno y que el suero contiene solo anticuerpos dirigi -- dos contra un solo sitio antigénico del péptido. A pesar de la aparente sim -- plicidad de este sistema, estos anticuerpos son el producto de un gran núme -- ro de clones de linfocitos, cada una con su propia afinidad para el antígeno. La afinidad y el título del suero de cierto animal, tienden a variar indepen -- dientemente con el tiempo.

El primer paso en el procedimiento común para conocer la especificidad, -- consiste en medir la capacidad de sustancias naturales relacionadas con la -- hormona, de homología conocida, para desplazar al antígeno marcado en su -- unión con el anticuerpo. Si se presenta desplazamiento, el grado de reactivi -- dad cruzada se expresa generalmente como la razón entre la concentración de -- la sustancia que presente reactividad cruzada que produce 50% de unión de la

hormona marcada. Así, se probará la reactividad cruzada de formas moleculares naturales, precursores y fragmentos del antígeno principal.

Ya que los anticuerpos que participan en la unión al antígeno marcado generalmente se comportan como si se originaron de una sola clona, también se puede decir que el suero de un RIA es específico, a condición de que el antígeno marcado sea homogéneo.

## I I. O B J E T I V O S

## II. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es obtener los reactivos para la determinación de angiotensina I humana por radioinmunoanálisis, sustituyendo así el estuche comercial que es de importación. De esta forma se pretende contribuir a la autosuficiencia tecnológica de nuestro país, fundamental en las condiciones económicas actuales.

Para lograr tal objetivo, se desarrollaron las siguientes metodologías, las cuales constituyen los objetivos intermedios:

1. Obtención de un anticuerpo anti-angiotensina I que reúna los requisitos de los sueros empleados en RIA: Alto título y un alto grado de especificidad y sensibilidad.
2. Preparación del antígeno marcado radiactivamente, incorporando  $^{125}\text{I}$  a la molécula de angiotensina I.
3. Obtención de las soluciones patrón de angiotensina I.
4. Preparación de otras soluciones requeridas como amortiguadores e inhibidores.
5. Selección del mejor método adaptable a las condiciones de laboratorio para obtener y almacenar tales reactivos.
6. Probar, mediante la determinación de la actividad plasmática de renina en sueros de pacientes, que los resultados obtenidos con los reactivos del estuche comercial son estadísticamente equivalentes a los obtenidos con los reactivos producidos en el laboratorio.

### III. MATERIALES Y METODOS

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 1. MATERIALES

##### 1.1. Material de vidriería.

El material de vidriería se usó después de lavarlo y enjuagarlo -- exhaustivamente con agua bidestilada. Para el sangrado de los conejos se usa ron tubos siliconizados con Sigmacote<sup>R</sup> al 1% en solución acuosa.

##### 1.2. Material biológico.

En este trabajo se usaron siete conejos jóvenes Nueva Zelanda de - 1.5 Kg.

##### 1.3. Equipo.

- Agitador magnético Corning PC-353.
- balanza analítica Mettler tipo H-15.
- baño de agua a 37°C Precision GCA Corporation.
- centrifuga refrigerada IEC PR-6000.
- columna de vidrio para cromatografía LKB 2137.
- colector de fracciones para cromatografía LKB Redirac 2112.
- contador de radiaciones gamma Gammacord II (AMES).
- congelador Revco (-80°C).
- liofilizadoras Virtis (Gardiner, N.Y.) y Labconco Freeze Dryer 8.
- potenciómetro Orio Research 201.
- rasuradora eléctrica Oster modelo 22.
- Vortex de Scientific Products S8 220.

## 1.4. Reactivos.

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.):

- aceite de cacahuete.
- ácido maleico (PM-116.1).
- adyuvante completo de Freund (ACF).
- adyuvante incompleto de Freund (AIF).
- albúmina sérica bovina fracción V (PM=70,000).
- albúmina de huevo grado V (PM=40,000).
- albúmina sérica bovina grado RIA.
- angiotensina I, sal de acetato, secuencia humana, sintética (PM=1296).
- des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I, sal de acetato (PM=1181.4).
- Val<sup>5</sup>-angiotensina I, sintética (PM=1282.5).
- angiotensina II, secuencia humana, sal de acetato (PM=1046).
- Val<sup>5</sup>-angiotensina II, sal de acetato (PM=1032.2).
- angiotensina III (des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina II), sal de acetato (PM=931.1).
- angiotensinógeno de plasma porcino.
- azida de sodio (PM=65).
- carbón activado, cloramina T (N-cloro-p-toluénsulfonamida, - sal sódica).
- cloruro de 1-etil 3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (PM=191.7).
- cloruro de hidroxilamina (PM=69.5).
- DEAE-Sephadex A 25, intercambiador aniónico, tamaño de perla 40-120.
- dextrán, grado clínico (PM=70,000).
- 2,3 dimercaptopropanol (Dimercaprol, BAL), PM=124.2.
- hemocianina de lapas de ojo de cerradura (PM=6 500 000).
- sulfato de 8 hidroxiquinolina (PM=194.2).
- metabisulfito de sodio.
- Sigmacote.
- Trizma base, tris (hidroximetil) aminometano (PM=121).
- cloruro de tris (hidroximetil) amino metano (PM=157.6).
- tiroglobulina tipo II porcina (PM=650 000).

### 1.5. Soluciones.

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas en agua destilada y desionizada, referida simplemente como agua.

Para la obtención y caracterización de los anticuerpos se prepararon soluciones "stock" de 0.1 mg/ml en amortiguador Tris acetatos 0.1 M, pH 7.4 y albúmina sérica bovina al 5% de los siguientes compuestos:

- des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina.
- val<sup>5</sup>-angiotensina II.
- val<sup>5</sup>-angiotensina I.
- angiotensina II.
- angiotensina III.

También se preparó una solución de 110  $\mu$ g/ml de angiotensinógeno. Las siguientes soluciones se prepararon en agua:

- Tris-acetato 0.1 M, pH 7.4
- solución de 3.5 mg/ml de cloruro de 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
- cloruro de hidroxilamina 0.05 M.

En la preparación del antígeno marcado radiactivamente se preparó: amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.4,

- amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.6.
- solución de angiotensina I de 5.0 mg/10 ml de agua.
- solución acuosa de albúmina sérica bovina al 0.1%.
- albúmina sérica bovina al 5.0% en amortiguador Tris-acetatos pH 7.4, 0.1 M.
- solución de cloramina T de 4 mg/10 ml en amortiguador de fosfatos.
- Na<sup>125</sup>I en solución de NaOH (pH 7-11, 100 mCi/ml).
- solución de 4 mg/10 ml de metabisulfito de sodio en amortiguador de fosfatos.



Fueron de J.T. Baker:

- alcohol etílico.
- cloruro de sodio.
- fosfato diácido de potasio (PM=136.9).
- fosfato dibásico de potasio (PM=174.18) y
- xilol.

El éter fue adquirido de Proquimed. El estuche comercial para el RIA de angiotensina I fue de New England Nuclear, NEA-026 (RIANEN <sup>TM</sup>) y consta de los siguientes reactivos:

1. Dos frascos de suero anti-angiotensina I de conejo, 2 ml. Se diluyó a 250 ml con amortiguador Tris-acetatos 0.1 M, pH 7.4.
2. Dos frascos de angiotensina I-<sup>125</sup>I, 0.5 ml cada uno. Se diluyó una parte con 50 partes de amortiguador Tris-acetatos 0.1 M, pH 7.4.
3. Un juego de soluciones patrón de angiotensina I, 7 frascos liofilizados.- Se reconstituyeron con 2 ml de agua destilada fría, las soluciones resultantes contienen 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 ng de angiotensina I/ml en amortiguador Tris-acetatos 0.1 M, pH 7.4 y albúmina sérica bovina al 5.0%.
4. Un frasco con amortiguador Tris-acetatos concentrado 2 M, 25 ml. Se diluyó con agua destilada a 500 ml. La solución final tiene una concentración de 0.1 M.
5. Un frasco con suspensión de carbón, 25 ml. Se diluyó a 500 ml con agua — destilada fría. La suspensión final contiene carbón al 0.6%, dextrán al 0.0625% y azida de sodio al 0.005%.
6. Un frasco con amortiguador de maleatos concentrado, 25 ml. Se diluyó a — 250 ml y antes de aforar se ajustó el pH a 6.0 con hidróxido de sodio — 5 N. La solución diluida tiene una concentración de ácido maleico 0.2 M.
7. Un frasco con dimercaprol, 1.0 ml. Solución al 1.7% en aceite de cacahuate y benzoato de bencilo al 3.3%.
8. Un frasco con sulfato de 8 hidroxiquinolina, 1 ml. Solución acuosa al — 6.6%.

## 2. METODOS.

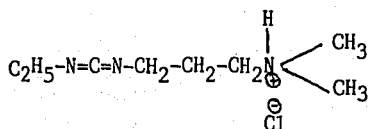
### 2.1. Obtención y caracterización de los anticuerpos.

#### 2.1.1. Síntesis del antígeno.

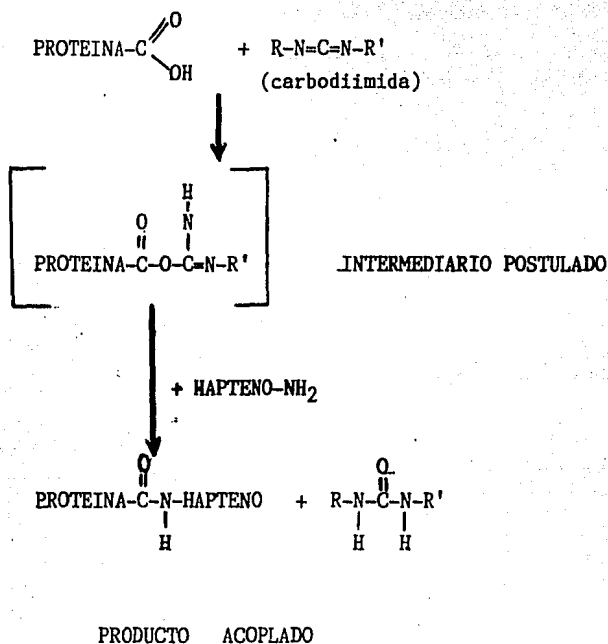
Ya que el bajo peso molecular de la angiotensina I (1296 d) es una característica que no le confiere la capacidad de inmunogenicidad, la formación de anticuerpos anti-angiotensina I puede estimularse inyectando un conjugado antigénico conteniendo esta pequeña molécula acoplada a proteínas de peso molecular elevado, es decir usando el concepto de hapteno. En el presente trabajo las proteínas empleadas para tal fin fueron las siguientes:

Proteína	PM (d)
Albúmina de huevo	40 000
Albúmina sérica bovina	70 000
Tiroglobulina	650 000
Hemocianina	6 500 000

El procedimiento de conjugación consiste en hacer reaccionar tanto a la proteína como al hapteno con una molécula que forma parte de una familia de compuestos químicos orgánicos comúnmente denominados carbodiimidas solubles en agua y muy usadas actualmente para sintetizar conjugados inmunogénicos de proteínas y otros polipéptidos pequeños biológicamente activos. En este caso se utilizó el cloruro de EDC que tiene la siguiente fórmula química:



La reacción que se efectúa es la siguiente (43):



En la reacción se adiciona hidroxilamina en solución para evitar un posible rearrreglo de la tirosina en presencia de carbodiimida, ya que ésta última puede alterar el anillo aromático de la tirosina, para formar O-aril-isourea o N-aril-isourea. (44)

#### Método:

Es importante que todas las soluciones sean de reciente preparación. - En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 ml de una solución que contiene 1 mg/ml de angiotensina I seguido de la adición de 2.5 mg de la proteína correspondiente y 1 ml de agua destilada. Se agitó suavemente hasta su completa disolución. A ésta mezcla se adicionaron 0.5 ml de una solución acuosa de EDC (3.5 mg/ml) y se dejó reposar 18 horas a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo se agregaron 2 ml de una solución de cloruro de hidroxil-

lamina 0.05 M al tubo de reacción. Se dejó reposar la mezcla 5 horas más a temperatura ambiente. De esta manera el antígeno ha sido acoplado a la proteína acarreadora.

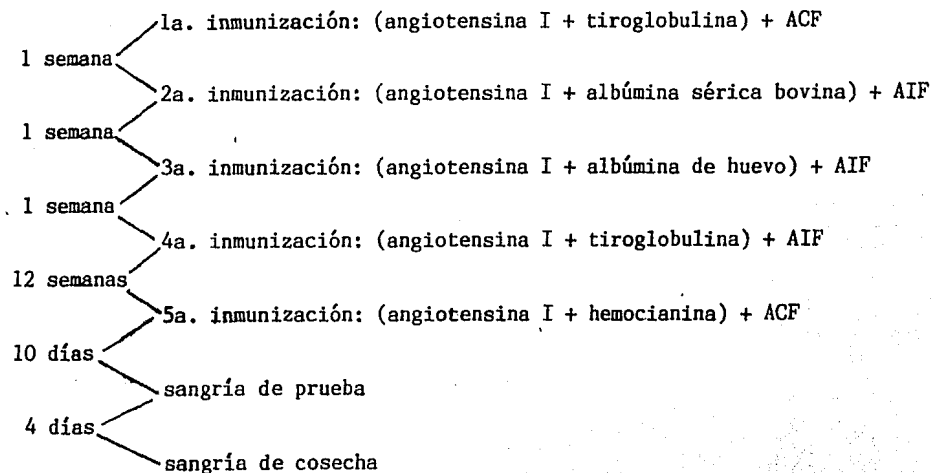
### 2.1.2. Inmunización

El conjugado antigénico (4 ml) se emulsionó con un volumen igual de -- ACF o AIF según corresponda con el esquema de inmunización. Para tal fin se utilizó una jeringa de 10 ml con aguja del número 21 succionando el conjugado y el adyuvante, la completa emulsificación se obtuvo después de varios - pases sucesivos a través de la aguja de la jeringa. Una vez formada una emulsión lechosa y homogénea se consideró lista para inyectarse a los animales.

Los animales seleccionados para la inmunización fueron siete conejos - jóvenes Nueva Zelanda. Antes de inyectarlos se les cortó el pelo del lomo - empleando una rasuradora eléctrica a fin de facilitar la localización del - sitio de inoculación. Las inyecciones se empezaron a aplicar desde la parte cercana al cuello. Se realizó la asepsia de la zona con etanol al 70%, se - inyectó un ml de la emulsión a cada conejo, distribuyéndolo en múltiples si - tios (aproximadamente 6 a 8) por vía subcutánea, observando la formación de una pápula. La dosis por conejo fue aproximadamente de 625  $\mu$ g de angioten- sina I. Los conejos se numeraron en sus jaulas, los marcados del número 1 - al 6 se inmunizaron y el número 7 no se inmunizó, es decir sirvió como con- trol.

### 2.1.3. Esquema de inmunización.

La técnica seguida en el esquema de inmunización es una adaptación del método descrito por Moore y Lutterod (45) para la producción de anticuerpos para vasopresina.



### 2.1.4. Sangría de prueba.

Para estimar el título de anticuerpos circulantes en el suero de los conejos inmunizados se tomaron muestras de sangre de la arteria de la oreja. La sangre extraída, aproximadamente 5 ml, se colectó en tubos de centrifuga sili conizados (para evitar al máximo la hemólisis) y sin anticoagulante, quitando la aguja de la jeringa, se transfirió el contenido de la misma en el tubo regalando lentamente por las paredes. Se dejaron reposar las muestras a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo, con un aplicador se separó el coágulo de las paredes del tubo, logrando así una mejor retracción del mismo. Se procedió a centrifugar las muestras durante 20 min a 2000 rpm a 4°C. Se separó el suero. A estas muestras se les determinó el título de anticuerpos, como se indica en la sección 2.3.

### 2.1.5. Determinación del título de anticuerpos en el suero.

Las determinaciones del título de anticuerpos en el suero de los siete conejos se realizaron por el método de RIA para angiotensina I. Las diluciones del suero se hicieron con amortiguador Tris-acetato 0.1 M, pH 7.4 probándose diluciones seriadas que comprendieron  $1:10^1$ ,  $1:10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^4$ , --  $1:10^6$ . Las incubaciones se realizaron en tubos por triplicado de acuerdo al protocolo de la Tabla I.

De los resultados obtenidos se trazó una gráfica colocando el porcentaje de cuentas totales unidas en el eje de las ordenadas y el recíproco de la dilución del suero en el eje de las abscisas. La dilución que corresponde al -- 50% de unión de las cuentas totales indica el título del suero y es la dilución que se empleó en los experimentos siguientes:

### 2.1.6. Sangría de cosecha.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la sangría de prueba, se sangraron los conejos marcados con los números 2,4 y 5, que son los que tuvieron el mayor título de anticuerpos, así como el conejo control. La sangría se realizó por punción cardiaca. Para tal efecto se colocó al animal en la caja de contención, se le anestesió por inhalación con éter hasta llegar al plano quirúrgico de la anestesia; entonces se colocó al animal en posición dorso-ventral en una caja de sujeción. En seguida se localizó al corazón, se rasuró la zona y se introdujo la aguja lentamente hasta observar el flujo de sangre a la jeringa. Entonces se empezó a succionar suave y gradualmente con el émbolo hasta que ya no se obtuvo más sangre. La sangre obtenida se transfirió a tubos de centrifuga de 50 ml. Estas muestras se dejaron reposar, se desprendió el coágulo adherido a las paredes y se centrifugó a 2400 rpm, 20 min a  $-4^{\circ}\text{C}$ . El suero se separó y se midieron los volúmenes de suero obtenido de cada conejo.

### 2.1.7. Almacenamiento de los sueros.

El volumen de suero obtenido se repartió en alícuotas de 0.5 ó 1 ml. La mitad del volumen de suero obtenido de cada conejo se almacenó congelado a --

TABLA I . PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS POR RIA.

TUBO	AMORTIGUADOR	ASB 5%	$^{125}\text{I}$ -ANGIO I ( 6000 cpm )	VOLUMEN DE LA DILUCION		CARBON	
CUENTAS TOTALES	1.5	-	0.05	-	AGITAR EN VORTEX INCUBAR 18 H 4°C	-	CENTRIFUGAR MEDIR LA RADIOACTIVIDAD EN UN CONTADOR GAMMA.
BLANCO	0.5	0.1	0.05	-		1.0	
DILUCION 1:10	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
DILUCION 1:100	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
DILUCION 1:1000	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
DILUCION 1:10,000	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
DILUCION 1:50,000	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
DILUCION 1:100,000	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
DILUCION 1:1 000 000	-	0.1	0.05	0.5		1.0	

TODOS LOS VOLUMENES ESTAN EXPRESADOS EN MILILITROS

-80°C y la otra mitad se liofilizó. Las alícuotas para congelar se colocaron en tubos eppendorf a -80°C, previamente etiquetados con la fecha y número del conejo. Las alícuotas a liofilizar se colocaron en frascos de 10 ml con tapón de plástico. Del suero de cada conejo se tomó una alícuota congelada y otra liofilizada y se les determinó el título de anticuerpos.

#### 2.1.8. Determinación del título de anticuerpos en los sueros congelados y liofilizados.

Siguiendo la misma metodología empleada en el ensayo 2.1.4 se determinó el título de anticuerpos a una alícuota de suero congelado y a otra liofilizada de los conejos 2, 4 y 5.

El suero congelado se descongeló lentamente y el liofilizado se reconstituyó con amortiguador Tris-acetato pH 7.4, 0.1 M hasta su volumen original haciéndose las siguientes diluciones en el mismo amortiguador.

Conejo 2:  $1:10^2$ ,  $1:5 \times 10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:2.5 \times 10^3$ ,  $1:5 \times 10^3$ ,  $1:7.5 \times 10^3$ ,  $1:10^4$  y - -  $1:5 \times 10^4$ .

Conejo 4:  $1:10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^4$ ,  $1:2.5 \times 10^4$ ,  $1:5 \times 10^4$ ,  $1:7.5 \times 10^4$ .

Conejo 5:  $1:10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^5$ ,  $1:2.5 \times 10^5$ ,  $1:5 \times 10^5$ ,  $1:7.5 \times 10^5$  y  $1:10^6$

#### 2.2. Obtención y caracterización del antígeno marcado radiactivamente.

##### 2.2.1. Marcaje radiactivo de angiotensina I.

La técnica para marcar radiactivamente angiotensina I con  $^{125}\text{I}$  se derivó del método de la cloramina T descrito por Greenwood y Hunter (49) para marcar la hormona de crecimiento, adaptado por Nielsen y cols. (50) para angiotensina I.

##### Fundamento

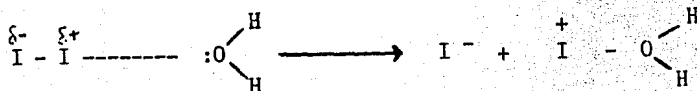
El procedimiento empleado depende del residuo de aminoácido que se va a marcar. Así este método involucra marcaje directo por una sustitución de iones hidrógeno, principalmente en el anillo aromático de la tirosina por yodo radiactivo. La tirosina se marca preferentemente con respecto a la histidina -- cuando ambas están presentes en el péptido, principalmente a pH mayor de 7.5, esto es, bajo condiciones en las cuales la tirosina está cargada negativamente



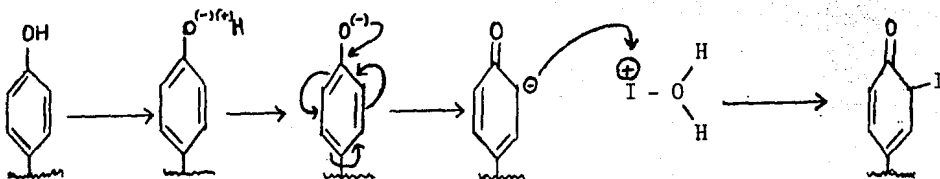
Para introducir yodo radiactivo en residuos de tirosina, el isótopo radiactivo debe convertirse de yoduro a yodo, lo cual se logra mediante el uso de agentes oxidantes siendo el más empleado la cloramina T cuya estructura se muestra a continuación:



Entonces, el yodo se polariza por su interacción con el oxígeno del agua:



Las moléculas de yodo cargadas positivamente son electrófilos, los cuales atacan a la tirosina en el carbono orto al oxígeno cargado negativamente:



La adición de un agente reductor como el metabisulfito de sodio detiene la acción oxidante de la cloramina T.

El pH de la mezcla de reacción debe ser ligeramente alcalino para ionizar parcialmente la tirosina.

#### Método

La reacción para marcar radiactivamente la molécula de angiotensina I con yodo-125 se llevó a cabo a temperatura ambiente, tras una cortina de plomo, colocando el tubo de reacción dentro de un recipiente de plomo y observando las manipulaciones a través de un espejo para evitar radiaciones sobre el cuerpo humano.

En un tubo de ensayo se colocaron 0.15 ml de amortiguador de fosfatos -- 0.5 M, pH 7.4 y 0.003 ml de la solución de yoduro de sodio radiactivo (aproximadamente 200  $\mu\text{Ci}$ ) seguidos por 0.02 ml de solución de angiotensina I (5mg/10 ml de agua) y 0.025 ml de la solución de cloramina T (4 mg/10 ml de amortiguador). La mezcla se agitó durante 20 segundos en Vortex y se dejó reposar 1 minuto agregándose al final 0.025 ml de solución de metabisulfito de sodio (4 mg/10 ml de amortiguador) y después de 20 segundos la mezcla de reacción se diluyó con 1 ml de agua destilada. La solución se transfirió a una columna de cromatografía de intercambio iónico.

El volumen de la solución de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  que se adicionó varía dependiendo del tiempo transcurrido entre la fecha de marcaje y la fecha de uso. Con esta información de consulta la tabla de decaimiento del  $^{125}\text{I}$  (vida media = 60 días). Lo importante es que el volumen contenga 200  $\mu\text{Ci}$ . Así, partiendo de una solución que contiene 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , después de 38 días se observa en las tablas de decaimiento de  $^{125}\text{I}$  el factor de 0.645, por lo tanto en la solución original ya no se tienen 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , sino que 64.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , lo que significa que si se requieren 200  $\mu\text{Ci}$ , éstos están contenidos en 3.1  $\mu\text{l}$  de la solución en vez de 2  $\mu\text{l}$  de la solución original.

### 2.2.2. Separación de $^{125}\text{I}$ -angiotensina de la mezcla de reacción.

La separación de  $^{125}\text{I}$ -angiotensina I de la mezcla de reacción se llevó a cabo por medio de la técnica de cromatografía de intercambio iónico usando -- DEAE Sephadex A-25 como intercambiador y una columna para cromatografía con las siguientes características:

longitud	65	cm
diámetro	1.6	cm
superficie transversal	2.6	$\text{cm}^2$
longitud del lecho	50	cm
volumen del lecho	130	ml

El pH empleado para hinchar el intercambiador iónico fue el mismo que se empleó para eluir la muestra, en este caso de 8.6. El hinchamiento completo -- tomó de 1-2 días a temperatura ambiente o 2 horas en un baño de agua hirviendo. La cantidad de DEAE-Sephadex para preparar el volumen deseado se calculó -- tomando en cuenta que rinde de 5-9 ml/g, añadiéndose después amortiguador -- Tris-HCl 0.1 M pH 8.6 en exceso. El amortiguador debe contener el mismo ión -- presente originalmente en el intercambiador que es el ión cloruro. Durante el hinchamiento se removió varias veces el sobrenadante cambiándolo por amortiguador fresco y al finalizar se lavó exhaustivamente el intercambiador por medio de un embudo Buchner con un volumen aproximado de 500 ml del mismo amortiguador. Se procedió a llenar la columna introduciendo el gel, resbalando por las paredes y evitando la formación de burbujas hasta una altura de 50 cm seguido por la adición de amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 8.6 hasta que quedó bien compacta cuidando de que en todo momento existiera amortiguador en contacto con el gel. Se midió el flujo el cual resultó ser de 0.75 ml por  $\text{cm}^2$  por minuto. --

Una vez comprobado que la columna y el resto del sistema funcionaron adecuadamente se efectuó la reacción para marcar radiactivamente la angiotensina I. - Antes de aplicar la mezcla a la columna se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l que sirvió como referencia de la radiactividad total aplicada a la columna. Se aplicó la mezcla de reacción que comenzó a eluirse con amortiguador Tris-HCl - - 0.1 M, pH 8.0, colectándose fracciones de 3 ml, de cada una de las cuales se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ l para medir la radiactividad presente en ellas. Estas fracciones se midieron en el contador gamma para monitorear la elución de las fracciones radiactivas y saber en qué momento se detendría el proceso.

El  $^{125}\text{I}$  libre quedó unido a la columna y posteriormente se eluyó aumentando la fuerza iónica del amortiguador.

### 2.2.3. Propiedades inmunológicas del antígeno marcado.

Las propiedades inmunológicas de  $^{125}\text{I}$  angiotensina I se evaluaron por medio de curvas patrón que muestran el desplazamiento del péptido marcado por - cantidades crecientes de angiotensina I no radiactiva. Se compararon varias - fracciones usando el suero del conejo 5 como fuente de anticuerpo para ésta - prueba. A cada tubo de ensayo se adicionaron 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$  angiotensina I con - teniendo aproximadamente 6000 cpm.

### 2.2.4. Almacenamiento del antígeno marcado.

Del principal pico radiactivo las fracciones que contienen las cantidades más altas de radiactividad se almacenaron congeladas en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se adicionó albúmina sérica bovina al 1%. Para cada ensayo se diluyeron con amortiguador Tris-acetato 0.1 M, pH 7.4.

### 2.3. Método para determinar angiotensina I por RIA.

Las pruebas para caracterizar los reactivos producidos en el laboratorio se realizaron por la técnica de RIA para angiotensina I basado en el método de Haber y cols. (46).

#### a) Explicación del ensayo:

La medición indirecta de la enzima renina fue llevada a cabo inicialmente mediante la estimación de angiotensina II generada por bioensayo, - usando mediciones de presión sanguínea (47) y después por métodos de RIA. -

En 1965, Haber y cols, subrayaron el significado fisiológico y patofisiológico de las mediciones de renina y descubrieron las ventajas de un procedimiento de RIA para la estimación directa del producto primario de la actividad de renina: angiotensina I. Bajo las condiciones de este ensayo se ve favorecida la acumulación de angiotensina I, ya que se permite a la renina endógena reaccionar con su sustrato en presencia de reactivos que inhiben tanto a la enzima convertidora de angiotensina I como a las angiotensinasas. El estuche comercial está basado en una adaptación de éste método. Las condiciones del ensayo han sido diseñadas para favorecer la generación de angiotensina I en un sistema amortiguado dentro de su pH óptimo: 5.5 a 6.0 en presencia de inhibidores adecuados.

b) Principio del método.

Skeggs y cols. (48) demostraron que el metabolito primario de la actividad de la renina es la angiotensina I la cual se rompe para producir angiotensina II bajo la acción de la enzima convertidora de angiotensina I (las rutas del metabolismo de este sistema se han descrito en el capítulo 1).

Si se toman precauciones específicas para bloquear la enzima convertidora y las angiotensinasas normalmente presentes en plasma, la acumulación de angiotensina I bajo condiciones controladas refleja la actividad enzimática de renina. La inhibición de la actividad de la enzima convertidora y angiotensinasas durante la generación de angiotensina I se lleva a cabo por el uso de EDTA, Dimercaprol y 8-OH-quinolina.

Un gran número de investigadores han demostrado que la máxima actividad de renina para el sistema renina-sustrato en plasma humano ocurre a pH 5.5 a 6.0, mientras que una marcada disminución de la actividad se observa a niveles de pH más elevados. Debido a que la reacción se lleva a cabo en condiciones óptimas el tiempo de generación de angiotensina I es de 1 hora.

La cantidad de angiotensina I generada se mide por RIA, la separación de antígeno libre y unido se lleva a cabo por absorción diferencial del material libre sobre carbón activado. La concentración del antígeno unido al anticuerpo se determina por conteo en un contador de radiaciones gamma. La relación B/F se expresa mediante una curva patrón de angiotensina I, de la cual los valores de las muestras desconocidas se obtienen por interpolación. La actividad plasmática de renina (APR) se expresa como ng de angiotensina I generada/ml/hora de incubación a 37°C.

c) Colección de las muestras.

No se requiere preparación especial del paciente, pero debe conocerse su estado fisiológico exacto para una interpretación adecuada de los resultados. La sangre debe vaciarse en un tubo que contenga EDTA a una concentración final de 1 mg/ml de sangre. Las muestras de sangre se mantienen en un baño de hielo antes de separar el plasma mediante una centrifuga refrigerada a 4°C por 15 min a 2 400 rpm. El plasma claro se coloca entonces a 4°C, si la determinación se va a realizar inmediatamente o se guarda en congelación a -20°C.

Es necesario adoptar ciertas precauciones si el paciente ha recibido -- agentes de diagnóstico radiactivos, los cuales pueden ser emisores gamma, tales como el  $^{99m}\text{Tc}$ . En estas condiciones el nivel de angiotensina I puede sobrestimarse.

d) Generación de angiotensina I.

- 1) Las muestras de plasma congelado se descongelaron lentamente en un baño de agua a 4°C.
- 2) Se adicionó 1 ml de cada muestra del plasma en tubos de ensayo colocados en un baño a 4°C. Se adicionaron 10  $\mu$ l de la solución de dimercaprol y 10  $\mu$ l de la solución de 8 OH quinolina a cada tubo.
- 3) Se adicionaron 2 ml de amortiguador de maleatos 0.2 M, pH 6.0 a cada tubo mezclando vigorosamente.
- 4) Se transfirió 1 ml del contenido de cada tubo a otros tubos marcados similarmente. Estas alícuotas se incubaron 1 hora a 37°C, mientras que el remanente se mantuvo a 4°C por el mismo período de tiempo.
- 5) Al final de período de incubación las muestras incubadas a 37°C se colocaron a 4°C en el baño de hielo junto con su control de 4°C y se procedió a medir la angiotensina I por RIA.

e) Protocolo del RIA.

1. Todos los tubos de ensayo numerados y los reactivos se mantuvieron en un baño de hielo a 4°C, durante la adición de los reactivos. (ver tabla II).

TABLA II PROTOCOLO PARA EL RIA DE ANGIOTENSINA I

TUBO	AMORTIGUADOR	ASB 5%	PATRONES	MUESTRA	$^{125}\text{I}$ -ANGIO I ( 6000 cpm )	ANTICUERPO		CARBON	
CUENTAS TOTALES	1.5	-	-	-	0.05	-	AGITAR INCUBAR 18 H 4°C	-	CENTRIFUGAR MEDIR LA RADIA- TIVIDAD EN UN CONTADOR GAMMA
BLANCO	0.5	0.1	-	-	0.05	-		1.0	
PATRON "0"	-	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
PATRONES	-	-	0.1	-	0.05	0.5		1.0	
MUESTRA 37°C	-	-	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
MUESTRA 4°C	-	-	-	0.1	0.05	0.5		1.0	

TODOS LOS VOLUMENES ESTAN EXPRESADOS EN MILILITROS.

2. Se numeró una serie de 16 tubos para cada curva patrón y 4 tubos por cada muestra, en los tubos correspondientes se adicionaron los siguientes reactivos: 500  $\mu$ l de amortiguador Tris-acetato 0.1 M, pH 7.4 para los tubos blanco; 100  $\mu$ l de albúmina sérica bovina al 5% en los tubos blanco y en el patrón "0"; 100  $\mu$ l de cada solución patrón, 100  $\mu$ l de cada muestra (2 tubos para las muestras incubadas a 37°C y dos para las de 4°C); 100  $\mu$ l de la solución de angiotensina I-<sup>125</sup>I a todos los tubos;— 500  $\mu$ l de la solución de anticuerpo en todos los tubos excepto en los tubos blanco.
3. Todos los tubos se agitaron en Vortex durante 2 a 5 segundos y se incubaron a 4°C durante 18 a 24 horas.
4. Antes de completar el período de incubación la suspensión de carbón diluida al 0.6% se colocó en agitación.
5. Al finalizar el período de incubación todas las muestras se colocaron nuevamente en un baño a 4°C y se adicionó 1 ml de la suspensión de carbón a cada tubo. La suspensión de carbón se mantuvo en agitación durante la transferencia.
6. Todos los tubos se agitaron en vortex y se centrifugaron a 4°C a 2400 rpm durante 15-20 minutos.
7. La fracción sobrenadante de cada tubo se decantó en tubos de ensayo numerados en la misma forma y se contó la radiactividad contenida en ellos. La angiotensina I unida al anticuerpo permanece en el sobrenadante y la angiotensina I libre se adsorbe sobre el carbón.
8. Los sobrenadantes de los tubos se contaron usando un contador de centelleo gamma.

f) Cálculo de resultados.

Después de que se completó el conteo, se determinó la concentración de angiotensina I generada interpolando el resultado en la curva patrón.

1. Se promediaron las cuentas por minuto para los duplicados.
2. Se calcularon las cuentas netas promedio para los patrones y las muestras restando el promedio de cuentas del blanco.
3. Se calculó el porcentaje de unión B/Bo para cada muestra.
4. Usando papel semilogarítmico o bien papel logit-log se trazó la curva patrón y se determinó la concentración de angiotensina I para cada muestra.

tra interpolando en la gráfica correspondiente.

5. Se multiplicó por tres (dilución de la muestra con el amortiguador) para obtener las unidades de ng/ml/h para las muestras incubadas tanto a 4 - como a 37°C y se corrigió si se hizo alguna dilución usando el factor - correspondiente.
6. La APR se expresa como ng de angiotensina I/ml/h. Para calcularla se -- resta el valor a 4°C del valor a 37°C.

#### 2.4. Pruebas de especificidad.

Para examinar la especificidad del anticuerpo de los conejos 2,4 y 5 y - el comercial se determinó la reactividad cruzada con los siguientes análogos- de angiotensina I:

ANGIOTENSINA I:	H-ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-FEN-HIS-LEU-OH
ANGIOTENSINA II:	H-ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-FEN-OH
ANGIOTENSINA III:	H-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-FEN-OH
Val <sup>5</sup> -ANGIOTENSINA I:	H-ASP-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-FEN-HIS-LEU-OH
Desp- Asp <sup>1</sup> -ANGIOTENSINA I:	H-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-FEN-HIS-LEU-OH
Val <sup>5</sup> -ANGIOTENSINA II:	H-ASP-ARG-VAL-TIR-VAL-ILE-PRO-FEN-OH
ANGIOTENSINOGENO:	H-ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-FEN-HIS-LEU-LEU- -VAL-TIR-SER-R

De cada uno de los análogos se preparó una solución "stock" y a partir de esta se hicieron las diluciones necesarias hasta obtener 1000, 500, 100, 50, 10 y 5 ng/ml de análogo. Las diluciones se hicieron en amortiguador - - Tris-acetato 0.1 M. pH 7.4 con ASB al 5% y azida de sodio al 1 %. Cada suero se diluyó con al amortiguador Tris acetatos 0.1 M, pH 7.4; de acuerdo al título encontrado. El suero del conejo 2, 1:10<sup>3</sup>, del conejo 4: 1:2X10<sup>4</sup> y el del conejo 5: 1:8X10<sup>4</sup>. El protocolo usado para determinar la especificidad- está resumido en la Tabla III.



TABLA III: PROTOCOLO PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POR RIA DE ANGIOTENSINA I

TUBO	PATRONES Y ANALOGOS DE ANGIOTENSINA I	AMORTIGUADOR	ASB 5%	<sup>125</sup> I-ANGIO I ( 6000 :opm )	ANTICUERPO		CARBON	
CUENTAS TOTALES	-	1.5	-	0.05	-		-	
BLANCO	-	0.5	0.1	0.05	-		1.0	
PATRON "0"	-	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
PATRONES DE ANGIO I (ng/ml)								
0.1	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.25	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.5	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
1.0	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
2.5	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
5.0	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
ANALOGOS DE ANGIO I (ng/ml)								
5	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
10	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
50	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
100	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
500	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
1000	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	

AGITAR EN VORTEX  
INCUBAR 18 H 4°C

CENTRIFUGAR  
MEDIR LA RADIOACTIVIDAD  
EN UN CONTADOR GAMMA

TODOS LOS VOLUMENES ESTÁN EXPRESADOS EN MILILITROS.

TABLA IV. PROTOCOLO PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE LOS ANTICUERPOS CONTRA ANGIOTENSINA I POR RIA.

TUBO	ANGIOTENSINA I	AMORTIGUADOR	ASB 5%	$^{125}\text{I}$ -ANGIO I	ANTICUERPO		CARBON	
CUENTAS TOTALES	-	1,5	-	0.05	-		-	
BLANCO	-	0.5	0.1	0.05	-		1.0	
PATRON 0	-	-	0.1	0.05	0.5		1.0	
ANGIOTENSINA I (ng/ml)								
5.000	0.1	-	-	0.05	0.5	AGITAR EN VORTEX INCUBAR 18 H 4°C	1.0	CENTRIFUGAR MEDIR LA RADIATIVIDAD EN UN CONTADOR GAMMA
2.500	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
1.000	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.500	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.250	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.100	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.062	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.050	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.040	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.031	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.025	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	
0.015	0.1	-	-	0.05	0.5		1.0	

TODOS LOS VOLUMENES ESTAN EXPRESADOS EN MILILITROS.

## 2.5. Pruebas de sensibilidad.

Para determinar la sensibilidad de los anticuerpos de los conejos 2,4 y 5, se probaron concentraciones de angiotensina I menores de 0.1 ng/ml. La sensibilidad es el límite inferior de detección del anticuerpo y se define como la cantidad más pequeña de angiotensina I que produce una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de cuentas totales unidas en ausencia de angiotensina I. Las diluciones de angiotensina I se hicieron en amortiguador de Tris-acetatos 0.1 M, pH 7.4 con ASB Al 5%. El protocolo de las pruebas de sensibilidad se resume en la Tabla IV.

## 2.6. Preparación de las soluciones patrón de angiotensina I.

Las soluciones patrón de angiotensina I se obtuvieron frescas a partir de un "stock" congelado de acuerdo al método de Sealey (51). Debido a que la angiotensina I sufre pérdida de actividad cuando permanece cierto tiempo en solución diluida, diariamente se prepararon las soluciones patrón a partir de una solución concentrada de 10  $\mu\text{g/ml}$  empleando como diluyente amortiguador Tris-acetato 0.1 M, pH 7.4 conteniendo ASB al 0.6% y azida de sodio al 0.2% como agente bacteriostático. Cada mes se preparó una solución de 10  $\mu\text{g/ml}$  partiendo de la solución de 50  $\mu\text{g/ml}$  la cual se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en agua con azida de sodio al 0.2%. Tanto la solución de 50  $\mu\text{g/ml}$  como la de 10  $\mu\text{g/ml}$  se repartieron en alícuotas y se guardaron en tubos de vidrio siliconizados.

Las concentraciones usadas para la curva patrón fueron 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 y 5.00 ng de angiotensina I/ml. En la construcción de la curva patrón, los patrones se colocaron por duplicado. Se incluyeron además tubos para medir cuentas totales, la unión inespecífica del antígeno radiactivo a proteínas en la solución amortiguadora (blanco) y el porcentaje de unión de angiotensina I radiactiva al anticuerpo en ausencia de angiotensina I no radiactiva.

## 2.7. Preparación de los inhibidores.

La determinación de la actividad plasmática de renina por RIA, requiere que la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I y las angiotensinas plasmáticas estén inhibidas para lograr la acumulación de angiotensina-I, producto de la acción de renina sobre angiotensinógeno. Este bloqueo es un factor crítico dentro del ensayo y se logra usando EDTA, Dimercaprol (BAL) y 8 hidroxiquinolina como inhibidores. El sulfato de 8-OH-quinolina se preparó como una solución acuosa al 6.6%, el dimercaprol (BAL) como una solución oleosa al 1.7% conteniendo benzoato de bencilo al 3.3% en aceite de cacahuete calentando ligeramente hasta su completa disolución. El EDTA se adicionó al tubo de ensayo donde se colectó la muestra de sangre del paciente, a una concentración final de 1 mg/ml. De dimercaprol (BAL) y 8-hidroxiquinolina se preparó el volumen suficiente para cada ensayo considerando que para cada muestra generada a 37°C se requieren 10  $\mu$ l de cada inhibidor. Estas soluciones se guardaron a 4°C.

## 2.8. Parámetros estadísticos.

### 2.8.1. Precisión.

La precisión del método usando los reactivos producidos en el laboratorio se evalúa analizando por replicado ( $n=10$  para cada muestra) alícuotas de mezclas de plasmas de pacientes con valores de APR altos, bajos y normales, usando el anticuerpo del conejo 5. La generación de angiotensina I y el cálculo de la APR se efectuó como se explica en la sección 2.1.4.

### 2.8.2. Comparación de APR usando reactivos del estuche comercial y los producidos en el laboratorio.

Se determinó el valor de APR en muestras de pacientes empleando ambos reactivos.

#### IV. RESULTADOS

## IV. RESULTADOS

## a) De la caracterización de los anticuerpos.

Considerando que uno de los reactivos esenciales en la realización de una buena metodología en RIA consiste en el empleo de un anticuerpo de alto-título y especificidad, en el presente trabajo el primer paso en la evaluación del suero obtenido a partir de conejos inmunizados con angiotensina fué determinar el título de anticuerpos, basados en el principio de Yallow y Bergson, según el cual el título corresponde a la dilución del suero a la cual - el 50% de la hormona marcada radiactivamente está unida a su anticuerpo específico. En los resultados obtenidos e ilustrados en la Figura 13, se observa que los títulos más bajos (mucho menores de  $1:10^3$ ) los presentaron los conejos 1,3 y 6 (razón por la cual no se sangraron a blanco) y que los títulos más altos los exhiben los sueros de los conejos 2, 4 y 5, siendo de - - -  $1:1.5 \times 10^3$ ,  $1:2.5 \times 10^5$  respectivamente. El suero del conejo control no presentó reacción con el anticuerpo, ya que exhibió porcentajes de unión muy bajos, menores del 0.5% aún en el suero menos diluido.

Los conejos que tuvieron los títulos más altos se sangraron a blanco, - obteniéndose los siguientes volúmenes de suero de cada uno de ellos: conejo-2: 68 ml, conejo 4: 20 ml y conejo 5: 50 ml.

Una parte de estos sueros se almacenó en alícuotas congeladas y la otra en alícuotas liofilizadas, de la siguiente forma:

conejo 2: liofilizadas - 38 alícuotas de 1 ml c/u.  
 congeladas - 30 alícuotas de 1 ml c/u.  
 conejo 4: liofilizadas - 20 alícuotas de 0.5 ml c/u.  
 congeladas - 20 alícuotas de 0.5 ml c/u.  
 conejo 5: liofilizadas - 16 alícuotas de 1 ml c/u.  
 congeladas - 34 alícuotas de 1 ml c/u.

Total de alícuotas congeladas: 74

Total de alícuotas liofilizadas: 84

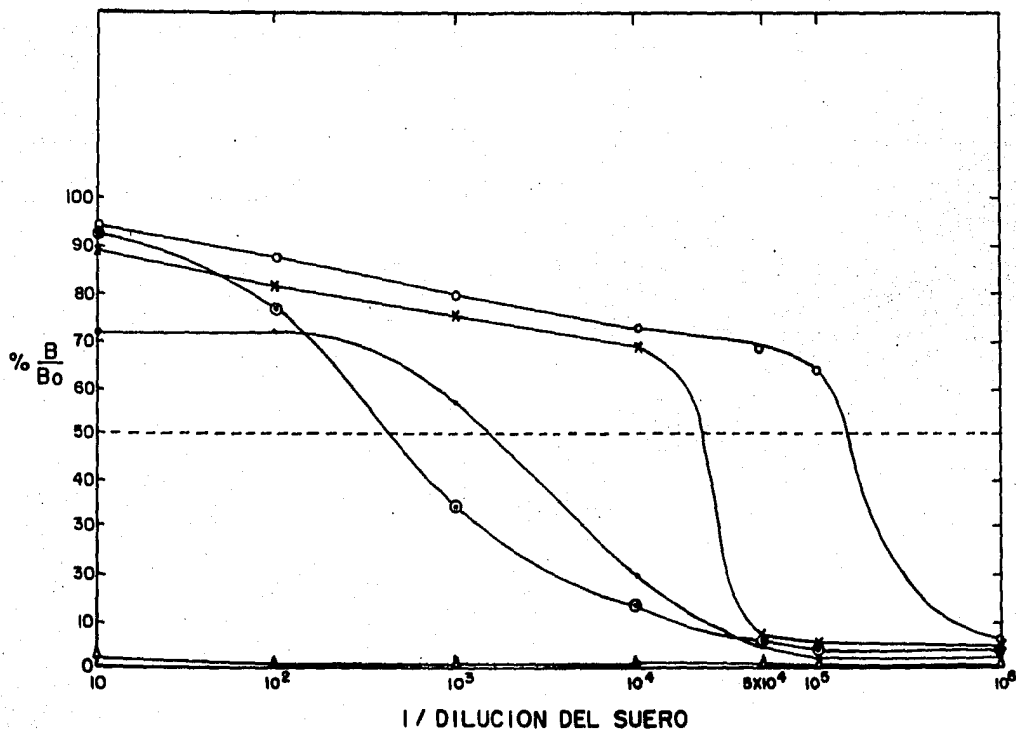


FIGURA 13. Determinación del título de anticuerpos a los sueros obtenidos en la sangría de prueba. Títulos: conejo 2 (●),  $1:1.5 \times 10^3$ ; conejo 3 (⊙),  $1:1.5 \times 10^2$ ; conejo 4 (×),  $1:2.5 \times 10^4$ ; conejo 5 (⊙),  $1:1.5 \times 10^5$ ; conejo 7 (Δ), control.

Después de liofilizar o congelar las alícuotas de suero y con la finalidad de determinar si éstos métodos de almacenamiento tienen influencia sobre el título de anticuerpos de los mismos, se midió el título a ambos tipos de alícuotas. Para el suero del conejo 2 el título disminuyó de  $1:1.5 \times 10^3$  a  $1:1 \times 10^3$ , con respecto al título del suero fresco (Figura 14). En el caso del suero del conejo 4 (Figura 15) también se observó disminución en el título - desde un valor de  $1:2.5 \times 10^4$  para el suero fresco hasta  $1:2 \times 10^4$  para el suero congelado o liofilizado. Para el suero del conejo 5, el título disminuyó de  $1:1.5 \times 10^5$  hasta  $1:8 \times 10^4$  (Figura 16). El título de estos sueros no varió después de 14 meses de almacenamiento. En éstos tres sueros seleccionados, tanto el suero congelado, como el liofilizado no presentaron cambios significativos entre sí exhibiendo ambos el mismo tipo de curvas. La Figura 17 ilustra una comparación de las curvas de determinación del título de anticuerpos de los sueros de los conejos 2, 4 y 5, una vez liofilizados.

Después de producir un suero contra un antígeno determinado, y una vez conocido el título de anticuerpos del mismo, es importante verificar la especificidad de dicho suero antes de usarlo para medir niveles de este antígeno en fluidos biológicos.

La especificidad del anticuerpo es indicativo de los posibles problemas que pueden presentarse debido a una reacción cruzada con péptidos relacionados estructuralmente.

Con el propósito de comparar la afinidad de unión de los análogos, -- fragmentos y productos metabólicos de angiotensina I (p.53), con la afinidad de unión de angiotensina I al anticuerpo, se calculó el porcentaje de reactividad cruzada al 50% de desplazamiento de cada análogo comparada con angiotensina I de la siguiente forma:

$$\% \text{ de reactividad cruzada} = \frac{\text{Cantidad (ng) de angiotensina I que desplaza el 50\% de } ^{125}\text{I-angiotensina I del anticuerpo.}}{\text{Cantidad (ng) del análogo de angiotensina I que desplaza el 50\% de } ^{125}\text{I-angiotensina I de anticuerpo}} \times 100$$



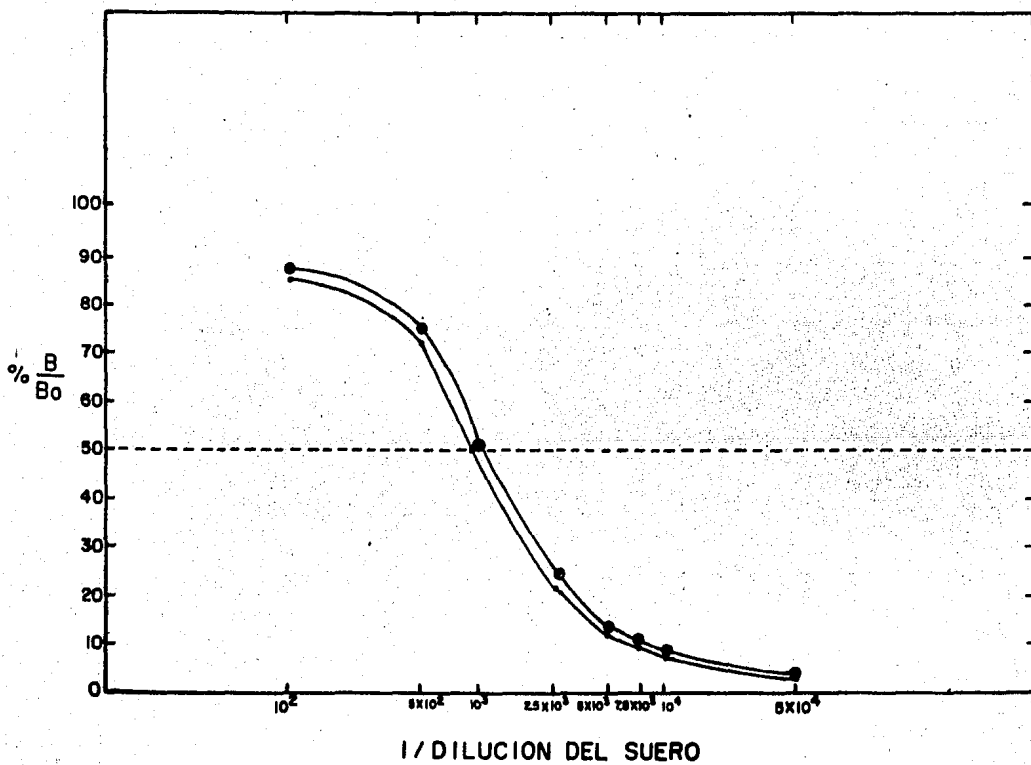


FIGURA 14. Determinación del título de anticuerpos del suero del conejo 2 congelado (●) y liofilizado (●). Título = 1:10<sup>3</sup>.

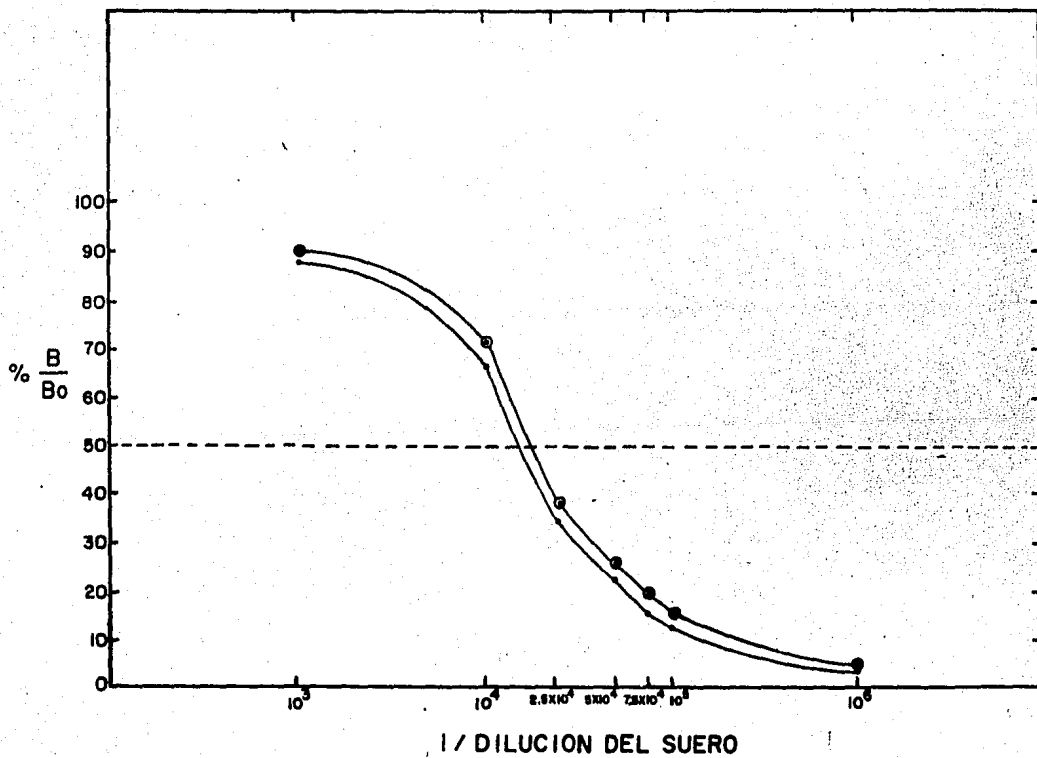


FIGURA 15. Determinación del título de anticuerpos del suero del conejo 4 congelado (●) y liofilizado (⊙). Título = 1:10<sup>4</sup>

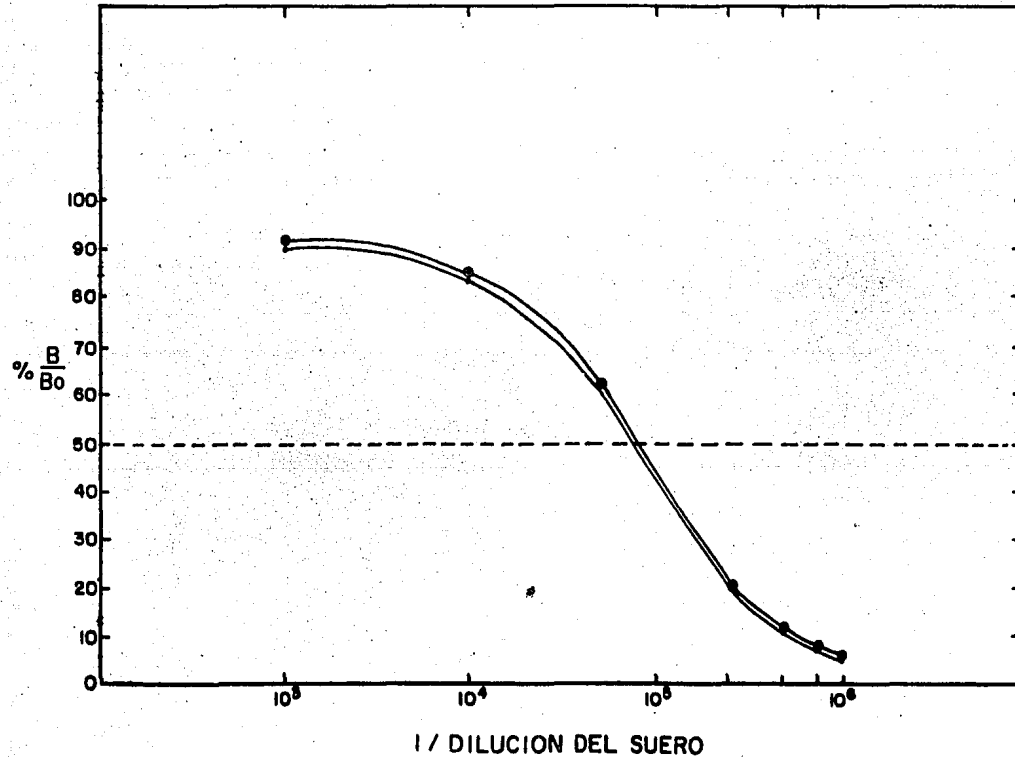


FIGURA 16. Determinación del título de anticuerpos del suero del conejo 5 congelado (●) y liofilizado (●). Título =  $1:8 \times 10^4$ .

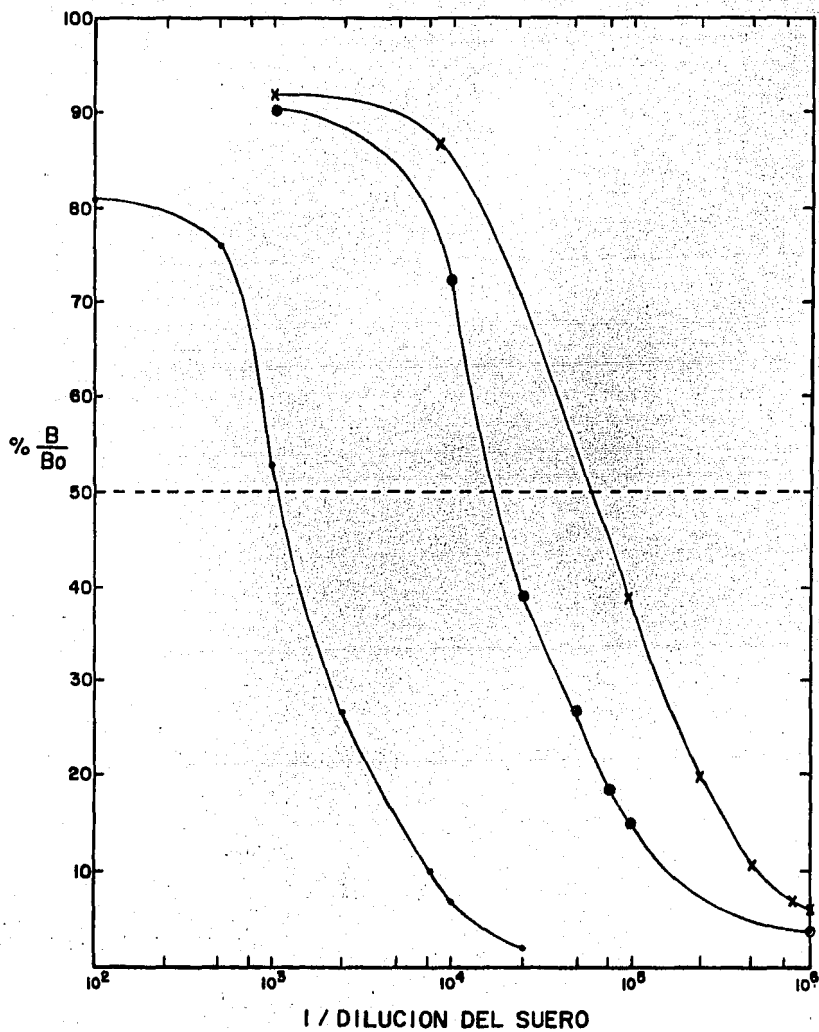


FIGURA 17 . Comparación del título de anticuerpos de los sueros - de los conejos 2 ( ● ), 1:10<sup>3</sup>; 4 ( ⊙ ), 1:2x10<sup>4</sup>; 5 ( × ), 1:8x10<sup>4</sup>.

Las Figuras 18, 19, 20 y 21 muestran las curvas de especificidad de los sueros de los conejos 2, 4, 5 y comercial respectivamente. Los resultados -- del % de reactividad cruzada, en base a las curvas de especificidad trazadas para cada anticuerpo se resumen en la tabla V.

Como puede observarse en la tabla, sólo el análogo des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I mostró reactividad cruzada de manera significativa con todos los sueros.

Los resultados de los experimentos para determinar la sensibilidad (límite de detección) del anticuerpo por éste método usando para ello los sueros de los conejos inmunizados se ilustran en la Figura 22. Los resultados obtenidos son los siguientes. Con el suero del conejo 2: 100 pg, suero del conejo-- 4: 60 pg, suero del conejo 5: 30 pg.

b) Del antígeno marcado radiactivamente:

El patrón de elución del proceso de purificación de <sup>125</sup>I-angiotensina I se ilustra en la Figura 23. La reacción se llevó a cabo con 180 µCi de <sup>125</sup>I Na y 10 µg de angiotensina I. Considerando que se aplicaron a la columna -- 150X10<sup>6</sup> cpm y que eluyeron 300X10<sup>5</sup> cpm de los cuales 280X10<sup>5</sup> estaban contenidos en el pico principal de radiactividad, se calculó el rendimiento que fué del 20%. El pico principal contenía el 92% de la radiactividad total eluida-- por la columna de DEAE-Sephadex A-25.

Las propiedades inmunológicas de <sup>125</sup>I-angiotensina I evaluadas mediante curvas patrón de desplazamiento para tres lotes diferentes con el anticuerpo del conejo 5, se muestran en la Figura 24 donde se observa la gran similitud entre estas curvas.

De una sola reacción se obtuvo suficiente péptido radiactivo para 25 en sayos.

Las curvas patrón de angiotensina I con los sueros obtenidos y el anticuerpo comercial se ilustran en la Figura 25 donde se observa que existe -- similitud entre ellas, pero que la variación posiblemente esté causada por --

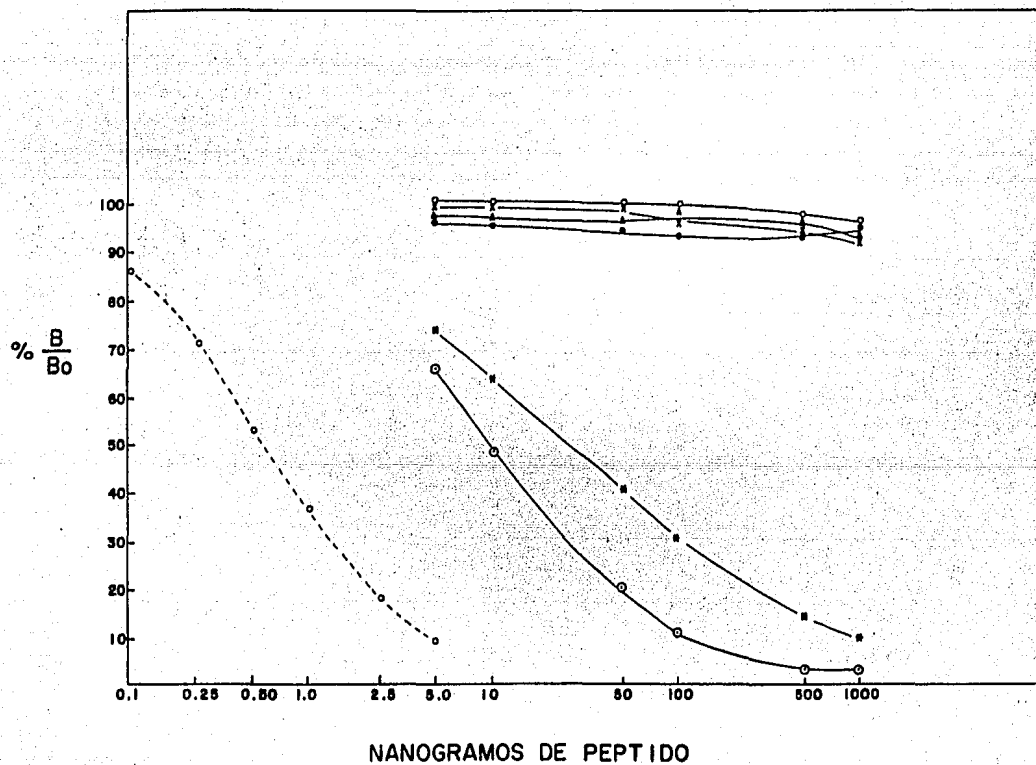


FIGURA 18. Pruebas de especificidad del anticuerpo del conejo 2 con: angiotensina I (-o-), angiotensina II (x), angiotensina III (o), angiotensinógeno (●), des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I (⊙), Val<sup>5</sup>-angiotensina I (\*), y Val<sup>5</sup>-angiotensina II (Δ).

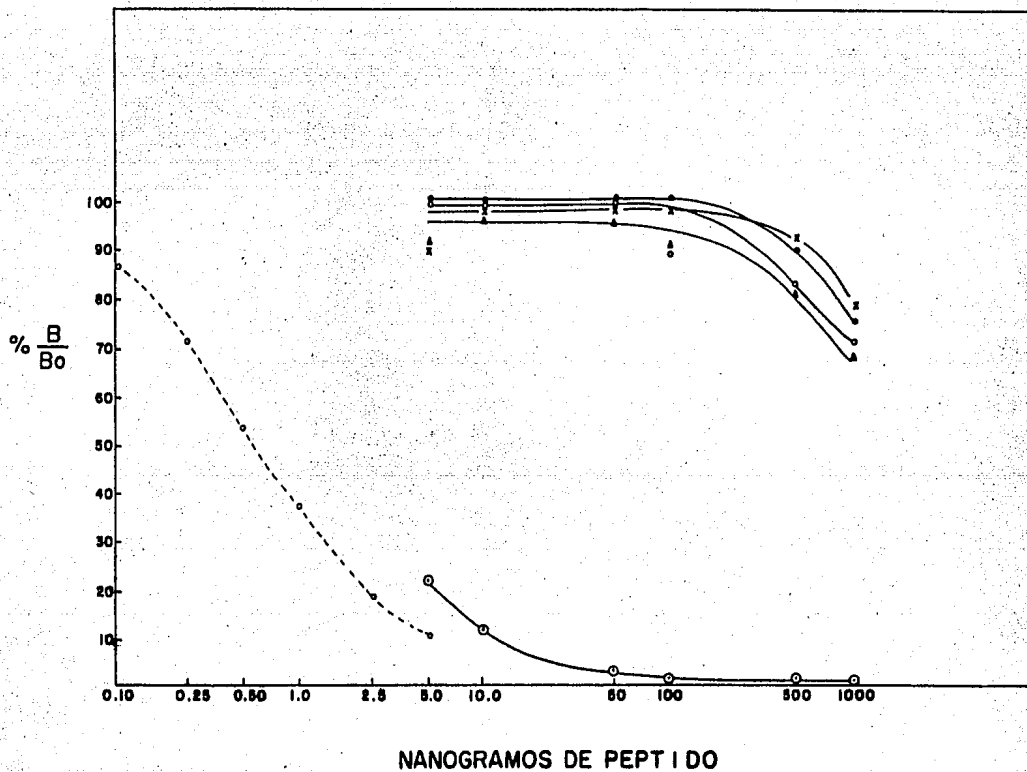


FIGURA 19. Pruebas de especificidad del anticuerpo del conejo 4 con: angiotensina I (-●-), angiotensina II (x), angiotensina III (○), angiotensinógeno (●), des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I (⊙) y Val<sup>5</sup>-angiotensina II (▲).

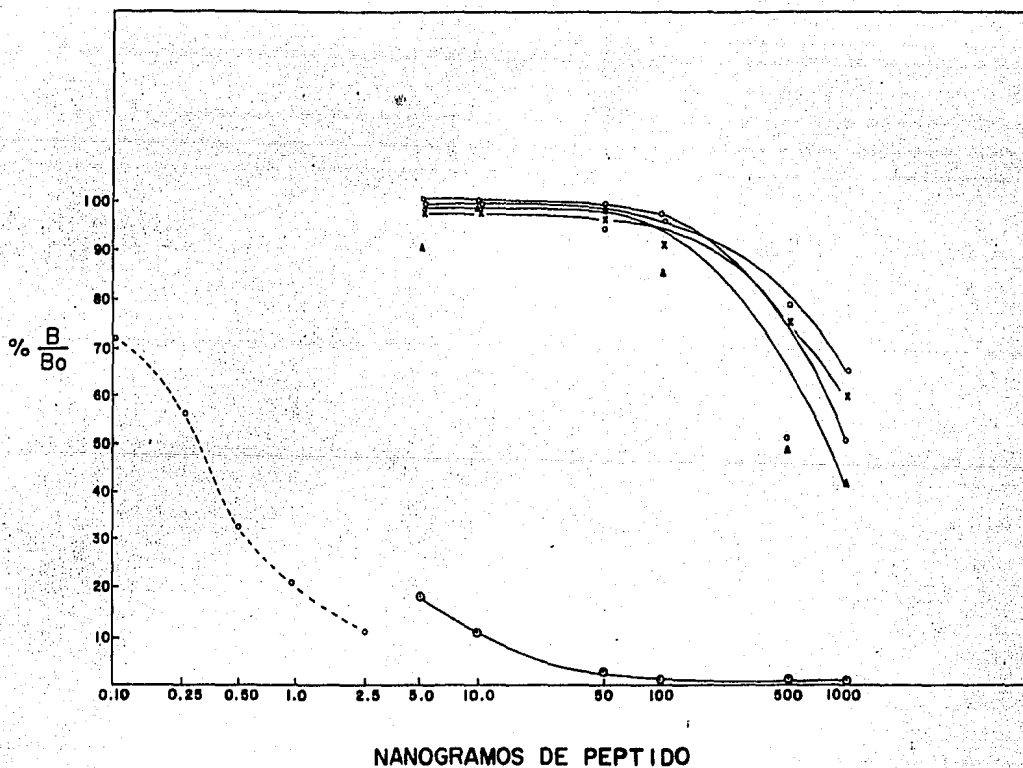


FIGURA 20. Pruebas de especificidad del anticuerpo del conejo 5 con: angiotensina I (-o-), angiotensina II (x), angiotensina III (o), -- angiotensinógeno (•), des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I (⊙) y Val<sup>5</sup>-angiotensina II (Δ).



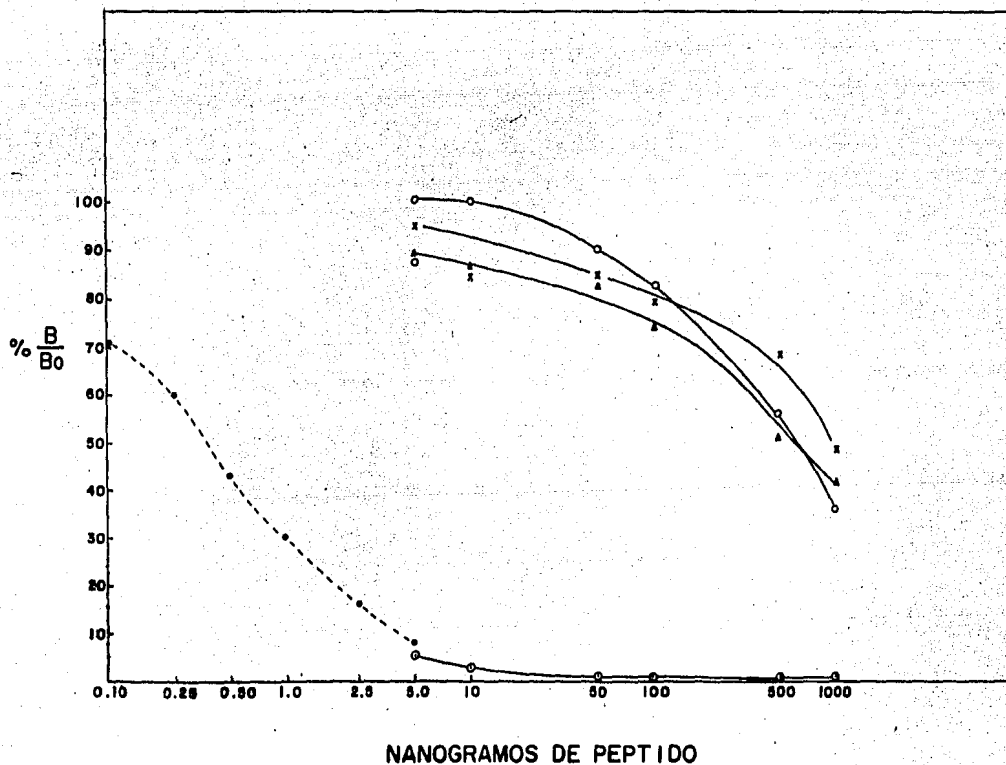


FIGURA 21. Pruebas de especificidad del anticuerpo comercial con: angiotensina I (○→), angiotensina II (×), angiotensina III (○), des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I (●) y Val<sup>5</sup>-angiotensina II (△).

TABLA V. RESUMEN DE LAS PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD CON LOS DIFERENTES ANALOGOS

ANALOGO	SUERO CONEJO 2	SUERO CONEJO 4	SUERO CONEJO 5	ANTICUERPO COMERCIAL
ANGIOTENSINA I	100%	100%	100%	100%
ANGIOTENSINOGENO	<0.005	«0.05	0.03	0.04
ANGIOTENSINA II	<0.005	«0.05	0.03	0.06
ANGIOTENSINA III	<0.005	«0.05	0.03	0.06
DES-ASP <sup>1</sup> -ANGIOTENSINA I	5	≈ 30	≈ 30	100
VAL <sup>5</sup> -ANGIOTENSINA I	1.6	ND	ND	ND
VAL <sup>5</sup> -ANGIOTENSINA II	<0.005	«0.05	0.03	0.08

ND = NO DETERMINADA

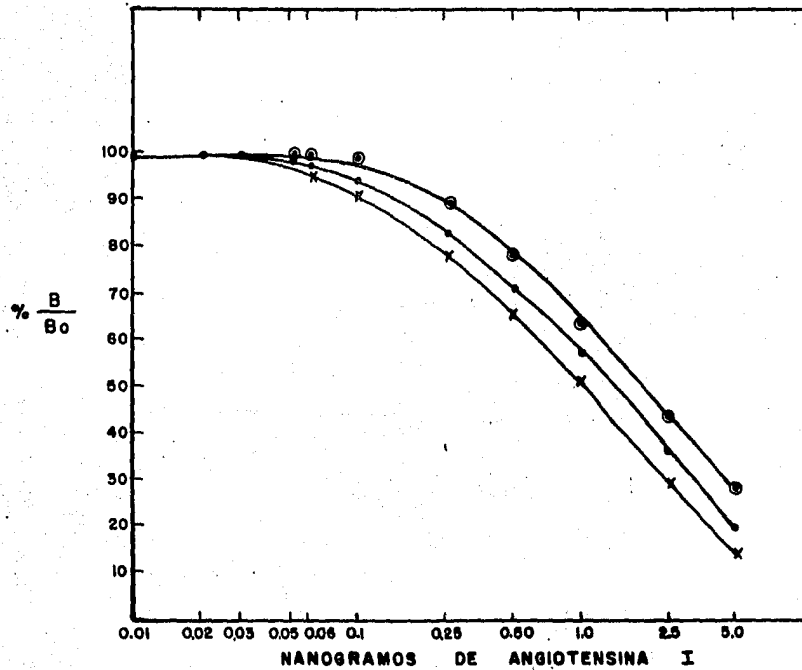


FIGURA 22. Determinación de la sensibilidad del método con los siguientes anticuerpos: conejo 2 (⊙), -- conejo 4 (●) y conejo 5 (×).

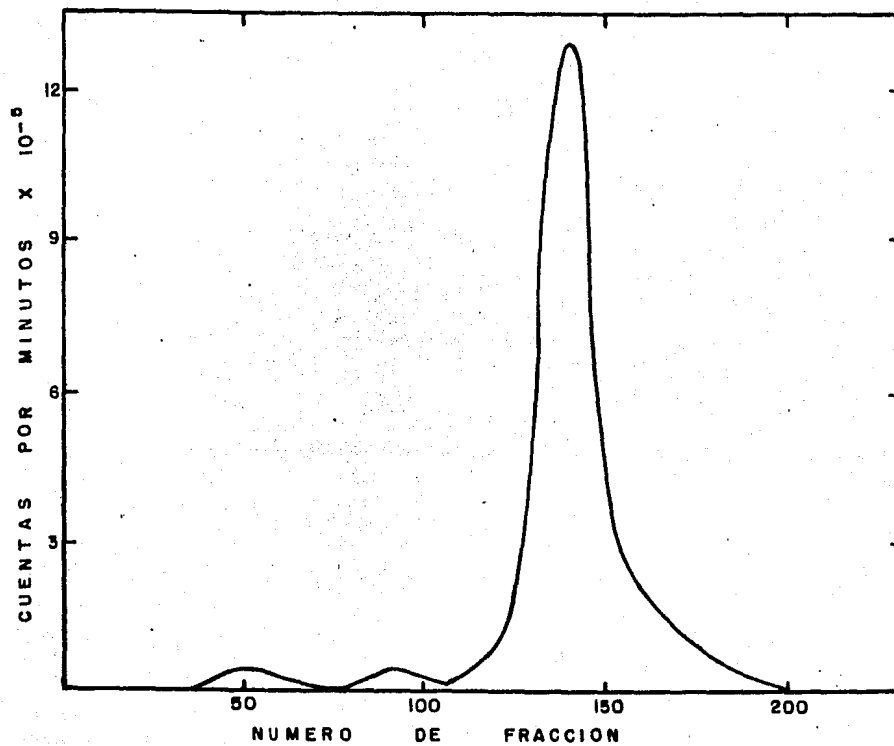


FIGURA 23. Patrón de elución de  $^{125}\text{I}$ -angiotensina I de la columna de DEAE-Sephadex A 25.

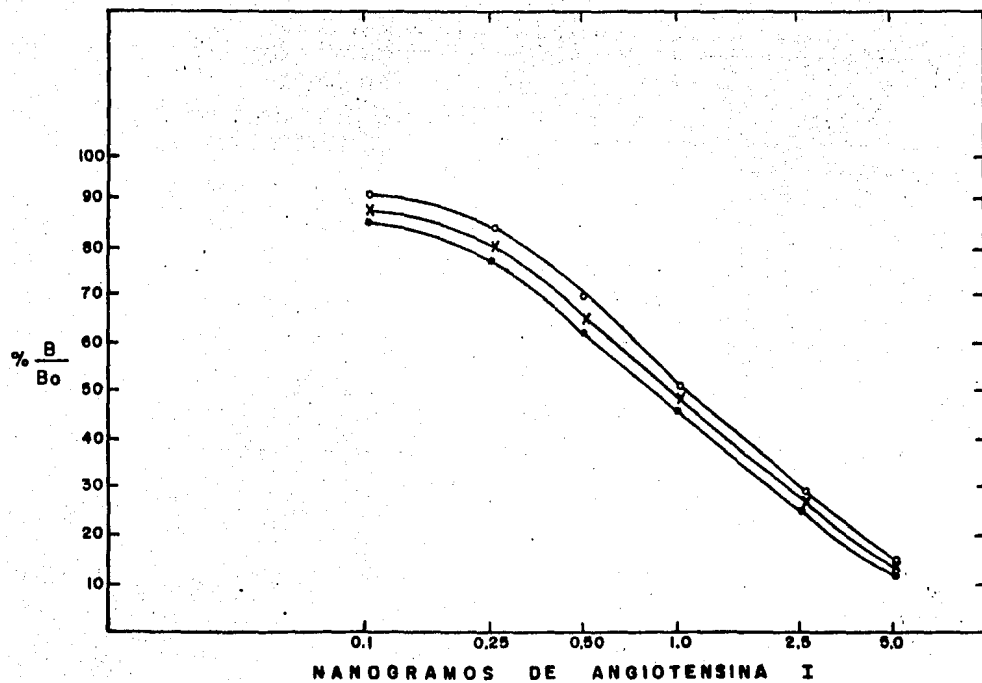


FIGURA 24. Curvas patrón con tres fracciones del pico principal de  $^{125}\text{I}$ -angiotensina I eluido de la columna de DEAE-Sephadex A 25. Fracciones 130-135 (○), 136-140 (●) y 141-150 (×). Se usó el anticuerpo del conejo 5.

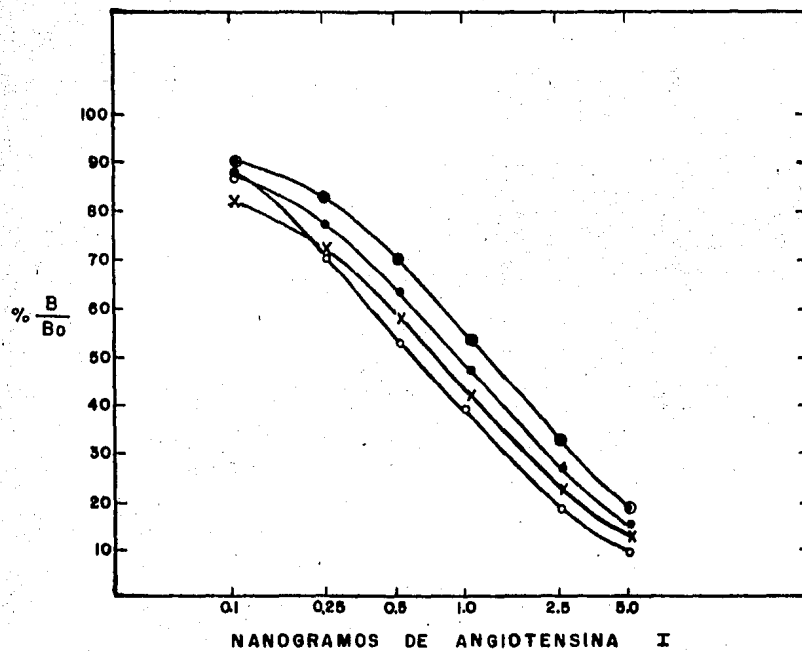


FIGURA 25. Curvas patrón con angiotensina I con el anticuerpo del conejo 2 (⊙), 4 (●), 5 (×) y comercial (○).

la sensibilidad de cada anticuerpo.

c) De los parámetros estadísticos:

La precisión intraensayo del método utilizando los reactivos obtenidos en el laboratorio fueron los siguientes:

APR (ng/ml/h  $\pm$  1 D.E., n=10)

0.40 $\pm$ 0.03; C.V. = 8.5%

3.87 $\pm$ 0.36; C.V. = 8.1%

7.05 $\pm$ 0.50; C.V. = 7.0%

La curva patrón para la determinación de angiotensina I en dichas muestras se ilustra en la Figura 26.

La alta correlación entre las determinaciones de APR usando el estuche comercial y los reactivos producidos en el laboratorio se ilustra en la Figura 27.

#### RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se obtuvieron anticuerpos contra angiotensina I en conejos inmunizados con un conjugado entre angiotensina I y proteínas de elevado peso molecular (Tabla VI).
2. El título de los anticuerpos de los sueros obtenidos se determinó mediante RIA de angiotensina I.
3. Se determinó la especificidad de los anticuerpos anti-angiotensina I obtenidos y se determinó el porcentaje de reacción cruzada con respecto a angiotensina I.
4. Se evaluó la sensibilidad del método usando los diferentes anticuerpos obtenidos.
5. Los sueros obtenidos se almacenaron en alícuotas de dos formas: liofilizadas y congeladas. No se observó variación en sus características después de 14 meses.

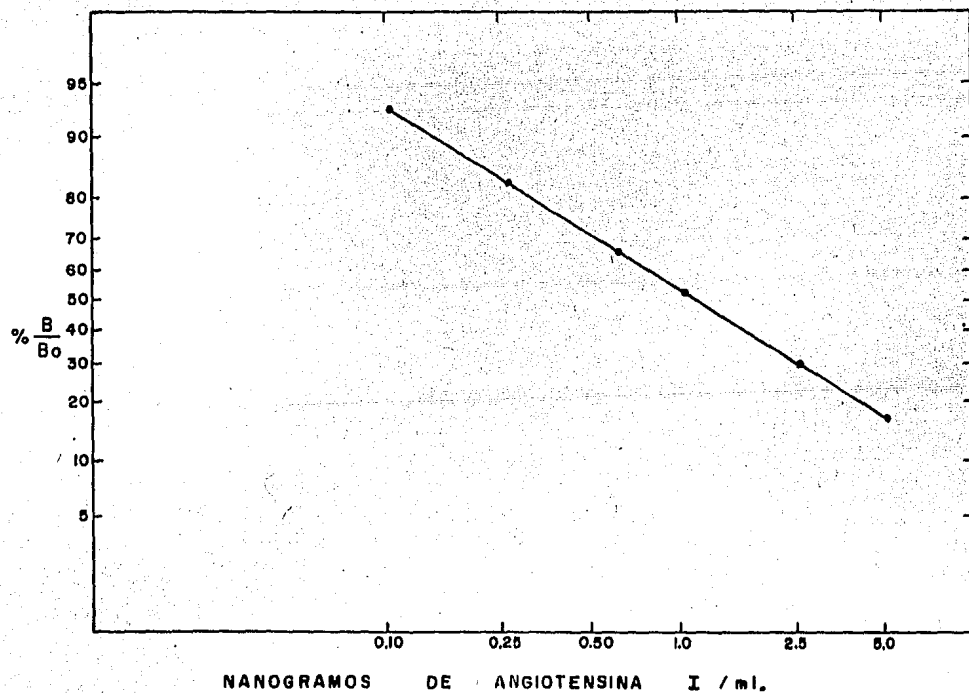


FIGURA 26. Curva patrón de angiotensina I para determinar APR.



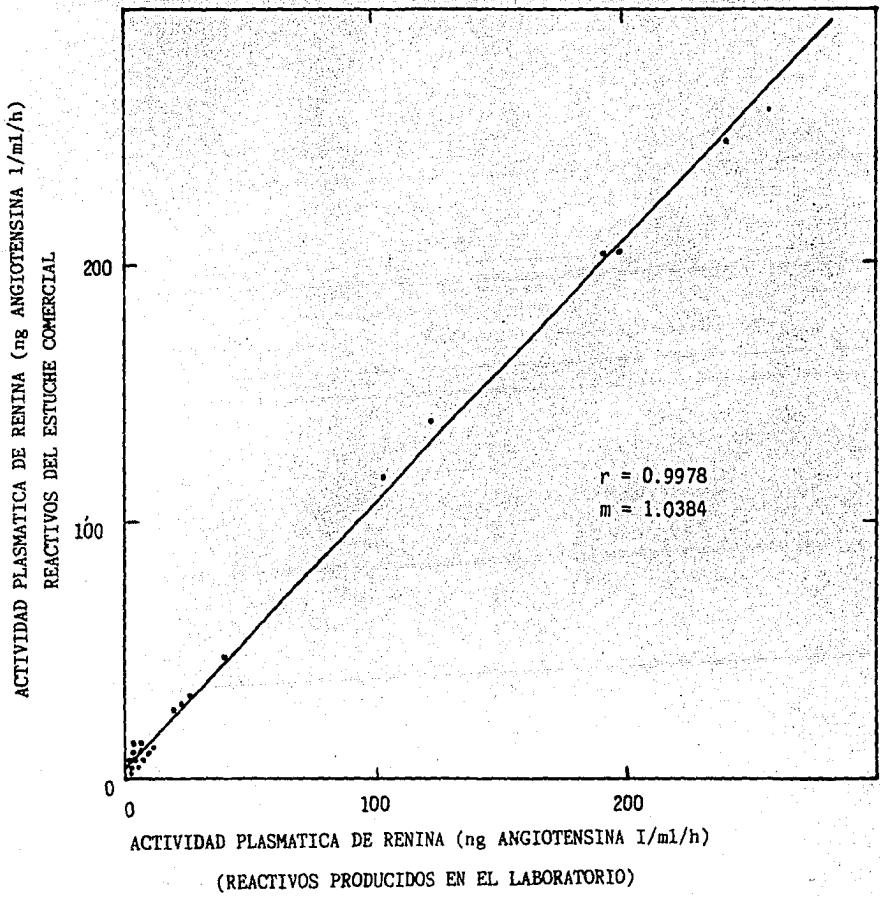


FIGURA 27. Correlación entre las determinaciones de APR usando los reactivos del estuche comercial y los preparados en el laboratorio.

6. La molécula de angiotensina I se marcó radiactivamente con  $^{125}\text{I}$ . Se evaluaron las propiedades inmunológicas de este antígeno radiactivo mediante curvas de desplazamiento.

7. Estadísticamente se calculó la precisión del método usando muestras de pacientes a las cuales se les determinó APR.

8. Se determinó la APR en muestras de pacientes, estableciendo el coeficiente de correlación entre el método empleando los reactivos del estuche comercial y el método con los reactivos producidos en el laboratorio, mediante un análisis por mínimos cuadrados.

TABLA VI. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS. RESUMEN DE RESULTADOS.

NUMERO DE CONEJO	VOLUMEN DE SUERO (ml)	TITULO DEL SUERO			NUMERO DE ALICUOTAS		ESPECIFICIDAD		SENSIBILIDAD (pg/ml)
		FRESCO	CONGELADO	LIOFILIZADO	CONGELADAS	LIOFILIZADAS	MAXIMA	MINIMA	
1	-	1:10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
2	68	1:5X10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>3</sup>	30	30	5	0.005	100
3	-	1:10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
4	20	1:2.5X10 <sup>4</sup>	1:2X10 <sup>4</sup>	1:2X10 <sup>4</sup>	20	20	30	0.05	60
5	50	1:1.5X10 <sup>5</sup>	1:8X10 <sup>4</sup>	1:8X10 <sup>4</sup>	16	31	30	0.03	30
6	-	1:10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
7	-	CONTROL NO INMUNIZADO							

V DISCUSSION

## V D I S C U S I O N

El objetivo que se persigue en el presente trabajo radica fundamentalmente en la obtención de los reactivos para la realización de un RIA para angiotensina I y su aplicación para la determinación de APR. Si la reninase hace reaccionar en presencia de reactivos que inhiban la acción de la enzima convertidora en angiotensina I, un RIA de angiotensina I proporciona una determinación directa del producto primario de la actividad de renina.

Un primer requisito para el RIA consiste en disponer de un anticuerpo específico de alta afinidad para la sustancia que se está midiendo. Se encuentran reportados en la bibliografía un gran número de métodos en donde se describen diversos intentos para potenciar la antigenicidad de pequeños péptidos de bajo peso molecular (43,52,53), tales reportes describen la -- formación de anticuerpos contra sustancias que por sí solas no son capaces de estimular la síntesis de anticuerpos en los organismos de prueba, pero que acopladas a sustancias de elevado peso molecular, proteínas generalmente, forman un complejo hapténico que estimula la formación de anticuerpos que reaccionan específicamente con la sustancia que originalmente no era -- antigénica. Esta conjugación se ha llevado a cabo por diazotación u otras síntesis orgánicas (54). En el presente trabajo se utilizó la reacción con EDC para sintetizar conjugados inmunogénicos entre la molécula de angiotensina I (PM = 1296 d) unida covalentemente a proteínas acarreadoras ya que ha demostrado ser un buen método para obtener conjugados con angiotensina-I como hapteno (43).

Las proteínas usadas en la conjugación son diversas. Eggena y cols. (55) administraron angiotensina I acoplada a albúmina sérica bovina a conejos durante 3 meses, obteniendo títulos que variaron de 1:1000 a 1:10 000. Menard y cols. (56) acoplaron angiotensina I a albúmina sérica bovina o -- gammaglobulinas, inyectándola a conejos durante un período de 1 mes cuyos títulos fueron de 1:1000. Haber y cols. (46) reportaron el uso de poli-L-- lisina succinilada como proteína acarreadora, inyectando este conjugado a conejos jóvenes durante 9 a 16 semanas, el título de anticuerpos fue de --

1:64 000. Skowsky y cols. (57) mencionan que un conjugado de angiotensina I - con tiroglobulina en animales inmunizados produce una respuesta de anticuerpos con altos títulos de mucha mayor especificidad y afinidad que los conjugados con poli-L-lisina o albúmina.

Dado el bajo peso molecular de la molécula de angiotensina I, se contempló la necesidad de seleccionar un esquema de inmunización que garantiza la producción de sueros con altos títulos y elevada especificidad en los conejos inmunizados. Así, considerando los resultados arriba mencionados se decidió seguir un esquema de inmunización semejante al descrito por Moore Y cols. (45), acoplando la molécula de angiotensina I a proteínas de elevado peso molecular como: albúmina sérica bovina, gammaglobulina, tiroglobulina, hemocianina y albúmina de huevo; según se describió en la sección de métodos. Este método adaptado para angiotensina I resultó muy eficaz, pues los títulos más altos en los sueros obtenidos fueron de 1:60,000 y 1:150,000 o sea más altos que los reportados cuando se emplearon otros métodos.

El anticuerpo antiangiotensina I obtenido es muy ventajoso económicamente hablando, ya que un solo conejo puede abastecer de suficiente anticuerpo para muchos laboratorios por muchos años. Si del conejo 5 se obtuvieron 48 ml de suero cuyo título fue de 1:80,000, con solamente 1 ml de este suero se obtienen 80,000 ml de suero listo para usarse en RIA. Considerando que en cada ensayo para determinar la APR mediante el RIA de angiotensina I se utilizan 85 ml del suero diluido y que cada semana se realiza un máximo de 5 de éstos ensayos, entonces los 80,000 ml. de suero diluido son suficientes para 941 ensayos a lo largo de 4 años, esto es partiendo solamente de 1 ml de suero de 1 solo conejo.

Ya que la cantidad de suero obtenido rebasa las necesidades del laboratorio durante muchos años, se decidió caracterizar los sueros con títulos más altos y seleccionar aquel que reúna las mejores características de título, especificidad y sensibilidad. Los sueros con títulos menores de 1:1000 son de poca utilidad en RIA (58). La congelación y liofilización disminuyeron el título de anticuerpos en los sueros; sin embargo, al almacenarlos en estas condiciones no se observó cambio en el título aún despues de 14 meses.

La reactividad del suero anti-angiotensina I con diversos análogos y fragmentos de angiotensina I ha sido estudiada por diversos investigadores, quienes subrayan la importancia del extremo carboxi-terminal para la especificidad inmunológica (59,60). Con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo, el bajo porcentaje de reactividad cruzada hacia análogos de angiotensina I con la misma secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal del péptido, el cual es idéntico para angiotensina II, angiotensinógeno, y Val<sup>5</sup>-angiotensina II, indican que el suero no contiene cantidades significativas de anticuerpos que reconozcan el extremo amino terminal de la molécula. Los análogos que poseen la misma secuencia de aminoácidos en el extremo carboxi-terminal, tales como Val<sup>5</sup>-angiotensina I y des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I mostraron elevados porcentajes de reactividad cruzada hacia el suero anti-angiotensina I, especialmente des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I la cual desplazó hasta el 100% de la angiotensina radiactiva del anticuerpo comercial, 30% con los sueros de los conejos 4 y 5 y 5% con el suero del conejo 2.

Desde el punto de vista clínico, los análogos de angiotensina I que circulan en la sangre del organismo humano requieren especial interés con respecto a su especificidad hacia el suero antiangiotensina I; éstos son: angiotensina II, angiotensinógeno y des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I. Se comprobó que angiotensinógeno no presenta reacción cruzada con el anticuerpo anti-angiotensina I, lo cual puede deberse a que tiene bloqueado el extremo carboxi-terminal, responsable de la antigenicidad. Como el octapéptido angiotensina II difiere de su precursor el decapeptido angiotensina I sólo por la ausencia de los aminoácidos His-Leu en el extremo carboxi-terminal, se ha puesto particular atención a la especificidad de esta reacción. Se observó que en las condiciones planeadas en el ensayo, angiotensina II no reacciona inmunológicamente (o lo hace en bajo porcentaje) con el suero antiangiotensina I. El nonapéptido des-Asp<sup>1</sup>-angiotensina I que posee la misma secuencia de aminoácidos en el extremo carboxiterminal presentó porcentajes de reactividad cruzada hasta del 30% con los sueros obtenidos. Este factor no representa ningún inconveniente ya que dicho fragmento circula en la sangre como producto de la acción de aminopeptidasas sobre angiotensina I, las cuales están inhibidas durante la etapa de generación de angiotensina I como parte del proceso de RIA. En estas condiciones la concentración basal de este pép-

tido se considera despreciable.

Por lo tanto, la gran especificidad de los sueros obtenidos en este -- trabajo, como lo demuestra el bajo porcentaje de reactividad cruzada hacia -- análogos de angiotensina I virtualmente presente en líquidos biológicos, -- proporciona la seguridad de que el desplazamiento del antígeno marcado ob-- servado al incubar muestras de plasma con el anticuerpo correspondiente se -- debe totalmente a la angiotensina I generada.

Por otro lado, analizando la especificidad de los sueros obtenidos de -- los conejos inmunizados y comparando los porcentajes de reactividad cruzada se observa que varían en el siguiente orden: suero conejo 2 > suero del co-- nejo 4 > suero del conejo 5 y > anticuerpo comercial. Los tres sueros obte-- nidos en los conejos inmunizados resaltaron más específicos que el anticuer-- po comercial. Este factor constituye otra de las importantes ventajas del -- suero obtenido en el laboratorio.

Con respecto a las pruebas de sensibilidad, con el anticuerpo del con-- jo 5 se alcanzan a detectar hasta 30 pg de angiotensina l/ml. Esta sensibi-- lidad es semejante a la reportada con el anticuerpo comercial.

Con los resultados ya mencionados (Tabla VI) se decidió emplear rutina -- riamente como fuente de anticuerpo al suero del conejo 5 que presentó los -- títulos más altos, alta especificidad y la mejor sensibilidad con respecto -- a los sueros de otros conejos.

El método de Hunter y Greenwood (49) es utilizado casi universalmente -- para marcar radiactivamente la molécula de angiotensina I con  $^{125}\text{I}$ , para -- uso en RIA. Se ha discutido ampliamente acerca de la proporción de  $^{125}\text{I}$  que se emplea y de la prolongada exposición al agente oxidante, ya que estos -- tienden a incrementar el daño a la angiotensina I causado por la oxidación -- y la radiación, como ocurrió en los primeros intentos (61).

Con el método de Nielsen (50) la reacción se llevó a cabo a un bajo ni -- vel de radiactividad, con bajas concentraciones de cloramina T y metabisul -- fito de sodio, además de que es necesario un solo paso de purificación para



la separación del péptido marcado en la mezcla de reacción, a diferencia de otros que requieren métodos más sofisticados (62,63).

En los experimentos que requirieron el paso de generación de angiotensina I, esta se llevó a cabo en presencia de tres reactivos que atrapan eficazmente a varios cationes divalentes inhibiendo de ésta manera un ataque proteolítico sobre angiotensina I.

A éste respecto, Haber (46) reporta que las condiciones óptimas para la preservación del decapeptido durante la incubación del plasma, requiere de tres inhibidores: EDTA, Dimercaprol (BAL) y 8-OH-quinolina, que son los que se usaron en este método.

Para evitar efectos de las angiotensinasas presentes en los eritrocitos, se separaron las células del plasma lo más pronto posible, por lo tanto las muestras hemolizadas se desecharon.

El efecto de la concentración de proteínas en el RIA se minimizó usando albúmina sérica bovina en los patrones y en las muestras muy diluidas.

Los reactivos obtenidos son de gran utilidad en los laboratorios donde se determinan parámetros del sistema renina angiotensina, ya que el RIA de angiotensina I es una medición directa de APR. Una modificación de este ensayo puede aplicarse a la medición del sustrato de renina y de la concentración plasmática de renina. Estos métodos son reproducibles y específicos y pueden adaptarse a todo laboratorio familiarizado con técnicas de RIA (64). La medición de APR difiere de la de concentración plasmática de renina -- (CPR) en que esta última requiere de la adición de un exceso de sustrato de renina exógeno a la muestra de plasma. Actualmente se está usando como fuente de sustrato de renina, el plasma de ratas binefrectomizadas 24 horas antes, ya que por un lado carecen casi por completo de renina circulante y -- por otro su concentración de angiotensinógeno es casi de 8 veces el valor -- en plasma de ratas control. En la medición del sustrato de renina se está -- empleando una fuente exógena de renina (renina de riñón porcino), que ad-- cionada en exceso consume todo el angiotensinógeno y se acumula la angioten-- sina I. En las tres condiciones diferentes mencionadas para la generación -- de angiotensina I el paso siguiente es la medición del péptido por RIA que-

en los tres casos es similar. Esto se ilustra en el esquema de la Figura 28.

Por otra parte, actualmente se está usando este anticuerpo para medir la secreción de renina de rebanadas de corteza renal incubadas in vitro. Esto permitirá, por una parte, continuar ininterrumpidamente con las líneas de investigación que se tienen actualmente en el laboratorio (65-69), y por otra abrir nuevas líneas, como es el estudio de la regulación de la secreción de angiotensinógeno de hepatocitos aislados. Esta nueva línea de investigación ya se ha iniciado y los valores de angiotensinógeno liberado de hepatocitos de ratas control han sido medidos.

Además, el hecho de que la secuencia de aminoácidos de la angiotensina I humana sea idéntica a la de rata, perro, caballo, cerdo, conejo y cobayo establece que este anticuerpo puede ser usado para estudios experimentales en todas estas especies, lo cual aumenta enormemente su valor.

Existen diversas situaciones clínicas en las cuales la determinación de los componentes del sistema renina-angiotensina es una herramienta útil en el diagnóstico diferencial de ciertas enfermedades, en las cuales la información que se obtiene, aunque no es esencial es de considerable ayuda, y aún en la investigación posterior del papel del sistema en la patogénesis diagnóstico temprano y posibilidades terapéuticas futuras.

Desde la aparición de un RIA para angiotensina I, aparecieron en el mercado varios estuches comerciales basados en él. Por razones económicas, muchos laboratorios han decidido preparar sus propios reactivos; de esta forma el costo de la prueba por muestra de paciente es menor que el costo empleando estuches comerciales de importación. Además, en algunos casos los reactivos comerciales llegan a su destino deteriorados por el mal manejo durante su transportación y/o almacenamiento, tal es el caso del laboratorio donde se realizó este trabajo.

Con la preparación de los reactivos para el RIA de angiotensina I descritos en esta tesis, se asegura la continuidad de las determinaciones clínicas y del trabajo de investigación actual.

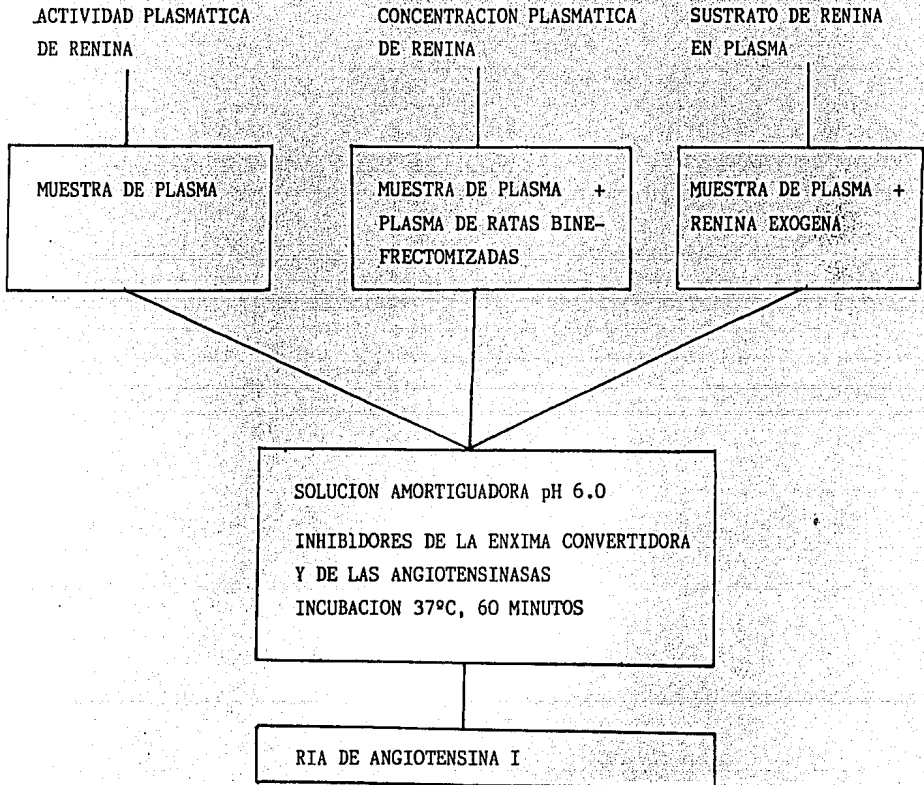


FIGURA 28. ESQUEMA QUE ILUSTRAS LAS DIFERENTES CONDICIONES EMPLEADAS PARA LA GENERACION DE ANGIOTENSINA I EN LAS DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE RENINA, CONCENTRACION PLASMÁTICA DE RENINA Y SUSTRATO DE RENINA.

## VI CONCLUSIONES

## VI CONCLUSIONES

Los reactivos preparados en este trabajo pueden sustituir satisfactoriamente los encontrados en el mercado de importación y a) Permiten continuar ininterrumpidamente tanto con las determinaciones en muestras de pacientes como con las líneas de investigación del laboratorio y b) Evita la dependencia del extranjero de éstos reactivos.

## VII BIBLIOGRAFIA

## VII BIBLIOGRAFIA

1. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E. y Levine, M. Experimental renal hypertension: the discovery of the renin angiotensin system En: Biochemical regulation of blood pressure. Editado por R.L. Soffer. - John Wiley & Sons, pp. 3-71, 1981.
2. Tewksbury, D.A. Angiotensinogen. En: Biochemical regulation of blood - - pressure. Editado por R.L. Soffer. John Wiley & Sons, pp. 95-121. 1981.
3. Hsueh, W.A. Compounds of the renin system. Am. J. Nephrol. 3: 109-117, - 1983.
4. Murakami, K., Kogenyama, R., Hirose, S., Miyazaki, H., Imai, T., Hori, - H. Hayashi, T., Ohkubo, N. y Nakanishi, S. Complementary DNA sequences - of renin. State of the art review. Hypertension 6(suppl I): I-95 - I-100, 1984.
5. Sealey, J.E. Biochemical aspects of plasma prorenin. En: Biochemical re- - gulation of blood pressure. Editado por R.L. Soffer. John Wiley & Sons, - pp. 73-94, 1981.
6. Oparil, S., y Haber, E. The renin-angiotensin system. New Engl. J. Med.- 291: 389-401, 446-456, 1974.
7. Keeton, T.K. y Campbell. The parhacological alteration of renin release. Pharmacol. Rev. 32: 81-227, 1980.
8. Ham, A.W. Tratado de Histología. Séptima edición. Capítulo 24 Aparato -- urinario, Interamericana. pp. 694-728, 1975.
9. Goormaghtigh, N. Existence of an endocrine gland in the media of the re- - nal arterioles. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 42: 688-689, 1939.
10. Tortora, G.J. y Anagnostakos, N.P. Principios de Anatomía y Fisiología, - Primera edición. Capítulo 22, sistema nervioso: estructura, fisiología y enfermedades. Harla, pp. 516-536, 1977.
11. Pedraza-Chaverri, J. Influencia de la toxina pertussis sobre la función- - renal. I. Efecto sobre la secreción de renina. Tesis doctoral. Facultad- - de Química. División de Estudios de Posgrado, UNAM, 1985.
12. Murakami, E., Hiwada, K. y Kokubu, T. Effects of insulin and glucagon on - production of renin substrate by the isolated rat liver. J. Endocrinol.- 85: 151-153, 1980.
13. Clauser, E., Bouhnik, J., Coezy, E., Corvol, P. y Menard, J. Synthesis - and release of immunoreactive angiotensinogen by rat liver slices. Endo- - crinology 112: 1188-1193, 1983.

14. Murakami, E., Eggena, P., Barret, J.D. y Sambhi, M.P. Heterogeneity of renin substrate released from hepatocytes and in brain extracts. *Life Sciences* 34: 385-392, 1984.
15. Dzau, V.J. y Herrmann, H.C. Hormonal control of angiotensinogen production. *Life Sciences* 30: 577-584, 1982.
16. Murakami, E., Hiwada, K. Y Kokubu, T. Effects of prostaglandins on renin substrate production by the liver. *Clin. Sci.* 59: 137-139, 1980.
17. Hiwada, K., Tanaka, H. y Kokubu, T. The influence of nephrectomy, ureteral ligation and of estradiol on plasma renin substrate in unilateral nephrectomized rats. *Pflugers Arch.* 365: 177-182, 1976.
18. Skeggs, L.T. Jr., Marsk, W.H., Kahn, J.R. y Shumay, N.P. The purification of hypertensin. *J. Exp. Med.* 100: 363-370. 1954.
19. Peart, W.J. The isolation of a hypertensin. *Biochem. J.* 62: 520-527, 1956.
20. Page, I.H. y Helmer, O.M. A crystalline pressor substance (angiotonin)-resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* 71: 29-42, 1940.
21. Braun-Menéndez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F. y Muñoz, J.M. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98: 283-298, 1940.
22. Soffer, R.L. Angiotensin-converting enzyme. En: *Biochemical regulation of blood pressure*. Editado por R.L. Soffer. John Wiley & Sons; pp. 123-164, 1981.
23. Ibarra-Rubio, M.E., Pedraza-Chaverrí, J. y Peña, J.C. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4. 15. 1.) en diferentes especies de mamíferos. Susceptibilidad diferencial a la inhibición por captopril (SQ 14 225). Libro de resúmenes de la XXXIV Reunión anual del Instituto Mexicano de Investigaciones nefrológicas. p. 2, 1985.
24. Ibarra-Rubio, M.E. Estudio comparativo de la actividad sérica de la enzima convertidora de angiotensina I (E.C. 3.4. 15. 1.) en diferentes especies de mamíferos y en ratas bajo diferentes estados fisiológicos. Tesis de licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM. 1986.
25. Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting-enzyme. *J. Exp. Med.* 103:295-299, 1956.
26. Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. Inhibitors of angiotensin converting enzyme. En: *Biochemical regulation of blood pressure*. Editado por R.L. Soffer. John Wiley & Sons. pp. 165-204, 1981.
27. Williams, G.H. y Dluhy, R.G. Control of aldosterone secretion. En: *Hypertension*. Editado por: J. Genest, O. Kuchel, P. Hamet, M. Cantin. McGraw-Hill, pp 320-338, 1983.



28. Goldblatt, H., Lynch, J., Haizal, R.F. y Summerville, W.M. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent of -- systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59: 347-379, 1934.
29. Skeggs, L.T., Dorer, E.F., Kahn, J.R., Lentz, K.E. y Levine, M. The biochemistry of the renin angiotensin system. *Am. J. Med.* 60: --- 737-748, 1976.
30. Guyton, A.C. *Fisiología Humana. Interamericana, México.* 1975.
31. Lee, M. R. The renin-angiotensin system. *Br. J. Clin. Pharm.* 12: -- 605-612, 1981.
32. Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. Inhibition of the renin-angiotensin -- system. A new approach to the therapy of hypertension. *J. Med. -- Chem.* 24: 355-361, 1981.
33. Yallow, R.S. y Berson, S.A. *J. Clin. Invest.* 39: 1157-1175, 1960.
34. Yallow, R.S. Radioimmunoassay: A probe for the fine structure of -- biological systems. *Science* 200: 1236-1245, 1978.
35. Berson, S.A. y Yallow, R.S. 1971. Radioimmunoassay: A Status Report. In *Immunology: Current Knowledge of Basic Concepts in Immunology -- and Their clinical Applications.* R.A. Good and D.W. Fisher, editors. Sinauer Associates, Stamford, Conn. 287.
36. Dogterom, J., van Wimersma-Greidanus, T.J.B. y deWied, D. Vasopresin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog and rat. *Am. J. - - - Physiol.* 234(5): E463-E467, 1978.
37. Tauxe N.W. y Orvis, A.L. Nuclear Medicine procedures in the clinical diagnosis by laboratory methods. Editado por Davidsohn y Henry. W.B. Saunders Co. Capítulo VII pp. 449-498, 1974.
38. Cooper, T.G. The tools of biochemistry, John Wiley & Sons. Capítulo 8, pp. 256-308, 1977.
39. Hunter, W.M. Internal quality control and external quality assessment. En: *Radioimmunoassay, Design and quality control.* Editado por J.I. Thorell. Pergamon Press. pp. 69-76, 1983.
40. Bangham, D.R. Standardization and Standards. En: *Radioimmunoassay -- design and quality control* Editado por J.I. Thorell. Pergamon Press. pp. 59-67, 1983.
41. Mallette, L.E. General techniques for raising antisera against -- parathyroid hormone and calcitonin. En: *Assay of calcium-regulating hormones.* Editado por D.D. Bikle. Springer-Verlag, pp. 167-189, 1983.

42. Lefonturier, Ph. Manual de Inmunología General. Capítulo 2. Editorial Masson. pp. 17-30, 1981.
43. Goodfriend, T.L., Levine, L. y Fasman, G. Antibodies to bradikinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science* 144: 1344-1346, 1964.
44. Carraway, K.L. y Koshland, E.D. Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimides reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 160: 172-274, 1968.
45. Moore, G., Lutterodt, A., Burford, G. y Ledens, K. A highly specific antiserum for arginine vasopressin. *Endocrinology* 101: 1421-1435, 1977.
46. Haber, E., Koerner, T., Page, L.B., Kliman, B. y Purnode, A. Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 1349-1356, 1969.
47. Skeggs, Jr. L.T., Kahn, J.R. y Shumway, N.P. *J. Exp. Med.* 95: 241-1952.
48. Skeggs, Jr. L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting-enzyme. *J. Exp. Med.* 103: 295-299, 1956.
49. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. y Glover, J.S. The preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123, 1963.
50. Nielsen, M.D., Jørgensen, M. y Giese, J.  $^{125}\text{I}$ -labelling of angiotensin I and angiotensin II. *Acta Endocrinol.* 67: 104-116, 1971.
51. Sealey, J.E., Gerten-Banes, J. y Laragh, J.M. The renin system: variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay. *Kidney Int.* 1: 240-253, 1972.
52. Borek, F., Stupp, Y y Sela, M. Formation and isolation of rabbit antibodies to a synthetic antigen of low molecular weight. *J. Immunol.* 98: 739-744, 1967.
53. Gilliland, P.F. y Prout, T.E. Immunologic studies of octapeptides. II. Production and detection of antibodies to oxytocin. *Metabolism* 14: 918-923, 1965.
54. Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. *Methods in Immunology*, 3a. edición W.A. Benjamin, Inc., pp. 133-188, 1977.
55. Eggena, P. Barret, J.D., Sambhi, M.P. y Wiedeman, C.E. The validity of comparing the measurements of angiotensin I generated in human plasma by radioimmunoassay and bioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 865-870, 1974.

56. Menard, J. y Catt, K.J. Measurements of renin activity, concentration and substrate in rat plasma by radioimmunoassay of angiotensin I. *Endocrinology* 90: 422-430, 1972.
57. Skowsky, W.R. y Fisher, D.A. The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules. *J. Lab. Clin. Med* 80: 131-144, 1972.
58. Rehfeld, J.F. The influence of antiserum properties on radioimmunoassay characteristics. En: *Radioimmunoassay design and quality control*. Editado por J.I. Thorell. Pergamon Press. pp. 19-28, 1981.
59. Hackental, E. y Taugner, R. The specificity of angiotensin antisera. A cautionary note. *Histochemistry* 77: 201-207, 1983.
60. Giese, J. Nielsen, M.D. y Jørgensen, M. New view of cross-reactions in anti-angiotensin sera. *Nature New Biology* 229: 189-190, 1971.
61. Latta, J. Improved measurement of plasma renin activity and concentration. *Clin. Chem.* 21: 1344-1345, 1975.
62. Speth, R.C. y Husain, A. Preparation and one-step purification of <sup>125</sup>I-angiotensin I for radioligand binding assay. *J. Pharmacol. Methods* 11: 137-151, 1984.
63. Wilkinson, R., Luetscher, J.A. y Nokes, G. Iodination of angiotensin I for use in radioimmunoassay. *J. Clin Endocr.* 33: 545-551, 1971.
64. Heise, C.M. Measurement of plasma renin activity. *Clin. Chem.* 21: 447-448, 1975.
65. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M.C., Ibarra-Rubio, M.E., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Effect of pertussis-toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. *Life Sciences* 35: 1683-1689, 1984.
66. Pedraza-Chaverri, J., Ibarra-Rubio, M.E., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Pertussis-toxin potentiates anesthesia-induced renin secretion. *Eur. J. Pharmacology* 112: 115-117, 1985.
67. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Pertussis-toxin enhances the beta-adrenergic and blocks the alpha<sub>2</sub>-adrenergic regulation of renin secretion in renal cortical slices. *Life Sciences* 38: 1005-1011, 1986.
68. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Pertussis-toxin blocks the inhibition of renin secretion induced by clonidine in renal cortical slices. *Fed. Proc.* 44: 673, 1985. (Resumen 1536).
69. Ibarra-Rubio, M.E., Pedraza-Chaverri, J., De Alba, J.A., Herrero-Bervera, B. y Peña, J.C. Angiotensin converting enzyme activity is increased in experimental nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 29: 302-1986.