

Tesis de Posgrado

Estudios sobre glomerulopresina

Bonetto, Rosa Juana

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bonetto, Rosa Juana. (1986). Estudios sobre glomerulopresina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1967_Bonetto.pdf

Cita tipo Chicago:

Bonetto, Rosa Juana. "Estudios sobre glomerulopresina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1967_Bonetto.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE GLOMERULOPRESINA

Autora: Lic. ROSA JUANA BONETTO

Directora: Dra. JULIA URANGA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Obligado 2490 - Buenos Aires - Argentina

Tesis presentada para optar al
Título de Doctora en Ciencias Químicas

1 9 8 6

Besis 1964
ej. 2

Deseo agradecer especialmente:

a la Dra. Julia Uranga por su dedicación, estímulo y ayuda generosa, y por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo;

al Dr. Enrique J. del Castillo por su colaboración y apoyo constantes;

al Dr. Virgilio G. Foglia por el privilegio de permitirme desarrollar este trabajo en el Instituto de Biología y Medicina Experimental;

a los demás integrantes del equipo de investigación de Glomerulopresina, con quienes se trabaja en un clima de confianza y ayuda mutua: la Dra. Edith Arany, el Bioquímico Carlos Prono, las Sras. Estela Román y Sonia de Delcourt, la Srta. Zulera Vercesi, el Sr. Jorge Aguirre;

al Dr. Tomás Santa Coloma, por su contribución en los trabajos de purificación;

a la Dra. Marta Tesone por sus acertados consejos en mis estudios de post-grado, y a todos mis docentes de Química Biológica, por sus valiosas enseñanzas;

a los Lic. B. Serantes, A. Vallone y J.B. Rodríguez por su ayuda en las técnicas de HPLC;

a todo el personal científico, de biblioteca, administrativo y de mantenimiento del Instituto, por su valiosísima colaboración.

I N D I C E

I. <u>INTRODUCCION GENERAL</u>	1
II. <u>PURIFICACION DE LA GP</u>	14
1. INTRODUCCION	15
2. MATERIALES Y METODOS	19
a. Micrométodos de dosaje	19
b. Obtención de GP de perro	21
c. Obtención de GP de rata	22
d. Tratamiento con alúmina activada	23
e. Extracción de GP de perro con n-butanol	23
f. Extracción de GP de rata con n-butanol	24
g. Cromatografía en capa delgada	25
h. Espectro de absorción de luz UV	26
i. Cromatografía líquida de alta presión	26
j. Incubaciones con β -glucuronidasa	27
k. Estadística	28
3. RESULTADOS	29
a. Micrométodos de dosaje	29
b. Termoestabilidad	36
c. Susceptibilidad a la oxidación	38
d. Condiciones de conservación	40

e. Tratamiento con alúmina	43
f. Extracción con solventes orgánicos	43
g. Cromatografía en capa delgada	48
h. Espectro de absorción de luz UV	58
i. Cromatografía líquida de alta presión	60
4. DISCUSION	64
5. SUMARIO	77
III. <u>ACCION DE GP SOBRE VENAS Y ARTERIAS "IN VITRO"</u>	80
1. INTRODUCCION	81
2. MATERIALES Y METODOS	85
a. Preparaciones "in vitro"	85
b. Obtención de las muestras de GP	87
c. Incubaciones con β -glucuronidasa	88
d. Drogas	89
e. Estadística	89
3. RESULTADOS	90
a. Acción en venas	90
b. Acción en arterias	95
c. Curva dosis - respuesta	98
d. Mecanismo de acción	100
4. DISCUSION	104
5. SUMARIO	110
REFERENCIAS	112

ABREVIATURAS

ANOVA	análisis de la varianza
AMP	adenosina-5'-monofosfato
GF	glucurónido de fenolftaleína
GP	glomerulopresina
KRB	Krebs-Ringer-bicarbonato
KRBG	Krebs-Ringer-bicarbonato-glucosa
LT	leucotrieno
PG	prostaglandina
R_f	movilidad relativa al frente
R_{GF}	movilidad relativa al GF
t_r	tiempo de retención
TTC	tensión tónica contráctil
TX	tromboxano
UV	ultravioleta

La presión que se registra en el uréter ocluido del sapo es igual a la presión en la cápsula de Bowman y responde precisa y rápidamente a las variaciones de presión de dicha cápsula. Por lo tanto, la presión ureteral se considera como índice de la presión glomerular (Uranga, 1965).

En el sapo existe una estrecha correlación entre el índice de la presión glomerular y la filtración glomerular (Uranga, 1963), de modo que se puede considerar que las variaciones registradas en la presión ureteral corresponden a variaciones en la filtración glomerular.

La expansión del volumen plasmático del sapo produce un aumento de la presión ureteral, sin modificación de la presión arterial del animal. Además se ha observado que, si se conecta vascularmente un sapo dador con el riñón aislado de un sapo receptor, al expandir el volumen plasmático del animal dador, se produce el aumento de la presión ureteral del riñón receptor. Ya que la expansión del volumen plasmático del dador no afecta el sistema nervioso del receptor, esta experiencia indica que se producirían cambios humorales transmitidos de uno a otro animal a través de la sangre. Se observó además que si se realiza la expansión del volumen plasmático del

sapo receptor, no se modifica su presión ureteral; esto confirma la conclusión anterior, ya que el riñón receptor está aislado de la circulación propia, pero no denervado.

Este efecto podría deberse a varios mecanismos:

- a) a la dilución, disminución de la secreción, o aumento de la destrucción de una sustancia vasoconstrictora;
- b) al cambio de viscosidad;
- c) a la redistribución del flujo renal;
- d) a la liberación de una sustancia vasodilatadora.

Las tres primeras posibilidades se descartaron al observar que la hemodilución no afecta la presión ureteral del sapo, aún en el caso de que se produzca una marcada disminución del hematocrito (Uranga, 1967).

Para confirmar la posible participación, en este efecto, de un órgano que libere una sustancia vasodilatadora, se eliminaron de la circulación diferentes territorios sanguíneos: la exclusión del órgano responsable anularía la respuesta glomerulopresora producida al expandir el volumen plasmático. Cuando se eliminó la hipófisis, las adrenales, el riñón o el tracto gastrointestinal (incluyendo bazo y páncreas), no se modificó la respuesta. En cambio, cuando se excluyó el hígado de la circulación, esta respuesta desapareció, manifestando que el hígado

do estaba involucrado en la producción de una sustancia que aumenta la presión ureteral (Uranga, 1967).

Para confirmar esta hipótesis se ensayó perfundir un riñón aislado de sapo, con plasma que previamente circuló a través de patas de sapos a un flujo de 5 ml/min, o de hígado a un flujo de 1-2 ml/min, observándose que no producían modificación de la presión ureteral. Cuando el plasma que circuló por hígado se perfundió a un flujo elevado (10 ml/min), se registró un aumento de la presión ureteral del riñón aislado; si luego se cambiaba el líquido de perfusión por plasma que no circuló por el hígado, la presión ureteral volvía a su valor normal. Para comprobar que los cambios descriptos no se debían al deterioro de la preparación, se ensayó la perfusión del riñón con plasma normal, durante un tiempo prolongado, observándose que se mantenían inalterados la presión ureteral y el flujo plasmático renal. De estos experimentos se concluyó que el hígado de sapo produce una sustancia humoral que aumenta la presión ureteral, que recibió el nombre de "glomerulopresina" (Uranga, 1969). Su efecto en el riñón parece deberse a que produce la dilatación de la arteriola aferente del glomérulo (Uranga, 1973).

Se ha observado que en el conejo, la expansión del volumen plasmático produce una sustancia similar a la descripta

en el sapo: el ultrafiltrado del plasma obtenido de la vena hepática de estos animales aumenta la filtración glomerular en ratas y la presión ureteral en sapos. (Uranga and Fuenzalida, 1975). Por lo tanto el hígado del conejo produce una sustancia con actividad de glomerulopresina (GP).

En el perro se han hecho estudios sobre animales diabéticos y normales. Se observó que el plasma obtenido por punción de la vena hepática de los diabéticos, presenta mayor actividad de GP que el obtenido de animales normales (del Castillo et al., 1978). Además se observó que la infusión de insulina en la vena porta de perros pancreatoprivos reduce la actividad de GP a los valores observados en los animales normales (del Castillo et al., 1977).

En perros normales, la infusión de glucagon a través de la vena porta, que irriga el hígado, produce aumento de la filtración glomerular, y de la actividad de GP (medida por su acción en el riñón de sapo). Si la infusión de glucagon se realiza por la arteria renal, no se altera la filtración glomerular, indicando que esta hormona, en las dosis utilizadas, no actúa directamente sobre la filtración. Si por la arteria renal se infunde un ultrafiltrado de plasma conteniendo GP, aumenta la filtración glomerular. Estas experiencias sugieren que el glucagon,

en las cantidades utilizadas, no actuaría "per se", sino a través de la producción hepática de GP (Uranga et al., 1979 c).

En la rata, se observó que el líquido obtenido por perfusión del hígado aislado, con buffer KRBG, posee actividad de GP. Esta actividad es mayor en los machos que en las hembras. Si al líquido de perfusión se le agrega glucagon, la producción de GP aumenta, independientemente de la dosis. Si se le agrega insulina, la producción disminuye en relación logarítmica respecto a la dosis utilizada. Además se observó que existe una relación glucagon/insulina con la cual se potencia la producción de GP (Uranga et al., 1982 a). El mediador intracelular que relaciona el glucagon con la producción de GP parece ser el AMP cíclico, ya que al inhibir la degradación de este nucleótido con teofilina, se obtiene mayor cantidad de GP. El mismo efecto se logra al perfundir el hígado de rata con dibutiril AMP cíclico, existiendo una estrecha relación entre la dosis de nucleótido infundido y la producción de GP (Arany et al., 1985).

Se estudió la acción de dos glucocorticoides (hidrocortisona y dexametasona) y un mineralocorticoide (desoxicorticosterona) sobre la producción de GP por el hígado aislado de rata. Estos esteroides disminuyeron dicha producción, hecho que es difícil de explicar debido a las múltiples interrelaciones de estas sustancias con las acciones antagonistas y sinergistas

de otras hormonas y factores metabólicos. Por otro lado, la adrenalectomía no modificó la producción de GP, sugiriendo que las hormonas adrenales no jugarían ningún papel en dicha producción (Uranga et al., 1982 b).

Recientemente se ha descripto actividad de GP en sangre periférica de pacientes diabéticos dependientes de insulina, de diagnóstico reciente, y en sujetos normales tratados con glucagon. Esta actividad no se detectó en personas normales sin ningún tratamiento (Arany, sometido para su publicación en Acta physiol. latinoam.).

Características físico-químicas de la GP

La ultrafiltración por membranas Diaflo UM-0.5 que retienen las sustancias de peso molecular mayor de 500, no produce la retención de la GP, indicando su bajo peso molecular (Uranga, 1971).

Se ha probado la termoestabilidad y resistencia a cambios de pH de la actividad de GP presente en el plasma de sapos que ha circulado por el hígado, ultrafiltrado por estas membranas. Se encontró que la actividad biológica resiste la ebullición durante un minuto, y la incubación a 36°C durante 90 min.

Si se la somete a incubación durante 2,5 h. a 20°C, a diferentes pH entre 2,2 y 8,8, tampoco se altera (Uranga, 1971).

La actividad biológica del ultrafiltrado no se modifica por incubación con pronasa, sugiriendo que no es un péptido (Uranga, 1971).

Si el ultrafiltrado activo se somete a extracciones con acetato de etilo, que extrae los lípidos no polares en solución, la actividad biológica se encuentra en la fase acuosa, sugiriendo su naturaleza polar. Esto se confirmó pasando el ultrafiltrado a través de una columna de Amberlite MB-3 de 20 ml., que redujo la concentración de sales del ultrafiltrado a 0 mOsm por litro, y produjo la desaparición de la actividad biológica, probablemente por adsorción de la molécula a la resina iónica (Uranga, 1971).

La incubación del ultrafiltrado de plasma conteniendo GP, con β -glucuronidasa, produce la desaparición de la actividad biológica. Si esta incubación se realiza en presencia de un inhibidor específico de la β -glucuronidasa, como la sacarolactona, el ultrafiltrado permanece activo (del Castillo et al., 1977), manifestando que existe alguna relación entre esta enzima y la actividad del ultrafiltrado.

Acción de la GP

Como se mencionó anteriormente, la acción de la GP ha sido estudiada en sapos enteros y en riñón aislado, donde se observó que produce una dilatación de la arteriola aferente del glomérulo (Uranga, 1973); de esta manera regula la presión dentro del glomérulo, y por lo tanto la filtración glomerular. El aumento de presión ureteral en el sapo, lo mismo que el aumento de filtración glomerular en la rata (Uranga and Fuenzalida, 1975) y en el perro (Uranga Julia et al., 1979 c) no va acompañado de modificación en la presión arterial sistémica.

En ratas con insuficiencia renal aguda la GP es más efectiva que el manitol para restablecer la filtración glomerular y el flujo urinario, ya que este último es eficaz sólo en períodos de anuria breves (30 min.), mientras que la GP restablece la filtración aún luego de 24 hs. de anuria. Esta acción de la GP no se manifiesta si se trata previamente a los animales con indometacina (Fuenzalida et al., 1980).

Las PGs son sustancias biológicamente activas, derivadas del ácido araquidónico, que están presentes en casi todas las células y ejercen su acción como mensajeros intracelulares u hormonas locales. La cascada del metabolismo del ácido araquidónico, que lleva a la formación de las PGs, comienza con la

oxigenación y ciclización del ácido graso para formar el endoperoxido cíclico PGG_2 . La enzima llamada "ciclo-oxigenasa" cataliza estas reacciones. La PGG_2 se convierte en otro endoperoxido, que se conoce como PGH_2 . Estas sustancias son inestables, y se rompen -a través de vías catalizadas o no catalizadas por enzimas- para dar los compuestos estables PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , y en algunas condiciones ácido 12-hidroxi-5, 8, 10 heptadecatrienoico. Los endoperoxidos cíclicos también son sustrato de la prostaciclina-sintetasa y la tromboxano-sintetasa, que los convierten en prostaciclina y TXA_2 respectivamente, dos productos inestables pero biológicamente muy potentes (Moncada and Vane, 1979). Se conocen drogas que actúan bloqueando algunos de estos pasos biosintéticos. La indometacina es un inhibidor competitivo de la ciclo-oxigenasa, que bloquea de manera irreversible la formación de las PGs en una de sus primeras etapas (Vane, 1971). La tranilcipromina inhibe la prostaciclina-sintetasa (Gryglewsky et al., 1976).

Algunos compuestos estimulan la síntesis y liberación de PGs por los tejidos, tales como la bradiquinina (Terragno et al., 1972), la angiotensina (Aiken and Vane, 1971), la histamina (Orehek et al., 1973) y las catecolaminas (Tothill et al., 1971). Como se ha indicado más arriba, la acción de la GP en la filtración glomerular de la rata se inhibe por tratamiento con indome-

tacina, sugiriendo una acción indirecta de la GP, a través de la estimulación de la síntesis de PGs.

La infusión de un ultrafiltrado conteniendo GP en la perra normal en anestro produce disminución del flujo sanguíneo ovárico. Se observó además que la perra diabética, que posee un nivel circulante de GP alto, presenta un flujo sanguíneo ovárico bajo en relación a la perra normal; este flujo se normaliza si el animal es tratado con indometacina, sugiriendo que este efecto estaría relacionado con la síntesis de PGs (Uranga and del Castillo, 1979 b).

Con el objeto de estudiar si la GP actúa en otros territorios vasculares, se observó su efecto en el flujo sanguíneo mesentérico del perro, viéndose que la infusión de GP disminuye la resistencia vascular del mesenterio. Esta acción desaparece si previamente se trata al animal con tranilcipromina, indicando que la actividad de la GP estaría relacionada con la síntesis de prostaciclina (del Castillo et al., 1981).

En el anfibio, los corazones linfáticos son los órganos propulsores que facilitan la circulación de la linfa desde los sacos linfáticos hacia el sistema venoso. Si se destruyen dichos corazones, la linfa se acumula en los sacos, produciendo la muerte del animal (Foglia and Gerschman, 1939). Se observó

que la GP ejerce un efecto sobre los corazones linfáticos del sapo, ya que aumenta el pasaje de un colorante vital (T-1824) desde el saco linfático abdominal hacia las venas. Este efecto se deja de observar si el animal se trata con indometacina. El tratamiento con tranilcipromina no modifica la acción de la GP sobre los corazones linfáticos, sugiriendo que este efecto estaría relacionado con la síntesis de alguna PG, pero no de prostaciclina (Bonetto et al., 1981).

La GP actúa "in vitro" sobre el músculo liso del fundus de estómago, el duodeno y la vejiga de la rata, produciendo el aumento de la TTC de estos tejidos. La sensibilidad del estómago es mayor que la del duodeno, y éste a su vez es más sensible que la vejiga (Uranga et al., 1979 a). Para eliminar la posible interferencia de autacoides presentes en el ultrafiltrado, se agregaron algunas drogas al baño del tejido. La atropina es un antagonista colinérgico, y la ciproheptadina es un antagonista de histamina y serotonina. El agregado de estas drogas no modifica la acción del ultrafiltrado de plasma en el fundus de estómago, indicando que la respuesta registrada no se debe a acetilcolina, histamina o serotonina. Por el contrario, si se añade indometacina o tranilcipromina al baño del tejido, la respuesta al ultrafiltrado conteniendo GP desaparece. Estas evidencias nue

vamente sugieren que la GP ejercería una acción indirecta en los tejidos efectores, asociada con la síntesis y liberación de PGs. La principal PG que sintetiza el fundus de estómago es la prostaciclina (Gryglewsky et al., 1976; Sun et al., 1977). El bloqueo de la respuesta de este tejido a la GP, debido al tratamiento con tranilcipromina, indica que posiblemente la síntesis de prostaciclina esté relacionada con la acción de la GP sobre el fundus de estómago (Uranga et al., 1979 a).

En trabajos anteriores se observó que el ultrafiltrado de plasma conteniendo GP produce la relajación de las arterias coronarias "in vitro" del perro. La prostaciclina es un importante metabolito del ácido araquidónico en todas las arterias y venas, y es un agente vasodilatador potente (Higgs and Moncada, 1983). El tratamiento previo de los tejidos con inhibidores de la síntesis de PGs, produjo la desaparición de la respuesta relajante de la GP (del Castillo et al., 1985). Esta evidencia refuerza la posible intervención de las PGs en el mecanismo de acción de la GP.

I. INTRODUCCION

La GP aumenta la presión ureteral del sapo y la TTC del fundus de estómago de la rata; en estos efectos se fundamentan los dos bioensayos utilizados para su detección.

El primero consiste en registrar el aumento de la presión ureteral del sapo, que refleja los cambios de presión de la cápsula de Bowman, producido por la inyección de 0,4 ml. de la muestra a probar, en la vena subclavia del animal (Uranga, 1967). Antes del ensayo, la muestra se concentra bajo vacío hasta un volumen 1/10 del original. Esta prueba sobre el animal entero, es específica para GP, si bien no es cuantitativa.

El otro bioensayo (Uranga et al., 1979 a) utiliza tiras aisladas de fundus de estómago de rata, que se mantienen en un baño de buffer KRBG adecuadamente oxigenado. Los tejidos desarrollan contracciones espontáneas, que se registran a través de un transductor de fuerza asociado a un polígrafo. El agregado de 2 ml. de ultrafiltrado de plasma conteniendo GP al baño de 20 ml. donde está sumergido el tejido, produce un aumento de la TTC que es proporcional a la cantidad de principio activo presente. En la figura II-1 se observa que existe una relación lineal entre el logaritmo de la dosis y la respuesta producida, en el

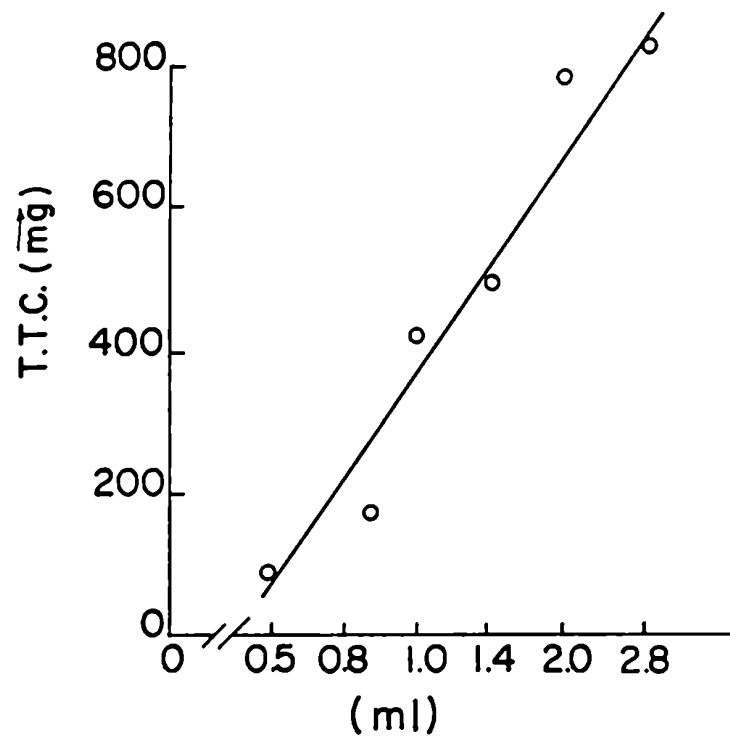


Figura II-1: Regresión lineal entre el logaritmo de la dosis de GP (en ml) y la tensión de las contracciones tónicas desarrolladas por el fundus de estómago de rata ($r=0,67$; $P < 0,001$). Cada punto refleja 10 ensayos, realizados en cinco animales diferentes.

rango de concentraciones utilizado (2,5 - 14% v/v). El ultrafiltrado de plasma conteniendo GP, incubado con β -glucuronidasa, pierde su actividad. El agregado de indometacina (10 μ g/ml) o de tranilcipromina (50 μ g/ml) al baño del tejido, 30 min. antes de añadir el ultrafiltrado activo, inhibe la acción de éste sobre el fundus de estómago. Se ha descrito que la indometacina inhibe a la ciclo-oxigenasa, enzima que cataliza uno de los primeros pasos de biosíntesis de las PGs (Vane, 1971), y la tranilcipromina inhibe a la prostaciclina-sintetasa impidiendo la síntesis de prostaciclina (Gryglewsky et al., 1976). La principal PG que sintetizan el fundus de estómago y el intestino delgado es la prostaciclina (Gryglewsky et al., 1976; Sun et al., 1977). La inhibición de la acción de GP sobre el fundus de estómago que estas drogas producen, sugiere la posible participación de estos lípidos biológicamente activos en la respuesta hormonal.

Los estudios realizados hasta la actualidad en relación a la GP, se han llevado a cabo con plasma conteniendo el principio activo, del que se separaron las proteínas y otras sustancias de peso molecular mayor de 500. Este ultrafiltrado contiene GP junto con otras moléculas pequeñas, que pueden interferir en los experimentos.

El objetivo de este trabajo fue purificar la GP. Para

esto se hizo necesario desarrollar primero algunos bioensayos que minimicen la cantidad de muestra requerida para la detección y cuantificación del principio activo. En segundo lugar conocer la termoestabilidad, susceptibilidad a la oxidación y condiciones óptimas de conservación de la actividad. Posteriormente, aprovechando la naturaleza polar de la molécula en estudio, utilizar distintos procesos separativos (extracción con solventes orgánicos, cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta presión) que permitan purificar la GP, sin alterar su actividad biológica.

2. MATERIALES Y METODOS

a. Micrométodos de dosaje

Bioensayo sobre el fundus de estómago:

Se usaron ratas Wistar hembras de aproximadamente 130 g. de peso, que se mataron por un golpe en la cabeza. Luego de practicar una incisión para extraer el fundus de estómago, éste se cortó en tiras de $0,3 \times 0,6 \text{ cm}^2$, que se sumergieron en buffer KRBG, pH 7,4. El buffer tuvo la siguiente composición: (mM) NaCl 121; KCl 4,83; CaCl_2 1,59; MgSO_4 1,34; KH_2PO_4 1,21; HNaCO_3 24,2; glucosa 11,1.

Se utilizaron los tubos de vidrio, especialmente diseñados, que se ven en la figura II-2, donde el tejido efector se sumergió en un baño de 300 μl . de buffer con burbujeo continuo de una mezcla gaseosa de 95% O_2 y 5% CO_2 , que penetró por el orificio (a). La tira de tejido se sujetó por un extremo a un punto fijo (b), y por el otro extremo se conectó a un transductor de fuerza (Gould Statham UC 3) asociado a un polígrafo (Grass Model 7D). Se aplicó una precarga de 500 $\overline{\text{mg}}$, luego de la cual las preparaciones se equilibraron durante una hora, para obtener un patrón de contracciones. La actividad mecánica se determinó en términos de TTC por encima de la tensión basal, y se expresó en $\overline{\text{mg}}$.

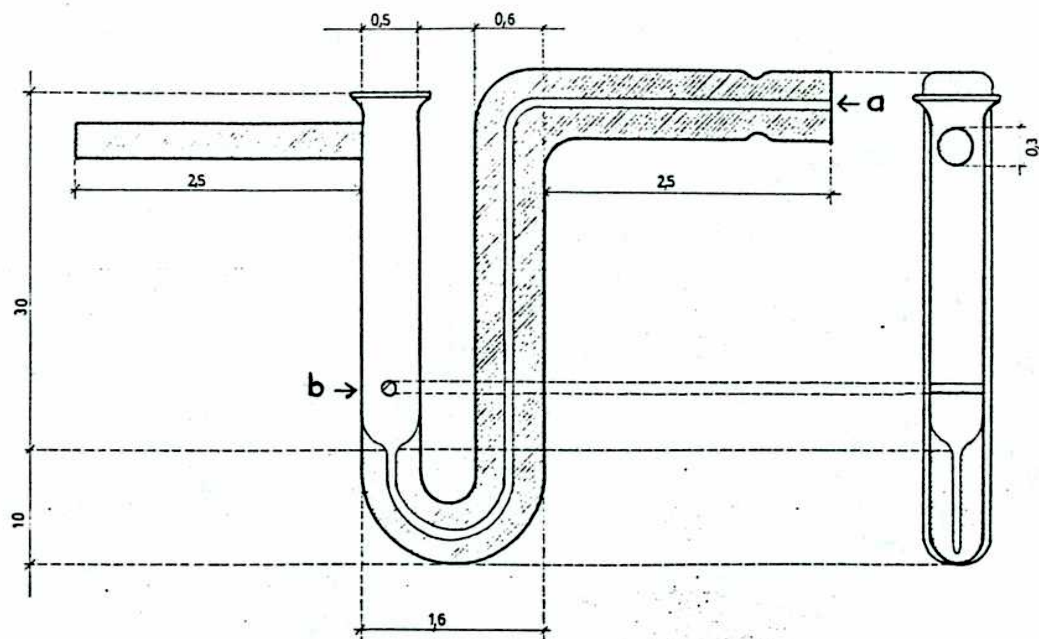


Figura II-2: Diseño del tubo utilizado en el micrométodo del fundus de estómago.

Bioensayo sobre la presión ureteral del sapo:

Se usaron sapos Bufo Arenarum Hensel machos de 150-180 g. de peso, medianamente hidratados, anestesiados con uretano 20% (10 ml/kg. peso corporal, inyectados en el saco linfático ventral). Las muestras se infundieron por una cánula en la arteria aorta, introduciéndola hasta por encima de las arterias renales. La infusión se realizó a una velocidad de 0,0136 ml/min. Las modificaciones de la presión ureteral se registraron a través de una cánula ubicada en el uréter, conectada a un transductor de presión (Statham D23 D_c) asociado a un polígrafo (Grass Model 7 D). Los animales se sometieron a un período de estabilización de 30 min., luego del cual se probaron las muestras.

b. Obtención de GP de perro

El ultrafiltrado conteniendo GP se obtuvo del plasma proveniente de la vena suprahepática de perros pancreatectomizados cinco días antes. Durante esos días los animales se trataron con dosis bajas de insulina (1 U/kg de peso corporal/día), a excepción del último día, que recibieron la mitad de la dosis. Durante este período ingirieron páncreas bovino (40 g/día), complementando su alimentación normal. Como anestésico se usó pento-

barbital sódico (33 mg/kg peso corporal, iv.). Dos horas antes de extraer la sangre, por vía yugular se perfundió solución fisiológica (0,97 ml/min.) y por vía femoral se perfundió insulina (monocomponente Lilly, Lote ID 404-24204) (150 μ U/min/kg peso corporal). Durante la extracción de la sangre, los animales recibieron una infusión continua de polivinilpirrolidona por la vena yugular. La sangre se centrifugó a 4°C, y el plasma se ultrafiltró a través de una membrana Diaflo YC-0.5 (del Castillo et al., 1977). Este ultrafiltrado conteniendo GP se guardó congelado hasta el momento de su uso.

c. Obtención de GP de rata .

Se usaron ratas de la cepa Sprague Dawley machos, de 250-300 g., anestesiadas con Hipnopeno (40 mg/kg peso corporal, ip.). El hígado se aisló colocando una cánula en la vena porta, y ligando la arteria hepática y la vena cava inferior.

Por la vena porta se infundió, durante 20 min., una solución de KRBG conteniendo glucagon (60 pg/ml.), saturado con una mezcla gaseosa de 95% O₂ - 5% CO₂, a pH 7,4, 38°C de temperatura, y 5 ml/min. de flujo. El líquido obtenido de la perfusión se recolectó a través de una cánula en la vena suprahepática, y

se centrifugó a 4°C. El sobrenadante se ultrafiltró a través de membranas Diaflo YC-0.5 (Uranga et al., 1982 a). El ultrafiltrado se guardó congelado hasta el momento de su uso.

d. Tratamiento con alúmina activada

La alúmina se activó por tratamiento con HCl, siguiendo la técnica descrita por Anton y Sayre (1962), luego de lo cual se guardó en un desecador colocado en una estufa a 37°C, hasta el momento de su uso.

El ultrafiltrado conteniendo GP se trató con alúmina activada, en una proporción de 40 mg/ml. de ultrafiltrado. La preparación se llevó a pH 8,6 con NaOH, y se agitó vigorosamente con vortex durante 5 min. El sobrenadante se separó por centrifugación, descartándose el precipitado de alúmina.

e. Extracción con n-butanol de GP de perro

El ultrafiltrado de plasma conteniendo GP se trató con alúmina. El sobrenadante de este tratamiento se acidificó a pH 4,0 con HCl concentrado, y se saturó con NaCl (si no se dice expresamente otra cosa). Se hicieron cinco extracciones con n-buta

nol, cada vez con 1/5 del volumen de muestra; al solvente se le añadió mercaptoetanol 1 mM. El extracto butanólico se lavó tres veces con agua a 0°C y pH 4,0 (cada vez con 1/5 del volumen de muestra) para lavar las sales que hubiera. El extracto se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 30°C, y se guardó en un desecador a 4°C hasta el momento de usarlo.

f) Extracción con n-butanol de GP de rata

El ultrafiltrado conteniendo GP, proveniente de la perfusión del hígado aislado de ratas, se evaporó a sequedad bajo vacío, en un baño a 30°C, luego de añadirle mercaptoetanol 1 mM. El residuo se guardó en un desecador a 4°C hasta el momento de usarlo, en que se disolvió en agua, trasvasándose a un tubo con tapa esmerilada, y se llevó a un volumen final de aproximadamente 10 ml. La muestra se acidificó a pH 4,0 con HCl concentrado, se saturó con NaCl, y se hicieron seis extracciones con 0,6 ml de n-butanol cada vez (al solvente se le agregó mercaptoetanol 1mM). El extracto se lavó tres veces con agua pH 4,0 a 0°C y se evaporó bajo corriente de nitrógeno en un baño a 30°C. El residuo se guardó en un desecador a 4°C hasta el momento de usarlo.

g. Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron placas de sílica gel con una sustancia fluorescente y soporte de aluminio (Merck, sílica gel 60 F₂₅₄; 20 x 20 cm.). Se sembró GF como sustancia de referencia. Las muestras se aplicaron en forma puntual (para cromatografías bi-dimensionales), o como bandas (en las demás corridas). Las placas se colocaron en cubas cerradas, perfectamente selladas, saturándose con los vapores de la fase móvil durante 15 min., y se desarrollaron usando la técnica ascendente. Durante las corridas la temperatura se mantuvo a 18°C. El desarrollo de los cromatogramas con las distintas fases móviles, requirió los siguientes tiempos: 180 min. con ácido acético, 155 min. con cloroformo 65-metanol 30-ácido fórmico 5 añadiendo mercaptoetanol 1 mM, 160 min. con acetato de etilo 40-n butanol 57-ácido fórmico 3 añadiendo mercaptoetanol 1 mM, 110 min. con piridina 50-metanol 49-ácido fórmico 1, 190 min. con n butanol 50-ácido acético 5-agua 10. Los cromatogramas se secaron, y se revelaron por observación bajo luz UV de 254 nm; en algunos casos se utilizaron los métodos de tinción que se indican más abajo. La sílica correspondiente a cada mancha se raspó, y se armaron pequeñas columnas, que se eluyeron con etanol absoluto, al que se añadió mercaptoetanol 1 mM. Estas muestras se evaporaron a sequedad ba-

jo corriente de nitrógeno en un baño a 30°C, y se guardaron a 4°C.

Se realizaron las siguientes tinciones para cromatografía en capa delgada:

- ácido sulfúrico 50%, según la técnica de Anthony et al. (1964).
- iodo, colocando la placa en una cámara saturada con vapores de iodo.
- ácido fosfórico, según la técnica de Neher et al. (1951).
- anhídrido acético-ácido sulfúrico, según la técnica de Michalec (1956).
- ninhidrina, según la técnica de Fahmy et al. (1961).
- 1,3-dinitrobenceno, según la técnica de Lisboa (1964).

h) Espectros de absorción de luz UV

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DB-G, con lámpara de hidrógeno, asociado a un registrador. Se hicieron registros de las muestras disueltas en etanol, y en agua (a pH 3 y 9).

i) Cromatografía líquida de alta presión

Se hizo cromatografía en fase reversa con dos equipos diferentes:

- Cromatógrafo Waters modelo 440, equipado con bomba M 6000, inyector U6K, detector UV variable (modelo 450) y UV fijo (modelo 440), y registrador con integrador. Se usó una columna de compresión radial RCM 100 C₁₈ de 10 cm. de largo (partículas de 5 μ) de Waters. Las corridas se hicieron a temperatura ambiente, a un flujo de 1 ml/min. Como fase móvil se usaron tres sistemas isocráticos:

- 1) agua 80 - metanol 20, pH 4,00
- 2) agua 80 - metanol 20, con acetato de sodio 0,05 M, pH 7,65
- 3) agua 20 - metanol 80

La muestra inyectada se disolvió en la fase móvil 1).

- Cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 1084 B equipado con detector UV variable. Se usó una columna Ultrasphere ODS (partículas de 5 μ), de 25 cm. de largo x 1 cm. de diámetro interno. Las corridas se hicieron a temperatura ambiente, a un flujo de 3 ml/min. La muestra inyectada se disolvió en metanol. Se usó la fase móvil metanol 70 - agua 30.

j) Incubaciones con β -glucuronidasa

Se usó β -glucuronidasa de hígado bovino, tipo B-10 (Sigma Chem. Co.). La enzima se disolvió directamente en las mues

tras, que previamente se habían acidificado con HCl a pH 4,5. Las preparaciones se incubaron a 38°C durante 1 hora.

k) Estadística

Los resultados se compararon con el test de la "t" de Student para muestras pareadas, considerándose significativamente diferentes cuando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

a. Micrométodos de dosaje

Bioensayo sobre el fundus de estómago de rata:

Utilizando los tubos descritos en Materiales y Métodos, se registró la respuesta producida por el agregado de 30 μ l de ultrafiltrado de plasma conteniendo GP, al baño del tejido, de 300 μ l. La GP produjo un aumento de la TTC, que se expresó en $\bar{m}g$. En la figura II-3 un registro muestra la tensión desarrollada por el agregado de GP al baño del tejido, que aparece sobreimpuesta al tono muscular.

Por la adición de distintos volúmenes de ultrafiltrado conteniendo GP, se obtuvo la curva dosis-respuesta de la figura II-4. Este gráfico se muestra como una respuesta biológica normal, que a concentraciones hormonales bajas presenta una relación lineal, mientras que a mayores concentraciones el sistema se satura. La respuesta máxima, dentro de la zona de linealidad, es la que se obtiene con una concentración 10% (v/v), por lo que se utilizó esta relación para los sucesivos ensayos.

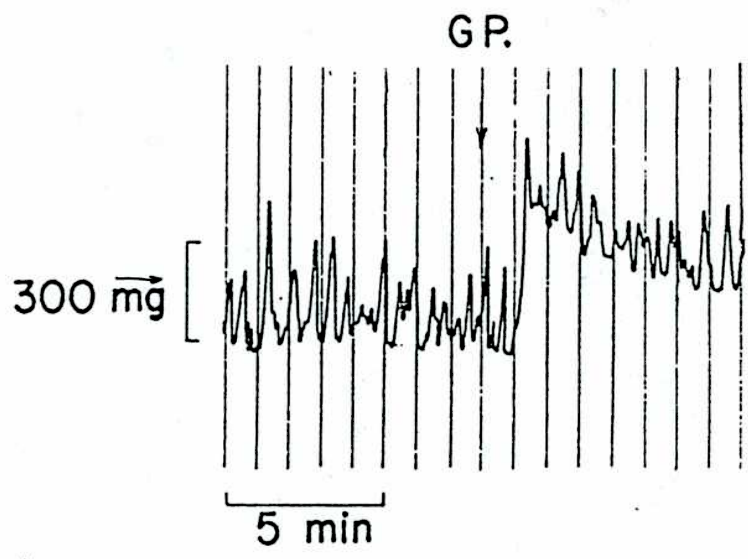


Figura II-3: Registro de la acción de GP sobre el fundus de estómago de rata "in vitro".

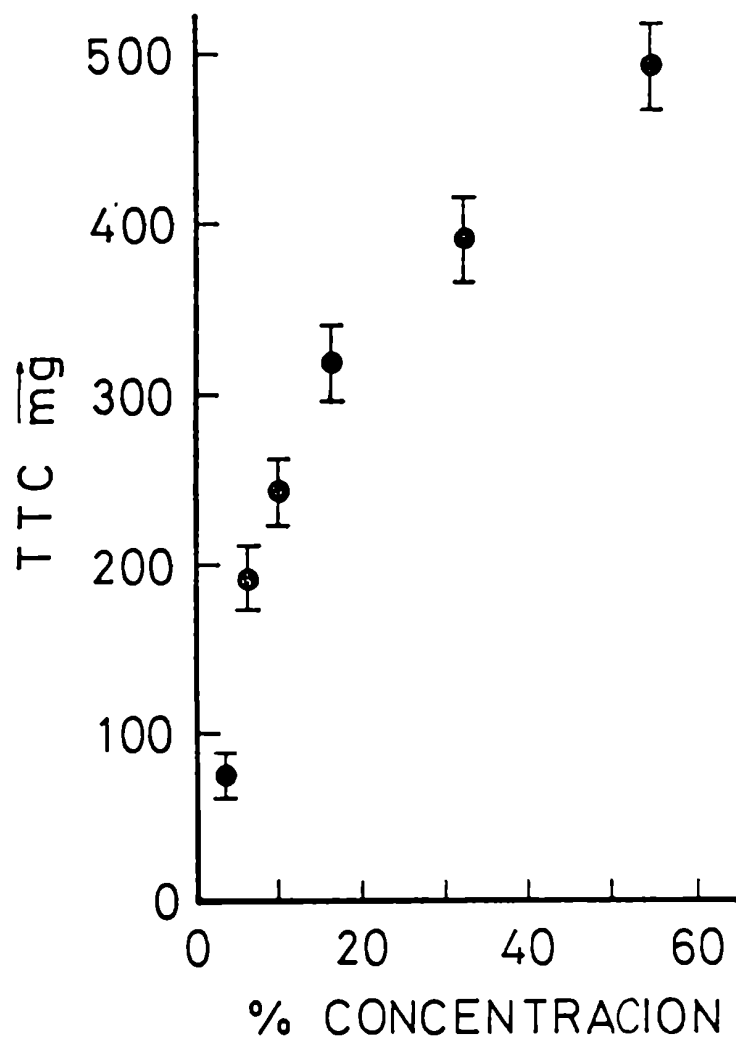


Figura II-4: Curva dosis-respuesta de GP sobre el fundus de esófago de rata. Los puntos indican el promedio de 18 ensayos; las líneas verticales indican el error estándar.

En trabajos anteriores se había observado que el ultrafiltrado conteniendo GP pierde su actividad por incubación con β -glucuronidasa (del Castillo et al., 1977; Uranga et al., 1979a). Por este motivo se ensayó la actividad biológica del ultrafiltrado antes y después de su incubación con esta enzima (300 unidades/ml.). La actividad disminuyó significativamente con este tratamiento ($P < 0,005$; $n=6$).

En este micrométodo se utilizan cantidades de muestra casi 100 veces menores que las utilizadas en el método clásico descrito por Uranga et al. (1979 a). En la tabla II-1 se comparó la sensibilidad de ambos bioensayos. Allí se observa que el micrométodo, además de consumir menos sustancia, tiene la ventaja de ser más sensible, pues la relación entre la respuesta obtenida y el volumen de muestra usada es casi treinta veces mayor en el micrométodo que en el método clásico.

	μl de muestra usada	Aumento de la TTC (mg) $\bar{x} \pm \text{EE}$	Relación entre respuesta y volumen de muestra usada (mg/ μl)
Micrométodo	30	244 ⁺ ₋ 38(18)	8,13
Macrométodo	2800	850 ⁺ ₋ 119(10)	0,30

Tabla II-1: Aumento de la TTC de tiras de estómago de rata, producido por el agregado de ultrafiltrado de plasma conteniendo GP de perro. Comparación entre micro y macrométodos de ensayo. \bar{x} indica el valor medio; EE indica el error estándar; entre paréntesis se indica el n° de ensayos.

Bioensayo sobre la presión ureteral del sapo:

La GP aumenta la presión ureteral sin modificar la presión arterial (Uranga, 1963). Esta acción, específica de la GP, dio origen al bioensayo descrito por Uranga (1967). Con el objeto de disminuir la cantidad de muestra requerida para esta prueba, se le hizo la siguiente modificación: en vez de inyectar la sustancia en estudio por la vena subclavia, ésta se infundió por la arteria aorta, a través de una cánula introducida hasta por encima de las arterias renales; la arteria aorta se ligó en la zona de su bifurcación. De esta manera la muestra llega directamente al riñón, evitando la dilución en el torrente sanguíneo del animal.

Se hicieron los controles correspondientes para verificar que la infusión de KRB a ese flujo no alteraba la presión ureteral. Por otra parte, se verificó que la ligadura practicada en la arteria aorta no modifica la presión arterial.

La figura II-5 muestra el registro obtenido al infundir con este método el ultrafiltrado de plasma conteniendo GP. Se observa que pocos minutos después de comenzada la infusión, la presión ureteral aumenta. En trabajos anteriores se ha observado que este cambio no se acompaña de modificaciones en la presión arterial (Uranga, 1963; Uranga and Fuenzalida, 1975).

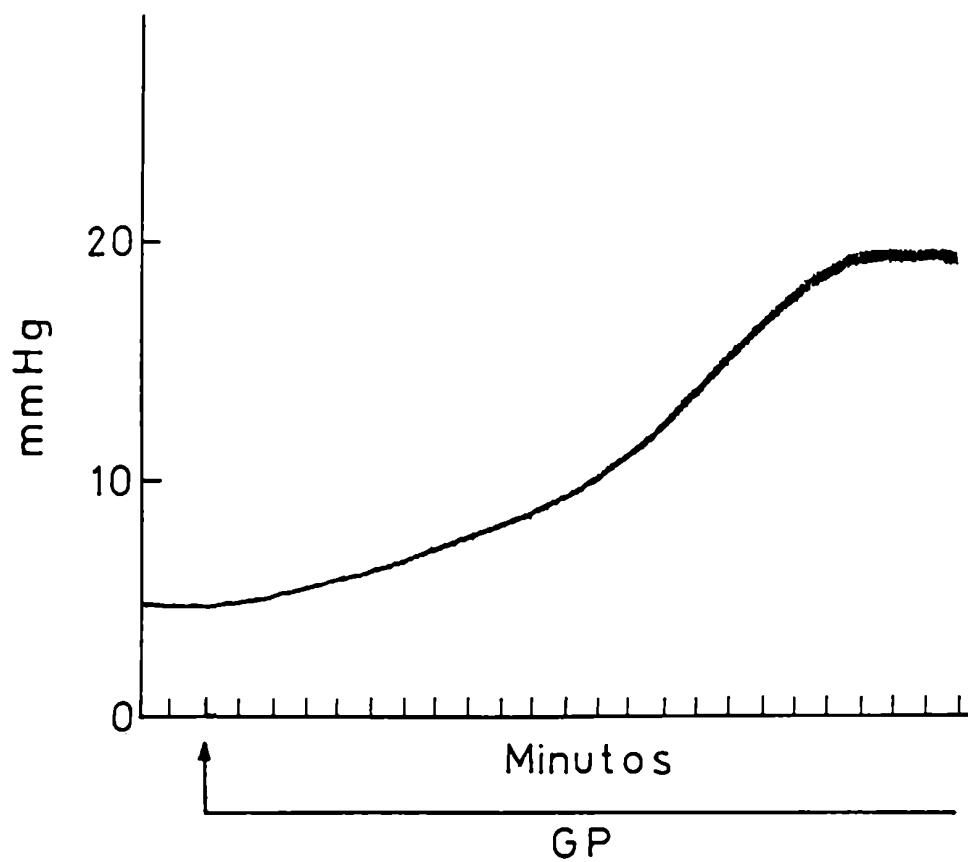


Figura II-5: Efecto de la infusión de ultrafiltrado de plasma conteniendo GP sobre la presión ureteral del sapo. La flecha indica el comienzo de la infusión.

Usando esta metodología es posible consumir un volumen diez veces menor de muestra que el utilizado en el bioensayo descrito por Uranga (1967).

b. Termoestabilidad

Se construyó una curva para estudiar la pérdida de actividad con el tiempo, incubando el ultrafiltrado conteniendo GP a 60°C durante 1, 2, 3 y 4 horas. Se eligió esta temperatura para impedir el crecimiento de microorganismos durante la incubación, ya que el agregado de agentes antibacterianos interfiere en el ensayo biológico del fundus de estómago de rata. En la figura II-6 se observa el aumento de la TTC producido por las muestras luego de la incubación. Los resultados se expresaron como el porcentaje respecto a la respuesta del control (ultrafiltrado sin incubar), que fue de $284 \pm 78 \text{ mg}$ (n=11). La actividad biológica no se modificó en un período de hasta 2 horas, pero disminuyó significativamente al prolongar la incubación durante 3 horas ($P < 0,0005$).

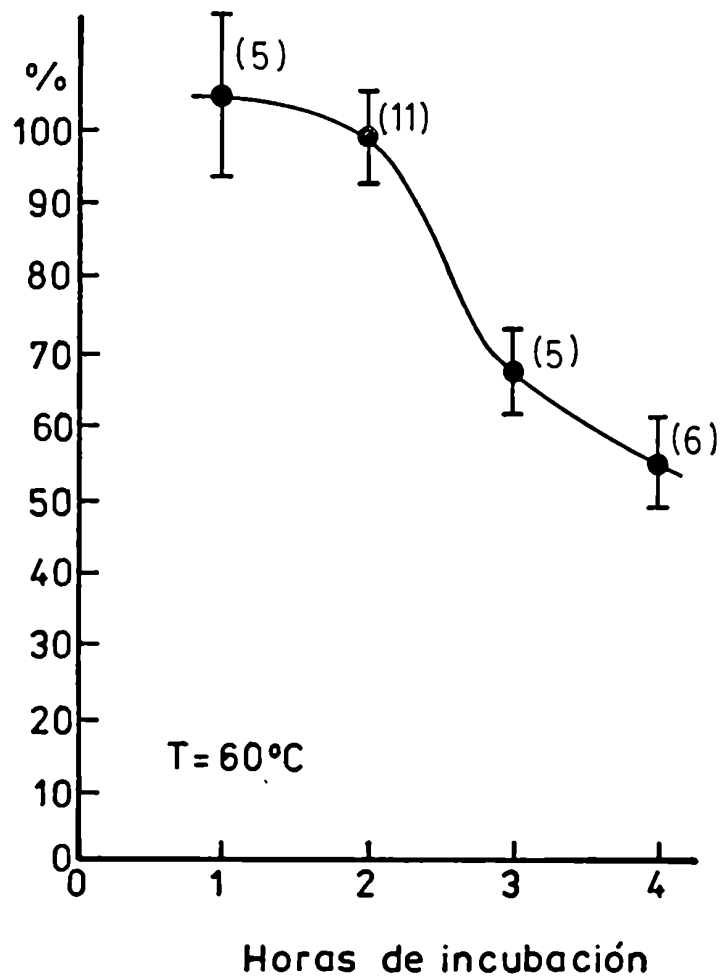


Figura II-6: Efecto del tiempo de incubación a 60°C sobre la actividad biológica del ultrafiltrado de plasma conteniendo GP. Los valores se expresan como el porcentaje respecto al control. Los puntos indican la media; las líneas verticales indican el error estándar; entre paréntesis se indica el n° de ensayos.

c. Susceptibilidad a la oxidación

Como se mencionó en el punto anterior, la actividad del ultrafiltrado conteniendo GP, disminuye significativamente si se incubaba a 60°C por un período de 3 ó más horas. Se quiso averiguar si este efecto se podría evitar por el agregado de un agente reductor, y si por otra parte se acentuaba con la presencia de un agente oxidante.

Como medio reductor se eligió mercaptoetanol, por ser hidrosoluble. Se probó agregar distintas cantidades de esta sustancia en el bioensayo del fundus de estómago, encontrándose que su presencia en concentraciones hasta 5 mM en el ultrafiltrado no modificaba la respuesta de la GP ni las contracciones espontáneas del tejido. Como medio oxidante se utilizó una corriente continua de oxígeno sobre la muestra. Se construyó una curva para ver la pérdida de actividad con el tiempo, incubando el ultrafiltrado conteniendo GP a 60°C durante 1, 2 y 3 horas, en presencia de mercaptoetanol 5 mM o de oxígeno.

En la figura II-7 se observan los resultados obtenidos con el micrométodo sobre el fundus de estómago, expresados como el porcentaje respecto a la respuesta del control (ultrafiltrado sin incubar), que tuvo una actividad media de $274 \pm 82 \overline{\text{mg}}$ (n=10). El agregado de mercaptoetanol 5 mM impidió la pérdida de actividad

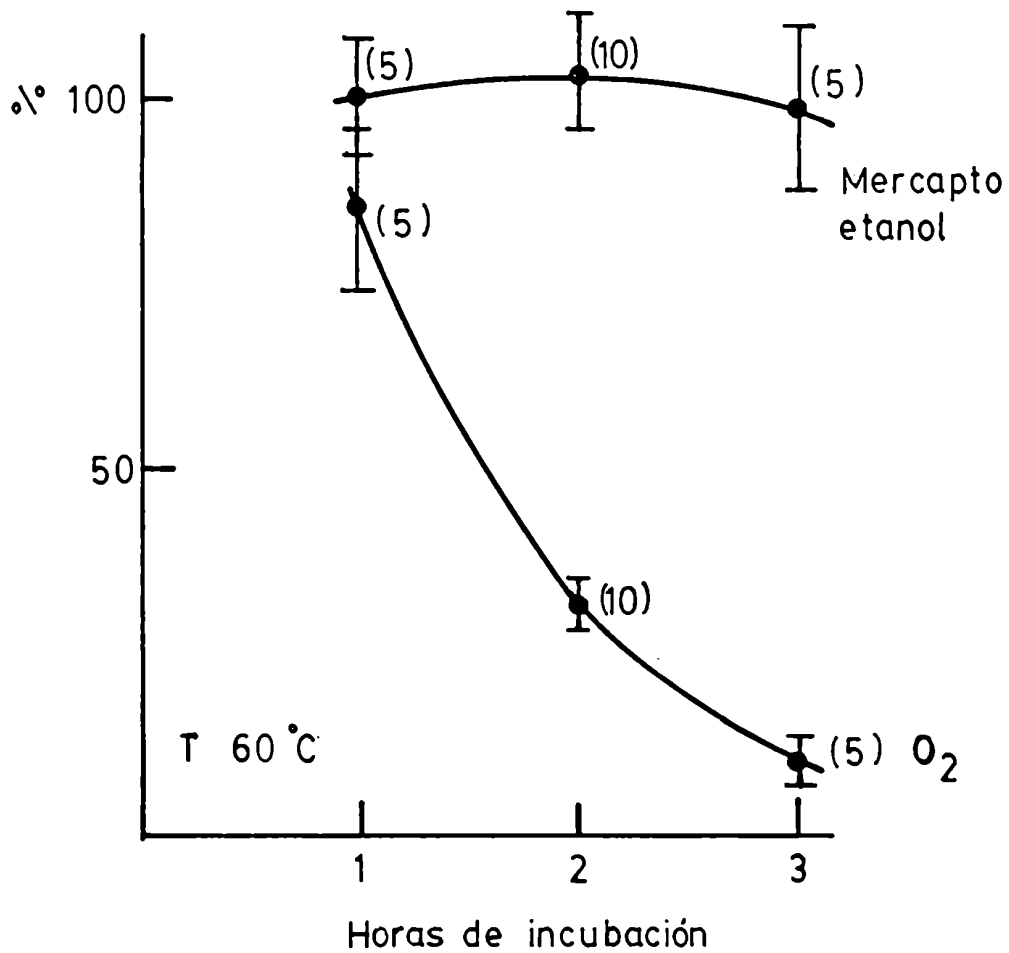


Figura II-7: Efecto del mercaptoetanol y del oxígeno sobre la actividad biológica del ultrafiltrado de plasma conteniendo GP, incubado a 60°C. Los valores se expresan como el porcentaje respecto al control. Los puntos indican la media; las líneas verticales indican el error estándar; entre paréntesis se indica el número de ensayos.

del ultrafiltrado, que produce la incubación a 60°C durante 3 hs. La presencia del oxígeno ocasionó una disminución significativa de la actividad biológica ($P < 0,005$) aún con períodos más cortos de incubación (2 hs.).

Estos hechos sugieren que la molécula en estudio es susceptible a la oxidación, y que el mercaptoetanol es un protector eficaz del principio activo.

d. Condiciones de conservación

Se investigó de qué manera convenía guardar las muestras con GP para que conserven su actividad biológica. Se tomó como control el ultrafiltrado con GP de perro, que había sido congelado sólo una vez. Se descongelaron muestras iguales de ultrafiltrado, y se guardaron durante cinco días en tres condiciones diferentes: recongelada a -10°C, en solución a 4°C, y evaporada a sequedad, a 4°C. Luego de este período de tiempo, la muestra evaporada a sequedad se disolvió en un volumen igual al original de KRBG y se probó la actividad de las tres muestras en el bioensayo del fundus de estómago.

En la tabla II-2 se resumen los datos, expresados como porcentaje respecto al aumento de la TTC producido por el ultra-

Condición	Aumento de la TTC (%) $\bar{x} \pm EE$	P
Recongelado a -10°C	80 \pm 7	<0,025
En solución a 4°C	56 \pm 5	<0,0005
Evaporado a sequedad, a 4°C	35 \pm 10	<0,005

Tabla II-2: Actividad de GP después de guardar el ultrafiltrado durante cinco días en diferentes condiciones. Los resultados se expresan como el porcentaje respecto a la acción del ultrafiltrado congelado una sola vez.

\bar{x} indica el promedio de 6 ensayos; EE indica el error estándar; P indica el nivel de significación respecto al control.

filtrado control ($220 \pm 39 \overline{\text{mg}}$; n=6). Se observó una disminución significativa de la actividad en las tres condiciones utilizadas, si bien la pérdida fue menor en la muestra recongelada.

Además se investigó si un medio de baja concentración salina favorecía la conservación del principio activo. Para extraer la sustancia en estudio, precipitando la mayor parte de las sales del ultrafiltrado, se utilizó la propiedad de que la GP es soluble en etanol (Uranga, 1971).

El experimento se realizó guardando congelada durante diez días una parte de la muestra. Otra parte igual de la misma se trató con alcohol etílico, separando el precipitado por centrifugación; el sobrenadante se evaporó a sequedad, se redisolvió en un volumen de agua igual al original, y se guardó congelada durante el mismo período de tiempo. Finalmente se probó la actividad biológica de ambas fracciones en el micrométodo del fundus de estómago. El ultrafiltrado congelado provocó un aumento de la TTC de $215 \pm 83 \overline{\text{mg}}$ (n=6), y el extracto etanólico tuvo una actividad de $235 \pm 70 \overline{\text{mg}}$ (n=6). La semejanza entre estos valores indica que la diferente concentración salina no modifica la conservación del principio activo.

e. Tratamiento con alúmina

El óxido de aluminio activado adsorbe selectiva y cuantitativamente las amins catecólicas (Anton and Sayre, 1962). Se comparó la actividad biológica del ultrafiltrado conteniendo GP en el fundus de estómago, antes y después del tratamiento con alúmina. Esta técnica requiere alcalinizar la muestra a pH 8,6 , por este motivo se verificó previamente que el ultrafiltrado a pH 7,2 producía la misma respuesta que a pH 8,6.

La muestra original desarrolló un aumento de la TTC de $424 \pm 46 \text{ mg}$, y la muestra tratada con alúmina $362 \pm 42 \text{ mg}$, en los 17 ensayos realizados. Si bien la diferencia media es pequeña ($61 \pm 18 \text{ mg}$), resulta estadísticamente significativa ($P < 0,005$). Estos datos sugieren que las catecolaminas, que se pueden separar por adsorción sobre alúmina activada, producen una disminución de la respuesta del fundus de estómago al ultrafiltrado conteniendo GP.

f. Extracción con solventes orgánicos

La GP no se extrae con acetato de etilo, pero es soluble en etanol y se une a la resina de intercambio iónico Amberlite MB-3 (Uranga, 1971). Estos hechos indican su naturaleza polar,

que sugirieron el uso de un solvente polar, el n-butanol, para su extracción. Para favorecer el pasaje del principio activo a la fase orgánica, se acidificó el medio a pH 4,0 y se adicionaron sales, aumentando así la fuerza iónica del medio.

El ultrafiltrado de plasma conteniendo GP se trató con alúmina activada, que se separó por centrifugación. El sobrenadante se dividió en dos partes, una de las cuales se saturó con NaCl y la otra con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; este último presenta una mayor solubilidad en agua, por lo que parecía el más adecuado para aumentar la fuerza iónica. Ambas muestras se acidificaron a pH 4,0 y se extrajeron con n-butanol como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos se evaporaron a sequedad y los residuos se disolvieron en un volumen igual al original de KRBG, probándose la actividad de los mismos en el bioensayo del fundus de estómago. La muestra obtenida por saturación con NaCl produjo un aumento de la TTC de $341 \pm 56 \text{ mg}$ (n=14) que corresponde a un $69 \pm 6 \%$ de la actividad del ultrafiltrado original. En cambio, la muestra saturada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provocó una respuesta de $67 \pm 27 \text{ mg}$ (n=6), lo que equivale a un $11 \pm 4 \%$ de la actividad del ultrafiltrado original.

Estos resultados sugieren que el n-butanol extrae el principio activo del ultrafiltrado de plasma acidificado a pH 4,0

y saturado con NaCl, pero no lo hace de la muestra saturada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El bicensayo del estómago de rata es más sensible pero menos específico para GP que el de la presión ureteral de sapo. Por lo tanto, se probó la actividad biológica del extracto butanólico, obtenido luego de saturar con NaCl, en el método clásico de medición sobre el sapo descrito por Uranga (1967). La muestra produjo un aumento de la presión ureteral en los cuatro animales ensayados, de 6, 6, 19 y 29 mm Hg.

Se realizó el dosaje de Na^+ y K^+ por fotometría de llama, tanto en el ultrafiltrado como en el extracto butanólico. En la tabla II-3 se observan los valores individuales obtenidos de las muestras de tres animales, y se ve que la fase butanólica posee una cantidad de sales considerablemente menor que el ultrafiltrado. Por lo tanto, la extracción con n-butanol permite separar el principio activo de compuestos muy polares como las sales, presentes en el ultrafiltrado de plasma; esto posibilita obtener muestras concentradas en el principio activo, sin que a su vez se concentren las sales, que interfieren en los experimentos.

Perro	Na ⁺ (meq / l)		K ⁺ (meq / l)	
	Ultrafiltrado	Extracto butanólico	Ultrafiltrado	Extracto butanólico
Nº 37	147,0	2,9	4,8	0,0
Nº 39	177,5	1,2	4,0	0,1
Nº 41	181,8	1,3	4,1	0,0

Tabla II-3: Dosaje de Na⁺ y K⁺ en ultrafiltrado y extracto butanólico del mismo, proveniente del plasma de perros pancreatoc-tomizados.

Se realizaron extracciones sucesivas para continuar la separación del principio activo. Para esto, el ultrafiltrado de plasma conteniendo GP se trató con alúmina, a pH 8,6. Las sustancias no polares se extrajeron con n-hexano, descartándose la fase orgánica. La fase acuosa se acidificó a pH 4,0, se saturó con NaCl, y se hicieron extracciones con n-butanol. Este extracto se lavó con agua a pH 4,0 y 0°C, se evaporó parcialmente, y se le agregó la mitad de su volumen de n-hexano, para disminuir la constante dieléctrica del medio. Se hicieron extracciones con agua amoniacal, a pH 9, descartándose la fase orgánica. La fase acuosa se evaporó a sequedad, y se agregó acetona 50 %, induciéndose la precipitación de algunas sustancias, por raspaje con una varilla de vidrio. El sobrenadante y el precipitado se separaron por centrifugación; ambas fracciones se evaporaron a sequedad, y los residuos se llevaron a la concentración original disolviéndose en KRBG. La actividad de estas muestras se probó con el método del fundus de estómago. El sobrenadante produjo un aumento de la TTC del 63 ± 14 % respecto al ultrafiltrado original, mientras que el precipitado tuvo un 4 ± 2 % de la actividad inicial, en los seis ensayos realizados. Esto indica la presencia del principio activo en el sobrenadante de acetona 50 %, luego de las extracciones sucesivas mencionadas.

g. Cromatografía en capa delgada

Cromatografía unidimensional:

Se partió de ultrafiltrado conteniendo GP de plasma de perros pancreatoprivos, que se trató con alúmina activada y se extrajo con n-butanol, como se indica en Materiales y Métodos. El extracto se sembró en una capa delgada de sílica gel, y se desarrolló con ácido acético puro.

La figura II-8 muestra el aspecto del cromatograma, luego del revelado con luz UV, iodo, y ácido sulfúrico 50 %. Las placas usadas contenían una sustancia fluorescente, por lo tanto su observación bajo luz UV permitió detectar la aparición de manchas que con los otros métodos de tinción usados no se vieron, por ser éstos menos sensibles: el ácido sulfúrico 50 %, altamente inespecífico, reveló la aparición de cuatro manchas; el iodo, que forma aductos con compuestos aromáticos y dobles ligaduras en general, sólo reveló la aparición de tres manchas.

Para cada mancha se calcularon el R_f y el R_{GF} ; estos valores figuran en la tabla II-4.

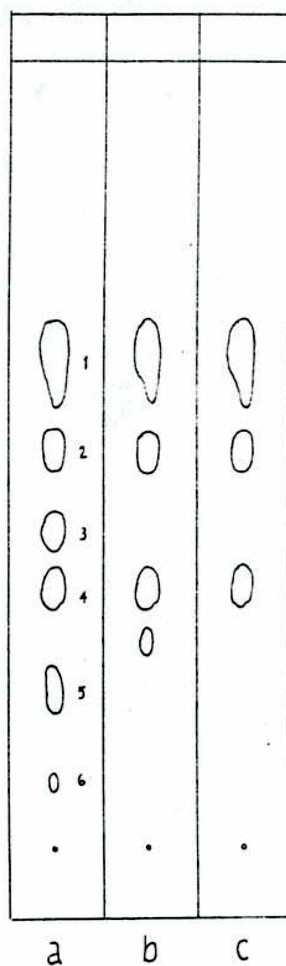


Figura II-8: Separación de componentes del extracto butanólico conteniendo GP, proveniente del perro, por cromatografía en capa delgada. Fase móvil: ácido acético. a= observación bajo luz UV; b= tinción con ácido sulfúrico 50 %; c= tinción en cámara de iodo. Las manchas se numeraron como se indica en la figura.

	R_f	R_{GF}
GF	0,41	---
Mancha 1	0,62	1,51
Mancha 2	0,50	1,22
Mancha 3	0,41	1,00
Mancha 4	0,33	0,80
Mancha 5	0,20	0,49
Mancha 6	0,08	0,20

Tabla II-4: Cromatografía en capa delgada de sílica gel del extracto butanólico conteniendo GP, proveniente del perro. Fase móvil: ácido acético.

Luego de eluir las sustancias de la placa, se probó la actividad de cada zona del cromatograma en los bioensayos del fun dus de estómago y la presión ureteral. La única mancha que tuvo actividad de GP en ambos bioensayos es la de $R_f = 0,41$ ($R_{GF} = 1$). Esta mancha produjo un aumento de la TTC de $227 \pm 47 \text{ } \overline{\text{mg}}$ ($n=6$); por incubación previa con β -glucuronidasa (615 unidades/ml), la actividad disminuyó significativamente ($P < 0,005$) a un valor medio de $47 \pm 30 \text{ } \overline{\text{mg}}$ ($n=6$). Esta mancha, en el sapo, aumentó la presión ureteral en 12 y 15 mm Hg. Como se observa, al usar ácido acético como fase móvil, la mancha con actividad de GP recorrió la misma distancia que el GF, por lo cual este glucurónido se siguió sembrando como sustancia de referencia.

Debido a que el ultrafiltrado conteniendo GP, obtenido por perfusión del hígado de rata, tiene menos sustancias que el proveniente del perro pancreatoprivo (ver Discusión), y además se obtiene en mayor cantidad mediante un procedimiento sencillo, se estudió el aislamiento de GP de rata, aplicando las técnicas que resultaron adecuadas para la purificación de la GP proveniente del perro: extracción con n-butanol y cromatografía en capa delgada de sílica gel.

Se partió de ultrafiltrado conteniendo GP, proveniente de la perfusión del hígado aislado de ratas, que se trató con

alúmina activada y se extrajo con n-butanol. El extracto se sembró en una capa delgada de sílica gel, y se desarrolló con ácido acético puro. La observación de la placa bajo luz UV reveló la presencia de tres manchas, cuyos valores de R_f y R_{GF} se indican en la tabla II-5. Como se dijo más arriba, la placa obtenida en las mismas condiciones a partir de ultrafiltrado proveniente del perro presentó seis manchas, confirmando que el extracto butanólico obtenido con el líquido de perfusión del hígado de rata contiene menos sustancias que el proveniente del plasma de perro pancreatoprivo.

Cuando la fase móvil se reemplazó por la mezcla cloroformo 65 - metanol 30 - ácido fórmico 5, a la que se añadió mercaptoetanol 1 mM, el extracto proveniente de la rata se separó en nueve manchas reveladas bajo luz UV, como se ve en la figura II-9; las manchas 8 y 9 no siempre se observaron. La tabla II-6 indica los valores de R_f y R_{GF} correspondientes a cada mancha.

Se determinó la actividad biológica de las distintas zonas del cromatograma. Para esto se raspó y eluyó la sílica correspondiente a cada mancha. Luego de evaporar el eluyente, las muestras se disolvieron en KRBG, probándose la actividad de las mismas en los dos bioensayos descritos en Materiales y Métodos. La mancha 6 produjo una contracción de $312 \pm 68 \text{ mg}$ (n=5) en el

	R_f	R_{GF}
GF	0,46	---
Mancha 1	0,67	1,47
Mancha 2	0,53	1,16
Mancha 3	0,34	0,74

Tabla II-5: Cromatografía en capa delgada de sílica gel del extracto butanólico conteniendo GP, proveniente de la rata. Fase móvil: ácido acético.

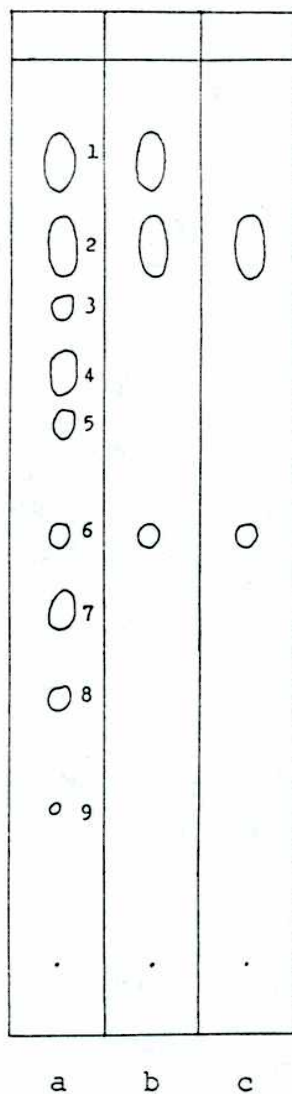


Figura II-9: Separación de componentes del extracto butanólico conteniendo GP, proveniente de la rata, por cromatografía en capa delgada. Fase móvil: cloroformo 65-metanol 30-ácido fórmico 5 a la que se añadió mercaptoetanol 1 mM. a= observación bajo luz UV; b= tinción con ácido sulfúrico 50 %; c= tinción en cámara de iodo. Las manchas se numeraron como se indica en la figura.

	R_f $\bar{x} \pm EE$	R_{GF} $\bar{x} \pm EE$
GF	$0,65 \pm 0,01$	---
Mancha 1	$0,88 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,02$
Mancha 2	$0,82 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,02$
Mancha 3	$0,75 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,02$
Mancha 4	$0,67 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,02$
Mancha 5	$0,60 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,02$
Mancha 6	$0,47 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$
Mancha 7	$0,40 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,01$
Mancha 8	$0,34 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,01$
Mancha 9	$0,19 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$

Tabla II-6: Cromatografía en capa delgada del extracto butanólico conteniendo GP proveniente de rata. Fase móvil: cloroformo 65 - metanol 30 - ácido fórmico 5, a la que se añadió mercaptoetanol 1 mM.
 \bar{x} indica la media de 11 placas; EE indica el error estandard.

fundus de estómago; las demás manchas resultaron inactivas. En el bioensayo del sapo, la mancha 6 aumentó la presión ureteral en 7, 14, 16 y 19 mm Hg, en los cuatro animales ensayados; los valores observados son muy significativos para este método. Las otras muestras no tuvieron actividad.

Estos resultados indican que la mancha de $R_f = 0,47 \pm 0,01$ ($R_{GF} = 0,72 \pm 0,01$) tiene actividad de GP tanto sobre el estómago de rata como sobre el riñón de sapo.

Con el objeto de averiguar aproximadamente la naturaleza química de la mancha activa, se llevaron a cabo las siguientes reacciones de coloración:

- Tinción con ácido sulfúrico 50 %: después de aplicar el reactivo y calentar la placa, la mancha activa se tiñó de violeta, volviéndose parda al enfriar; observada bajo luz UV de 254 nm presentó fluorescencia.
- Tinción con yodo: la mancha activa se tiñó al colocar el cromatograma en una cámara saturada con vapores de yodo.
- Tinción con ácido fosfórico 50 %: se pulverizó el reactivo, se calentó la placa y se miró bajo luz UV de 360 nm: la mancha activa presentó una fluorescencia blanca intensa; a la luz del día se observó marrón-amarillenta.
- Tinción con anhídrido acético-ácido sulfúrico: el reactivo, re

cién preparado, se roció sobre la placa, que luego se calentó.

La mancha activa se tiñó de violeta, y se tornó marrón al enfriar la placa, sin embargo no se observó fluorescencia bajo luz UV de 360 nm.

- Tinción con ninhidrina: se aplicó el reactivo y calentó la placa; la mancha activa no se coloreó.

- Tinción con 1,3-dinitrobenzeno: el reactivo se pulverizó sobre la placa, que luego se calentó. No se produjo coloración de la mancha activa.

Cromatografía bidimensional:

Con el objeto de conocer si la mancha activa proveniente de la rata estaba constituida por una o varias sustancias, se hicieron cromatografías en dos direcciones, haciendo pasar el segundo solvente en dirección perpendicular a la que corrió el primer solvente.

La primera fase móvil usada fue cloroformo 65 - metanol 30 - ácido fórmico 5, a la que se añadió mercaptoetanol 1 mM.

Cuando se usó como segunda fase móvil la mezcla acetato de etilo 40 - n-butanol 57 - ácido fórmico 3, con el añadido de mercaptoetanol 1 mM, la mancha activa, que en la primera dirección

presentó un $R_{GF} = 0,74$, al correr en la segunda dirección se desplazó muy poco ($R_f = 0,11$) mientras que el GF corrió más ($R_f=0,55$), de manera que $R_{GF} = 0,21$. Estos datos indican que el segundo solvente separó mucho más el GF de la mancha activa, que lo que lo hizo la primera fase móvil. La mancha activa dio lugar a una única mancha cuando se corrió en la segunda dirección.

Cuando se usó como segunda fase móvil la mezcla piridina 50 - metanol 49 - ácido fórmico 1, la mancha activa, que en la primera dirección presentó un $R_{GF} = 0,72$, al correr en la segunda dirección se desplazó con un $R_{GF} = 0,76$, y nuevamente dio lugar a una mancha única en la segunda dirección.

Al utilizar la mezcla n-butanol 50 - ácido acético 5 - agua 10 como segunda fase móvil, la mancha activa presentó un $R_f = 0,32$, y se resolvió en una sola mancha.

h. Espectros de absorción de luz UV

En la figura II-10 se presenta el espectro de absorción de la mancha activa proveniente de la rata, disuelta en etanol. Se observa un pico a 220-224 nm y otro a 275-280 nm.

El espectro de la mancha disuelta en agua presentó el mismo aspecto, no registrándose efecto batocrómico por cambio de pH de 9 a 3.

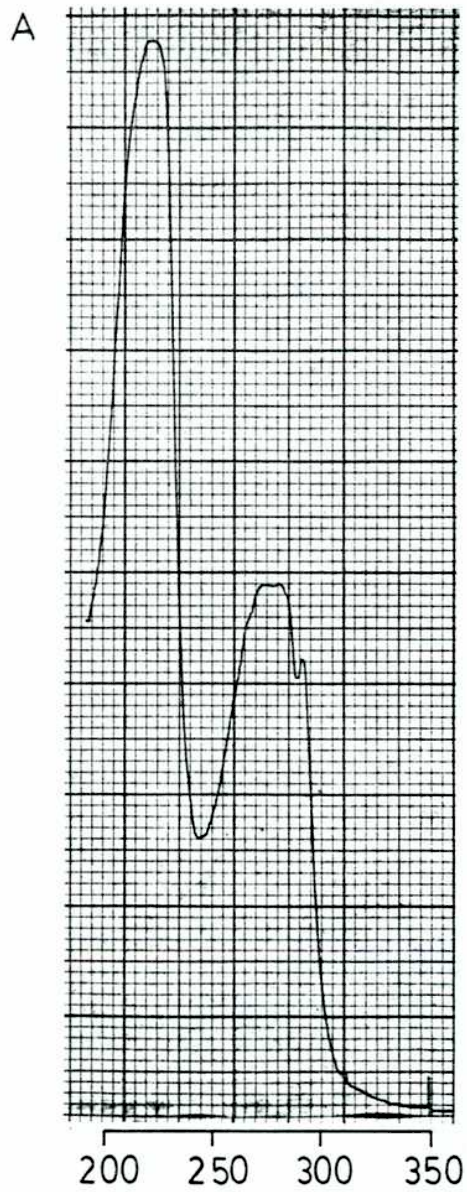


Figura II-10: Espectro de absorción de luz UV de la mancha activa obtenida por cromatografía en capa delgada del extracto conteniendo GP de rata.

i. Cromatografía líquida de alta presión

Para reafirmar la posibilidad de que la mancha activa proveniente de la rata, esté constituida por una sola sustancia, como sugieren las cromatografías bidimensionales realizadas, se hizo cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.

De acuerdo a las características del espectro de absorción de luz UV de la mancha activa, se utilizaron detectores de absorbancia que se fijaron a 220 y 280 nm, registrándose los dos cromatogramas simultáneamente. Ambos presentaron un aspecto similar.

Al utilizar la columna de compresión radial, se obtuvieron los siguientes resultados:

- cuando se usó la fase móvil agua 80 - metanol 20 a pH 4,00 en una corrida de 15 min. no se observó ningún pico, indicando que la sustancia en estudio quedaría muy retenida;

- cuando se usó la fase móvil agua 80 - metanol 20 con acetato de sodio 0,05 M a pH 7,65 apareció un único pico con un $t_r = 6,08$ min, como puede observarse en la figura II-11. Los últimos cinco minutos de la corrida el flujo se aumentó tres veces, para favorecer la salida de sustancias que quedarán más retenidas; no se observó ningún otro pico. En la figura II-12 se muestra el cromatograma obtenido cuando la fracción de $t_r = 6,08$ min

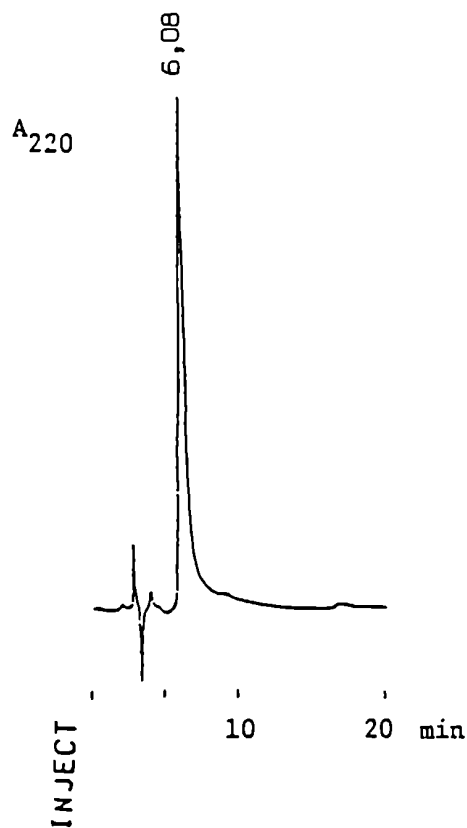


Figura II-11: Cromatografía líquida de alta presión de la mancha activa, obtenida por cromatografía en capa delgada del extracto conteniendo GP de rata. Los picos pequeños que aparecen a t_R menor que 4 min. son artificios de la técnica. Entre los 15 y 20 min. se triplicó el flujo de la fase móvil.

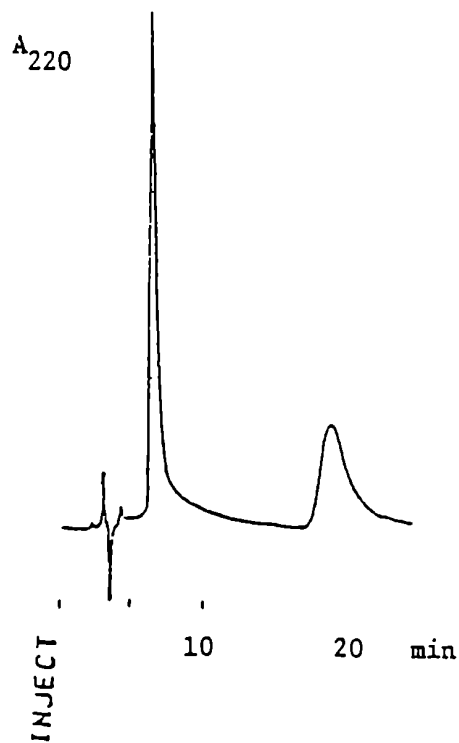


Figura II-12: Cromatografía líquida de alta presión de la mancha activa, obtenida por cromatografía en capa delgada del extracto conteniendo GF de rata. El pico de $t_r = 6,08$ min. se recicló, dando lugar al pico de $t_r = 18,5$ min.

se recicló, dando lugar a un pico único, más ancho y bajo que el anterior.

- cuando se usó la fase móvil metanol 80 - agua 20, apareció un pico a $t_r = 3,94$ min.

Al utilizar una columna de muy alta resolución, como lo es la Ultrasphere ODS de las características mencionadas en Materiales y Métodos, con la fase móvil metanol 70 - agua 30, se obtuvo un único pico a $t_r = 10,63$ min.

4. DISCUSION

En el sapo, la presión que se registra en el uréter ocluido es igual a la presión en la cápsula de Bowman y responde precisa y rápidamente a las variaciones de presión de dicha cápsula (Uranga, 1965). En estos animales, la presión en la cápsula de Bowman es igual a la presión hidrostática del capilar glomerular menos la presión oncótica del plasma. Por lo tanto la presión ureteral se puede considerar como índice de la presión glomerular. La GP se describió por primera vez por su acción sobre el riñón del sapo, donde produce el aumento de la presión ureteral sin modificar la presión arterial (Uranga, 1967). En un trabajo posterior se estudió la acción de la GP en la actividad contráctil del músculo liso, encontrándose que produce el aumento de la TTC del fundus de estómago de rata "in vitro" (Uranga et al., 1979 a). Los ensayos empleados para la detección de esta hormona se fundamentaron en estos efectos biológicos.

En el presente trabajo se intentó purificar el principio activo de los demás componentes plasmáticos, de donde surgió la necesidad de contar con métodos de detección de la hormona que consumieran la menor cantidad posible de material. De esta manera

la muestra podría ser sometida a sucesivos procesos separativos.

Los bioensayos en que se utiliza músculo liso requieren una elevada sensibilidad y especificidad. Esto se puede lograr:

- 1° minimizando el volumen del baño del tejido aislado;
- 2° usando un órgano sensible y relativamente específico para la sustancia en estudio (Vane, 1983).

Teniendo en cuenta el 1° punto, se desarrolló un micrométodo de dosaje de GP utilizando pequeños tubos de vidrio, donde el tejido se sumergió en un baño de 300 μ l. Por la adición de distintos volúmenes de ultrafiltrado conteniendo GP, se realizó una curva dosis-respuesta. A bajas concentraciones, existe una relación lineal entre ambas, mientras que a mayores concentraciones se observa saturación de la respuesta. La máxima contracción dentro de la zona lineal corresponde a la dosis de 10 % (v/v), por lo que se utilizó esta relación en los sucesivos ensayos.

En cuanto a la especificidad del tejido, el fundus de estómago de rata responde con una contracción, al agregado de GP y de otras sustancias que son: dopamina, angiotensina II, bradiquinina, PGs E_2 , $F_{2\alpha}$, G_2 , H_2 , prostaciclina y TXA_2 ; adrenalina

y noradrenalina producen la relajación muscular (Vane, 1983). En nuestras preparaciones se utilizaron muestras previamente ultrafiltradas con membranas que retienen las moléculas de peso molecular elevado, y por lo tanto angiotensina II y bradiquinina quedaron retenidas. Las PGs (a excepción de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$) y TXA_2 son moléculas de vida media corta, por lo que se inactivaron en el proceso de obtención del ultrafiltrado, que dura veinte horas. Por otra parte, las catecolaminas presentes podrían interferir en las respuestas del fundus de estómago a GP.

El óxido de aluminio activado adsorbe selectiva y cuantitativamente las aminas catecólicas (Anton and Sayre, 1962), por lo tanto los ultrafiltrados conteniendo GP se trataron con alúmina activada antes del ensayo en el fundus de estómago. Se observó que luego de este tratamiento, los ultrafiltrados producían una contracción algo menor, que sugiere que las catecolaminas presentes en los ultrafiltrados modifican levemente la respuesta a GP. Al eliminar dopamina, adrenalina y noradrenalina de los ultrafiltrados, se consiguió del fundus de estómago la elevada especificidad requerida para la sustancia en estudio.

Se comparó la sensibilidad de este micrométodo con la

del bioensayo clásico descrito por Uranga et al (1979 a) donde el tejido se sumergía en baños de 20 ml. El micrométodo, que consume volúmenes casi cien veces menores de muestra, resulta más sensible, pues la relación entre la respuesta obtenida y el volumen de muestra usada se incrementa casi treinta veces en el micrométodo respecto al método clásico.

Como se dijo anteriormente, la GP aumenta la presión ureteral del sapo, sin modificar la presión arterial. Esta acción dio lugar al desarrollo de un bioensayo de alta especificidad para la GP, en el que la muestra se aplica por una inyección en bolus por la vena subclavia (Uranga, 1967). En el presente trabajo se desarrolló un micrométodo en el que las muestras se perfundieron por la arteria aorta, a la altura de las arterias renales. De esta manera las muestras llegaron directamente a los riñones, evitando la dilución en el torrente sanguíneo del animal. Con este método se consumió un volumen de sustancia diez veces menor que el utilizado en el bioensayo clásico descrito por Uranga.

El bioensayo sobre la presión ureteral del sapo es específico para la sustancia en estudio, pero no es cuantitativo, indicando solamente la presencia o ausencia de GP en las muestras ensayadas. En cambio el bioensayo sobre el fundus de

estómago de rata permite el dosaje del principio activo y una evaluación estadística de los datos.

Con el objeto de conocer si la GP es estable durante períodos prolongados de incubación a una temperatura relativamente alta (60°C), se realizó una curva de la pérdida de actividad con el tiempo, que mostró que la actividad se mantiene durante 2 hs. de incubación, y que a las 3 hs. disminuye significativamente. Esta disminución se pudo evitar con la presencia de un agente reductor (mercaptoetanol) en el medio de incubación. Por otra parte, la exposición al oxígeno aceleró la caída de la actividad, que se observó a las 2 hs. Estos hechos sugieren que la molécula en estudio es susceptible a la oxidación, y que el mercaptoetanol es un protector eficaz de la actividad.

Se investigaron las mejores condiciones de conservación, observándose que ésta no se modificaba por la diferente concentración salina del medio. Se encontró que las muestras mantenían mejor su actividad congeladas a -10°C que a 4°C, ya sea en solución o evaporadas a sequedad.

En trabajos anteriores se observó que la actividad de GP del ultrafiltrado proveniente del plasma de perro pancreatoprivo, disminuía significativamente por incubación con β -glucuronidasa (del Castillo et al., 1977; Uranga et al., 1979a). En

el presente trabajo, esto se confirmó en el micrométodo del fun
dus de estómago. Del Castillo et al. (1977) encontraron que la
actividad de GP no se modificaba si en el medio de incubación
se agrega sacarolactona, un inhibidor específico de la β -glucur
onidasa. Arany et al. (1982) observaron un aumento de actividad
de GP en el líquido obtenido por perfusión del hígado aislado de
ratas tratadas con 3-4 benzopirene, que estimula la síntesis de
glucurónidos; por otra parte, si la perfusión se realizaba en
animales tratados con novobiocina, que entre otros efectos inhib
e la síntesis de glucurónidos, el líquido obtenido presentaba
una actividad de GP menor. Estas evidencias sugerían que la mo
lécula en estudio podría ser un glucurónido, en concordancia
con la observación de la naturaleza polar del principio activo.
Esto motivó la utilización de métodos comunes de purificación
de glucurónidos, como la extracción con solventes de alta polar
idad.

En la literatura existen numerosos trabajos donde se
utilizan alcoholes no miscibles con agua, o mezcla de ellos, pa
ra extraer glucurónidos de esteroides. Los que se usan más fre
cuentemente son los que contienen entre tres y ocho átomos de
carbono; en general los alcoholes de cadena acíclica normal
tienen un poder mayor para extraer glucurónidos que los derivau

dos iso- del mismo alcohol (Jayle, 1966). Por este motivo se in tentó extraer el principio activo con n-butanol. Considerando que los glucurónidos menos polares se extraen fácilmente de so- luciones neutras, pero los más polares requieren eventualmente un medio ácido y la adición de sales para lograr fuerza iónica alta, la extracción se realizó a pH 4,0 y en un medio saturado en sales. Esto último sería favorable, además, para evitar la formación de emulsiones y para disminuir la disolución del bu- tanol en agua. Se probó saturar el medio con NaCl y con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pensándose que este último sería el más convenien- te debido a su mayor solubilidad en agua. Partiendo de ultrafil- trado de plasma de perro conteniendo GP, se encontró que el principio activo se extrajo con n-butanol de la fase acuosa a pH 4,0 cuando ésta se saturó con NaCl, pero no cuando se usó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El extracto butanólico conservó la actividad de GP medida tanto en el bioensayo del fundus de estómago como en el de la presión ureteral del sapo. Al realizar los dosajes de Na^+ y K^+ se observó que el extracto butanólico posee una cantidad de sales considerablemente menor que el ultrafiltrado. Por lo tanto, la extracción con n-butanol permite separar el principio activo de compuestos muy polares, como las sales, presentes en el ultrafiltrado de plasma; esto posibilita obtener muestras

concentradas en el principio activo, sin que a su vez se concentren las sales, que interfieren en los experimentos.

Los componentes del extracto butanólico se separaron por cromatografía en capa delgada de sílica gel, usando ácido acético como fase móvil, que produjo la aparición de seis manchas. De éstas, sólo una mancha tuvo actividad de GP tanto en el bioensayo del estómago de rata como en el del riñón de sapo, la de $R_f = 0,41$, que migró la misma distancia que el GF. En concordancia con observaciones anteriores, la incubación de la mancha activa con β -glucuronidasa disminuyó significativamente su actividad, medida en el fundus de estómago.

La GP proveniente del perro se obtiene del plasma de animales pancreatectomizados, por lo que el ultrafiltrado contiene (además de todos los componentes normales del plasma), las sustancias producidas por el hígado de un animal diabético (aumento de glucosa, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, lípidos totales, etc.). En cambio la GP proveniente de la rata se obtiene del líquido perfundido a través del hígado aislado, que contiene KRBG más lo producido por un hígado normal, y por lo tanto es más puro. Además la técnica de obtención del ultrafiltrado conteniendo GP del plasma de perro implica la pancreatectomía del animal, tratamiento durante cinco días, y la pos

terior recolección del plasma; por este procedimiento se obtienen unos 50 ml. de ultrafiltrado por semana. En cambio la perfusión del hígado de la rata permite obtener ese volumen de ultrafiltrado de cada rata, de manera sencilla, pudiéndose operar varias ratas cada día.

Se intentó la purificación de GP de rata aplicando las técnicas que resultaron adecuadas para el aislamiento de la GP proveniente de perro: extracción con n-butanol y cromatografía en capa delgada de sílica gel.

El ultrafiltrado del líquido obtenido por perfusión del hígado aislado de rata, conteniendo GP, se extrajo con n-butanol y cromatografió en capa delgada de sílica gel, usando ácido acético como fase móvil. Se produjo la aparición de sólo tres manchas, confirmando que este extracto contiene menos sustancias que el proveniente del plasma de perro pancreatoprivo.

Cuando la fase móvil se reemplazó por la mezcla cloroformo 65 - metanol 30 - ácido fórmico 5, a la que se añadió mercaptoetanol 1 mM, el extracto proveniente de la rata se separó en nueve manchas. De éstas, sólo una tuvo actividad de GP en el estómago de rata y el riñón de sapo, la de $R_f = 0,47^{+0,01}$ ($R_{GF} = 0,72^{+0,01}$).

Con el objeto de conocer aproximadamente la naturaleza

za química de la mancha activa procedente de la rata, se llevaron a cabo algunas coloraciones para capa delgada. El ácido sulfúrico desarrolla color especialmente con el colesterol, esteroides y ácidos biliares. La mancha activa rociada con este reactivo se tiñó de violeta al calentar la placa, y al enfriarse presentó fluorescencia bajo luz UV de onda corta. La mancha activa proveniente del perro no se coloreó con este reactivo; la diferencia podría deberse a una cuestión de cantidad, ya que en el caso del perro se partió de muestras de un volumen veinte veces menor. El ácido fosfórico reacciona con los esteroides y ácidos biliares produciendo fluorescencia. La mancha activa procedente de la rata desarrolló fluorescencia con este reactivo, al observarse bajo luz UV de longitud de onda larga. Estos resultados indican la posible presencia en la mancha activa de un esteroide o sustancia relacionada. Sin embargo, el reactivo de Liebermann-Burchard (anhídrido acético - ácido sulfúrico) para colesterol y glicósidos triterpenoides que posean una función ceto en posición 6 ó 7, ó un oxhidrilo en posición 6, no reaccionó con la mancha activa aislada de la rata. La ninhidrina, que colorea los aminoácidos, aminas y aminoazúcares, no reaccionó con esta mancha, indicando que no poseería nitrógeno terminal libre. El reactivo de Zimmerman

(1,3-dinitrobenceno) que reacciona con ciclopentanonas, no produjo tinción de la mancha activa aislada de la rata, indicando que no poseería este grupo funcional.

Con el objeto de conocer si la mancha activa proveniente de la rata estaba constituida por una o varias sustancias, se hicieron cromatografías bidimensionales. Se usó como primera fase móvil la mezcla cloroformo 65 - metanol 30 - ácido fórmico 5, a la que se añadió mercaptoetanol 1 mM. Esta mezcla interacciona con la muestra formando puentes de hidrógeno. En la segunda fase móvil se utilizaron solventes que mantienen otro tipo de interacciones con la muestra. Se realizaron cromatografías bidimensionales con tres mezclas diferentes para el segundo desarrollo:

- acetato de etilo 40 - n-butanol 57 - ácido fórmico 3 con el añadido de mercaptoetanol 1 mM, que a las interacciones por puente de hidrógeno, agrega las dipolares debidas al acetato de etilo;

- piridina 50 - metanol 49 - ácido fórmico 1, que a la formación de puentes de hidrógeno, agrega las interacciones de dispersión debidas a la piridina;

- n-butanol 50 - ácido acético 5 - agua 10 que interacciona por formación de puentes de hidrógeno, pero posee

una composición muy diferente a la mezcla usada como primera fase móvil.

En las tres cromatografías bidimensionales desarrolladas, la mancha activa proveniente de la rata dio lugar a una única mancha en la segunda dirección, como si se tratara de una sustancia pura.

Se realizó el espectro de absorción de luz UV de la mancha activa en etanol, que resultó similar al obtenido en agua. Se observaron picos de absorción a 220-224 nm y a 275-280 nm, lo que revela la probable existencia de grupos cromóforos conjugados. No se registró efecto batocrómico por el cambio de pH de 3 a 9, lo que sugiere que la sustancia en estudio no poseería grupos fenólicos libres.

Procurando reafirmar la posibilidad de que la mancha activa aislada de la rata esté constituida por una sola sustancia, se recurrió a un método de mayor resolución: la cromatografía líquida de alta presión. Debido a la elevada polaridad de la molécula en estudio, se hizo cromatografía en fase reversa. Con una columna analítica de compresión radial se hicieron corridas con diferentes fases móviles. Utilizando agua 80 - meta nol 20, con acetato de sodio 50 mM, pH 7,65, el cromatograma mostró un sólo pico a $t_r = 6,08$ min.; cuando este pico se reci

cló, dio lugar a un pico único, más ancho y bajo que el anterior, como se esperaría si se tratara de una sustancia pura. Con la fase móvil metanol 80 - agua 20 el cromatograma mostró un pico único a $t_r = 3,94$ min. Para verificar estas observaciones se utilizó una columna Ultrasphere de muy alta resolución. La corrida se desarrolló con metanol 70 - agua 30, a un flujo tres veces mayor que el usado antes, y se observó un único pico a $t_r = 10,63$ min.

Estos resultados sugieren que por tratamiento del ultrafiltrado proveniente de la rata con alúmina, extracción con n-butanol y cromatografía en capa delgada de sílica gel, se obtiene una única mancha con actividad de GP que se comporta como una sustancia pura en diferentes condiciones de cromatografía bidimensional y cromatografía líquida de alta presión.

Esto indicaría que la mancha activa posee un grado de pureza suficiente para aplicar los métodos de identificación que permitan conocer su estructura molecular.

5. SUMARIO

Se intentó la purificación de GP. Para esto se desarrollaron dos micrométodos de detección que minimizan la cantidad de muestra utilizada. Se observó que el ultrafiltrado conteniendo GP de perro mantiene su actividad durante 2 hs. de incubación a 60°C, disminuyendo significativamente a las 3 hs. Esta pérdida de actividad se evitó con la presencia de un agente reductor; un agente oxidante aceleró la disminución de la actividad a 2 hs. Se observó que la mejor condición de conservación es mantener las muestras a -10°C, y que la concentración salina del medio no tiene influencia sobre la actividad. Se pudieron eliminar las catecolaminas por tratamiento con alúmina activada, conservándose la actividad de GP. El principio activo se extrajo con n-butanol de la fase acuosa acidificada y saturada con NaCl. La cromatografía en capa delgada del extracto butanólico conteniendo GP de perro, desarrollado con ácido acético, se separó en seis manchas. De éstas, sólo una presentó actividad en los dos bioensayos para GP, la de $R_f = 0,41$ ($R_{GF} = 1$). Usando las mismas condiciones, el extracto butanólico conteniendo GP de rata se resolvió en tres manchas. Al cam-

biar la fase móvil por la mezcla cloroformo 65 - metanol 30 - ácido fórmico 5, con el agregado de mercaptoetanol 1 mM, este extracto se separó en nueve manchas, de las cuales sólo una tuvo actividad en los dos bioensayos para GP, la de $R_f = 0,47^{+0,01}$ ($R_{GF} = 0,72^{+0,01}$). Esta mancha no se tiñó con ninhidrina, sugiriendo que no posee nitrógeno terminal libre, ni con 1,3-dinitrobenzeno, que colorea las ciclopentanonas. En cambio, se tiñó de violeta cuando se calentó la placa rociada con ácido sulfúrico; además desarrolló una intensa fluorescencia blanca con ácido fosfórico. Los dos últimos reactivos indican la posibilidad de que en la mancha activa haya una estructura de tipo esteroideal, que reaccione con los ácidos mencionados.

Con el objeto de conocer si la mancha activa estaba compuesta por una o varias sustancias se realizaron cromatografías bidimensionales. Usando tres mezclas de solventes diferentes como segunda fase móvil, la mancha activa dio lugar a una única mancha en la segunda dirección. Se hizo cromatografía líquida de alta presión de la mancha activa. Usando tres distintas fases móviles se obtuvo un único pico. Por lo tanto, con los métodos separativos mencionados, se logró obtener una mancha con actividad de GP sobre el fundus de estómago y sobre la

CAPITULO III

ACCION DE GLOMERULOPRESINA

SOBRE VENAS Y ARTERIAS

"IN VITRO"

1. INTRODUCCION

En el sapo, la presión que se registra en el uréter ocluído es igual a la presión en la cápsula de Bowman y responde precisa y rápidamente a las variaciones de presión de dicha cápsula (Uranga, 1965). En estos animales, la presión en la cápsula de Bowman es igual a la presión hidrostática del capilar glomerular menos la presión oncótica del plasma. Por lo tanto la presión ureteral se puede considerar como índice de la presión glomerular. La GP aumenta la presión ureteral sin modificar la presión arterial (Uranga, 1967). Este efecto se produciría por dilatación de la arteriola aferente del glomérulo (Uranga, 1973).

La infusión de un ultrafiltrado conteniendo GP en la perra normal en anestro produce la disminución del flujo sanguíneo ovárico. Se observó además que la perra diabética, que posee un nivel circulante de GP alto, presenta un flujo sanguíneo ovárico bajo en relación a la perra normal; el flujo se normaliza si el animal se trata con indometacina, un inhibidor de la síntesis de PGs (Vane, 1971). Esta observación sugiere que el efecto de la GP estaría relacionado con la síntesis de PGs (Uranga and del Castillo, 1979 b).

En trabajos anteriores se estudió la acción de la GP en el flujo sanguíneo mesentérico del perro, y se observó que la infusión de un ultrafiltrado conteniendo GP disminuye la resistencia vascular del mesenterio. Las PGs producen un importante efecto vasomotor directo en el mesenterio (Bunting et al., 1976). Con el objeto de conocer la posible participación de estas hormonas en la acción de la GP en el mesenterio, algunos animales se trataron con tranilcipromina. Esta droga inhibe la síntesis de prostaciclina (Gryglewsky et al., 1976). Se observó que el efecto del ultrafiltrado conteniendo GP desaparece en los animales previamente tratados con tranilcipromina, indicando que la prostaciclina podría intervenir en este efecto (del Castillo et al., 1981).

Estos experimentos, realizados "in vivo", muestran que la GP es activa en el sistema vascular y postulan una acción local de la misma en los vasos sanguíneos, ya que no se produce modificación en la presión arterial.

Los estudios sobre el sistema vascular realizados "in vitro" son de gran utilidad para conocer lo concerniente a la producción y degradación local de sustancias vasoactivas, independizándose de la inervación de los vasos sanguíneos. En trabajos anteriores se observó que el ultrafiltrado de plasma con

teniendo GP disminuyó el tono basal de las arterias coronarias "in vitro" del perro. La corticosterona inhibe la síntesis de PGs a nivel de la fosfolipasa A_2 (Flower, 1974). La aspirina, al igual que la indometacina, inhibe a la ciclo-oxigenasa (Vane, 1971). Como se dijo antes, la tranilcipromina inhibe a la prostaciclina-sintetasa (Gryglewsky et al., 1976). El tratamiento de los tejidos con alguna de estas drogas eliminó la respuesta producida al agregar GP, indicando que la síntesis de PGs, y en particular de prostaciclina, estaría relacionada con el efecto relajante observado (del Castillo et al., 1985).

Las PGs, sustancias derivadas del ácido araquidónico, son muy activas en el sistema vascular, y en algunos casos producen acciones opuestas; por ejemplo, el TXA_2 es vasoconstrictor y la prostaciclina es vasodilatadora (Higgs and Moncada, 1983). Existen otros derivados del ácido araquidónico, que reciben el nombre genérico de LTs, que también son vasoactivos (Piper, 1983).

En este trabajo se investigó:

- 1° la acción "in vitro" de la GP sobre el tono muscular de diferentes arterias y venas;
- 2° si los vasos sanguíneos activos describen una relación dosis-respuesta;

2. MATERIALES Y METODOS

a. Preparaciones "in vitro"

Se estudió la acción de GP sobre arterias y venas del perro, y sobre venas de rata, hamster y conejo. Los perros se anestesiaron con pentobarbital (33 mg/kg peso corporal) y los otros animales se mataron con un golpe en la cabeza. Se utilizaron 96 perros, 13 ratas, 6 hamsters y 2 conejos. Para que los trozos de vaso sanguíneo obtenidos de los distintos animales correspondiera siempre a la misma zona, se ubicaron las secciones de acuerdo a sus relaciones anatómicas. Cada trozo de una misma arteria o vena estudiada se extrajo de distintos animales, en el caso de perros y ratas. Los diferentes vasos sanguíneos se colocaron en un baño de buffer KRBG a 37°C, de la siguiente composición: (mM) NaCl 120,5; KCl 4,8; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,3; H₂KPO₄ 1,2; NaHCO₃ 24,2; glucosa 11,1. El buffer se burbujeó continuamente con una mezcla 95% O₂ - 5% CO₂. Allí se limpiaron del tejido no vascular circundante; a partir de cada segmento vascular de rata, hamster y conejo, se cortó una tira longitudinal de 1 cm., mientras que en el caso del perro se cortaron anillos. Cada trozo de tejido se colocó en un baño de 1 ml. de buffer KRBG, sujetándose con hilos de algodón por un extremo

a un punto fijo, y por el otro a un transductor de fuerza (Gould Statham UC 3) asociado a un polígrafo (Grass Modelo 7 D). Se aplicó una precarga inicial de 500 mg para las venas, y de 1 g para las arterias. Los vasos se relajaron espontáneamente, y se dejaron estabilizar durante 90 min., luego de los cuales la tensión se reajustó mecánicamente a 300 mg en el caso de las venas y 600 mg en las arterias.

Se registró la respuesta, en mg , producida por el agregado de $180 \mu\text{l}$ de muestra conteniendo GP, obteniéndose una concentración final de 15 % (v/v) en el baño del tejido (excepto en la curva dosis-respuesta, en que se especifican las diferentes concentraciones usadas). La adición del mismo volumen de KRBG no alteró el tono vascular ni las contracciones espontáneas, cuando éstas se presentaron (vena porta de rata). Los vasos provenientes de distintos perros, y aún los diferentes trozos de un mismo vaso provenientes de un perro, presentan una gran dispersión de resultados. Por este motivo, en el estudio de la curva dosis-respuesta, se determinó la respuesta de los mismos segmentos de vaso sanguíneo a las diferentes concentraciones de GP presentes en el extracto butanólico del ultrafiltrado. Por la misma razón, en el estudio del mecanismo de acción se utilizaron los mismos segmentos de vaso sanguíneo pa-

ra determinar su respuesta al agregar un extracto conteniendo GP, antes y después de añadir las drogas inhibidoras.

Se verificó la viabilidad de las preparaciones comprobándose que se producía despolarización al agregar K^+ 50 mM (concentración final en el baño) al terminar los experimentos. Como muchos autores (Levy, 1980; Toda, 1982; Uski et al., 1984) expresan las respuestas de los vasos sanguíneos como el porcentaje respecto a la contracción inducida por K^+ , se calculó si en los resultados experimentales se disminuía el error expresándolos de esa manera.

b. Obtención de las muestras de GP

Se obtuvo un ultrafiltrado conteniendo GP, proveniente del plasma de perros pancreatectomizados, como se describe en II.2.c.

Para realizar la curva dosis-respuesta era necesario contar con muestras concentradas en GP, sin concentrar a su vez las sales, que modifican el tono vascular. Se recurrió a la extracción del principio activo con n-butanol. Para esto, el ultrafiltrado se trató previamente con alúmina activada, que adsorbe las catecolaminas (cfr. II.3.d.). El sobrenadante se

acidificó a pH 4,0 y saturó con NaCl; se hicieron cinco extracciones con n-butanol, 1/5 del volumen de muestra cada vez. El extracto butanólico se lavó tres veces con agua a pH 4,0, 0°C, y se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 37°C. Una alícuota del residuo, llevada a volumen original con KRBG, presentó una actividad biológica del $69 \pm 6 \%$ (n=14) de la actividad del ultrafiltrado, medida en el bioensayo del fundus de estómago de rata (cfr. II.3.e.). La extracción con n-butanol se utilizó en la determinación de la curva dosis-respuesta y del mecanismo de acción. Los puntos de distinta concentración de la curva se obtuvieron agregando al baño del tejido siempre el mismo volumen (15 % v/v) de muestras provenientes de cantidades crecientes de ultrafiltrado, y de esta manera se registró la respuesta a extracto butanólico disuelto en un volumen igual al original (punto 15 % v/v) o en un volumen menor, para obtener mayor concentración (puntos 40 y 100 %).

c. Incubaciones con β -glucuronidasa

En algunos experimentos el ultrafiltrado conteniendo GP se incubó con 600 unidades/ml de β -glucuronidasa (Ketodase, Warner-Lambert Co.) a pH 5 y 37°C durante una hora.

d. Drogas

Como inhibidores de fosfolipasa A₂ se utilizaron:
Mepacrine HCl (ICN Pharmaceuticals, Inc.), concentración final
en el baño: 39 μ M.

Clorpromazina (Lab. Rhodia), concentración final en el baño:
105 μ M.

Las drogas se agregaron al baño de los tejidos, dejándo
darse actuar durante 30 min.

e. Estadística

Los resultados obtenidos se compararon con el test
de la "t" de Student de una cola, considerándose diferencia signif
nificativa cuando $P < 0,05$.

Las curvas dosis-respuesta se trazaron haciendo un
ANOVA completado con regresión. Se realizó la transformación
logarítmica de los datos para lograr la homogeneidad de varianza
requerida, que se comprobó con el test de Bartlett.

3. RESULTADOS

a. Acción en venas

Como se ve en la tabla III.1, el ultrafiltrado conteniendo GP produjo una contracción significativa en seis de las nueve venas del perro estudiadas; las venas yugular, femoral y porta extrahepática produjeron una respuesta mayor que las venas cava, ilíaca y esplénica. En cambio el ultrafiltrado no tuvo actividad en las venas pulmonar, mesentérica y renal. Estos resultados se representan en la figura III-1.

En las venas que dieron mayor respuesta se probó la acción del ultrafiltrado previamente incubado con β -glucuronidasa, observándose una disminución significativa de la actividad (yugular $P < 0,025$; porta extrahepática $P < 0,005$; femoral $P < 0,05$).

En la rata la vena porta presenta contracciones espontáneas. La adición del ultrafiltrado conteniendo GP aumentó significativamente la frecuencia de las contracciones (Figura III-2). El ultrafiltrado previamente incubado con β -glucuronidasa no tuvo actividad (Tabla III-2).

El ultrafiltrado conteniendo GP no produjo respuesta en la vena porta extrahepática del hamster, ni en ninguna de

Vena	N	$\bar{m}g$	P
Yugular	12	199 \pm 49	<0,005
Porta extrahepática	37	135 \pm 16	<0,001
Femoral	9	103 \pm 31	<0,020
Cava	11	55 \pm 12	<0,001
Ilíaca	12	58 \pm 24	<0,050
Esplénica	8	13 \pm 4	<0,010
Pulmonar	10	sin efecto	
Mesentérica	3	sin efecto	
Renal	3	sin efecto	

Tabla III-1: Acción del ultrafiltrado conteniendo GP sobre diferentes venas del perro. Los resultados se expresan como el valor medio \pm error standard. N indica el número de venas; P indica la significación de la contracción con respecto a la línea de base.

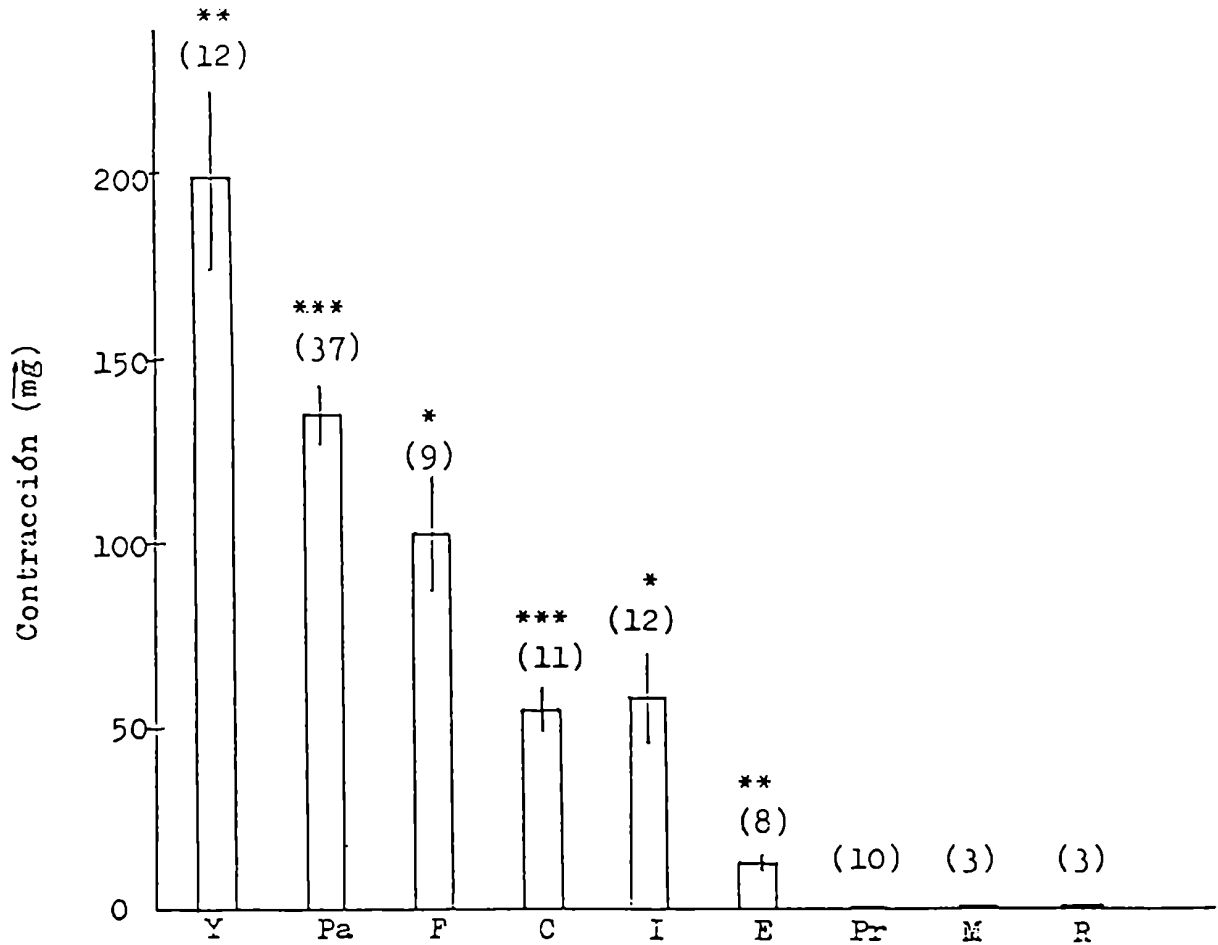


Figura III-1: Acción del ultrafiltrado conteniendo GP sobre diferentes venas del perro: Y= yugular, Pa= porta extrahepática, F= femoral, C= cava, I= ilíaca, E= esplénica, Pr= pulmonar, M= mesentérica, R= renal. Cada barra representa la media \pm error estandar. Los números entre paréntesis indican el nº de ensayos. Los asteriscos indican la significación de la contracción con respecto a la línea de base (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

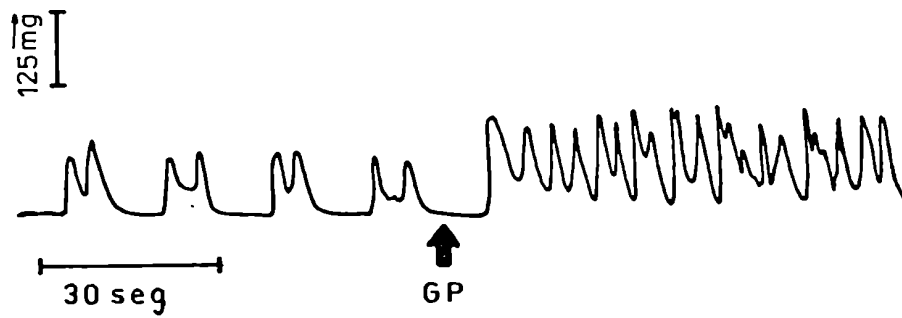


Figura III-2: Efecto del ultrafiltrado conteniendo GP sobre las contracciones espontáneas de la vena porta de rata.

	N	contracciones por minuto	P
Control	13	10 \pm 1	
GP	8	19 \pm 3	< 0,05
GP + β -glucuronidasa	5	11 \pm 1	NS

Tabla III-2: Efecto de la adición de ultrafiltrado conteniendo GP sin y con incubación previa con β -glucuronidasa, sobre las contracciones espontáneas de la vena porta de rata. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. N indica el número de ensayos; P indica la significación de la diferencia respecto al control.

las venas de conejo ensayadas (cava, yugular, ilíaca y porta extrahepática).

b. Acción en arterias

Se ensayó la actividad del ultrafiltrado conteniendo GP sobre siete arterias del perro. Como se observa en la tabla III-3, el agregado del ultrafiltrado produjo una contracción significativa en las arterias ilíaca, femoral y renal, mientras que en las arterias aorta, pulmonar y hepática no tuvo efecto. Estos resultados se representan en la figura III-3. El ultrafiltrado tampoco produjo respuesta sobre la arteria aorta de la rata.

Arteria	N	$\overline{\text{mg}}$	P
Ilíaca	9	197 \pm 41	<0,005
Femoral	12	105 \pm 40	<0,025
Renal	10	96 \pm 35	<0,025
Aorta	11	45 \pm 32	NS
Hepática	6	21 \pm 8	NS
Esplénica	8	16 \pm 10	NS
Pulmonar	3	sin efecto	—

Tabla III-3: Acción de ultrafiltrado conteniendo GP sobre diferentes arterias del perro. Los resultados se expresan como el valor medio \pm error standard. N indica el número de arterias; P indica la significación de la contracción con respecto a la línea de base.

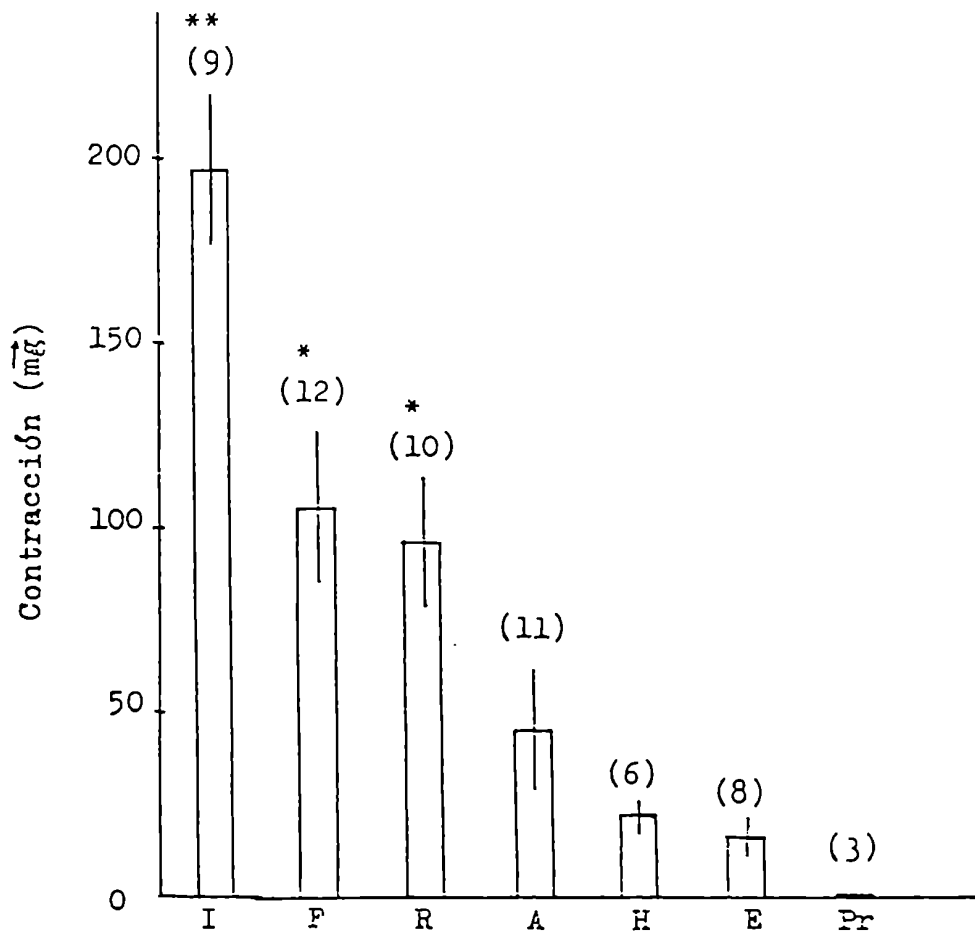


Figura III-3: Acción del ultrafiltrado conteniendo GP sobre diferentes arterias del perro: I= iliaca, F= femoral, R= renal, A= aorta, H= hepática, E= esplénica, Pr= pulmonar. Cada barra representa la media \pm error estándar. Los números entre paréntesis indican el nº de ensayos. Los asteriscos indican la significación de la contracción con respecto a la línea de base (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

c. Curva dosis-respuesta

Se hizo la curva dosis-respuesta sobre una arteria y una vena del perro. Se eligieron la arteria ilíaca y la vena porta extrahepática pues son muy sensibles a la GP.

Para obtener los puntos correspondientes a distintas dosis de GP, era necesario contar con muestras concentradas en el principio activo, sin concentrar a su vez las sales, que modifican el tono vascular. Se recurrió a la extracción de la GP con n-butanol; este extracto posee una cantidad de sales considerablemente menor que el ultrafiltrado (cfr. II.3.e.).

En la figura III-4 se observa que existe una relación lineal entre la concentración de GP y la tensión desarrollada, para los dos vasos sanguíneos estudiados.

Las pendientes de ambas rectas de regresión resultaron significativamente diferentes ($P < 0,05$).

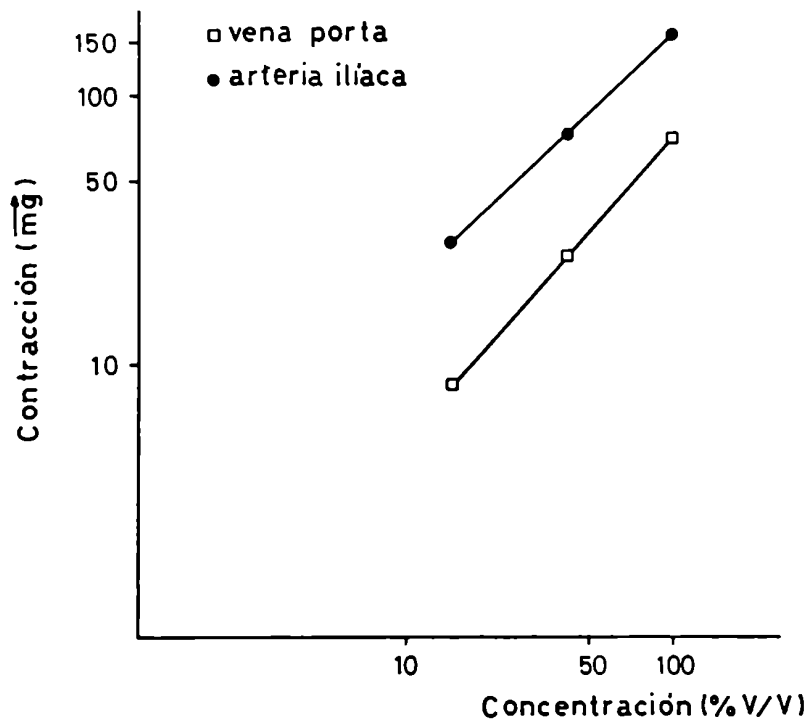


Figura III-4: Efecto de tres concentraciones diferentes de GP sobre el tono muscular de la arteria iliaca (n=10) y la vena porta extrahepática (n=8) del perro, graficados en doble escala logarítmica. Significación de las regresiones: arteria iliaca $P < 0,05$; vena porta $P < 0,025$. Las pendientes (a) y ordenadas al origen (b), con sus respectivos intervalos de confianza al nivel 95% (IC) son los siguientes: arteria iliaca: $a = 0,904$, $ICa = (0,286; 1,521)$; $b = 0,421$, $ICb = (0,103; 0,739)$. Vena porta extrahepática: $a = 1,131$, $ICa = (0,670; 1,593)$; $b = -0,407$, $ICb = (-0,673; -0,142)$. Las pendientes resultaron significativamente diferentes ($P < 0,05$)

d. Mecanismo de acción

Se intentó conocer si el mecanismo de acción de la GP en el sistema vascular estaría relacionado con algún eicosanocido. La fosfolipasa A_2 regula toda la cascada de biosíntesis de estas sustancias.

Se utilizaron dos inhibidores de fosfolipasa A_2 ampliamente usados: clorpromazina y mepacrine. Los experimentos se realizaron registrando la respuesta de los vasos sanguíneos a GP, antes y después de la adición de uno u otro inhibidor a los baños de los tejidos. Se eligieron, de entre los vasos del perro estudiados, los tres más sensibles a la GP, que son la arteria ilíaca y las venas yugular y porta extrahepática.

La figura III-5 A muestra un registro típico del aumento de tensión basal producido al agregar GP al baño de la arteria ilíaca. En la parte B de la misma figura se observa que, si luego de lavar el tejido con KRBG se agrega clorpromazina, el tejido no responde a la adición posterior de GP.

Las tablas III-4 y III-5 resumen los porcentajes de inhibición de la respuesta a GP debidos a la presencia de clorpromazina o mepacrine respectivamente, en los baños de la arteria ilíaca y las venas yugular y porta extrahepática. Ambas drogas produjeron una disminución muy significativa de la respuesta de los tres vasos sanguíneos a GP.

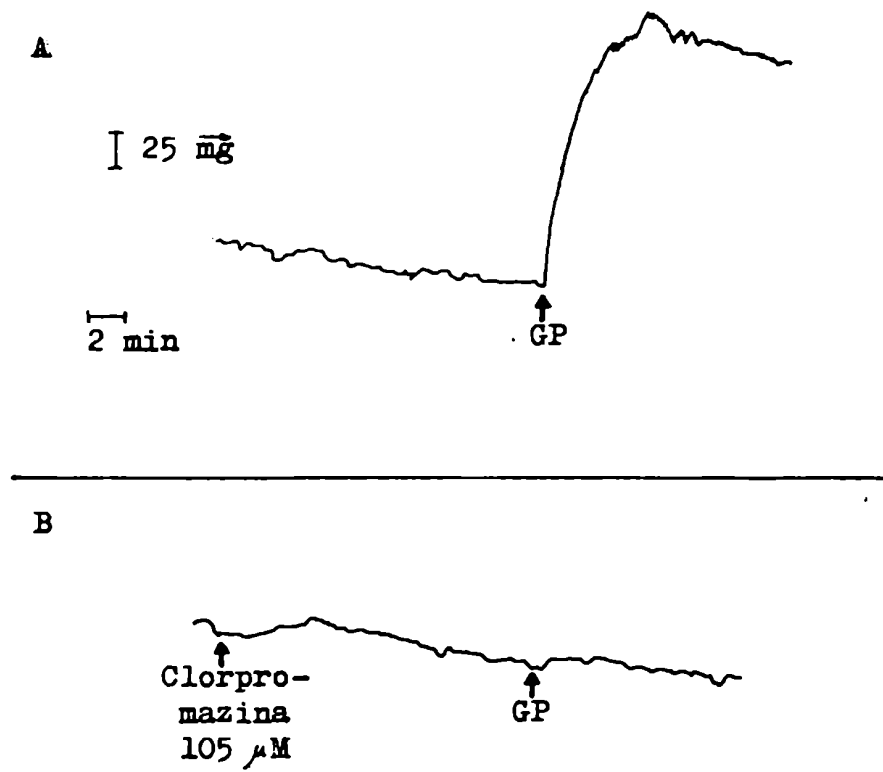


Figura III-5: A = Efecto de la GP sobre la tensión basal de la arteria iliaca. B = Inhibición de la respuesta por tratamiento previo con clorpromazina.

	N	% de inhibición	P
Arteria ilíaca	6	97 \pm 2	< 0,0005
Vena Yugular	6	89 \pm 6	< 0,0005
Vena porta extrahep.	6	95 \pm 3	< 0,0005

Tabla III-4: Inhibición de la respuesta a GP debida al tratamiento con clorpromazina. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de inhibición \pm error estandard. N indica el n°de ensayos; P indica la significación de la inhibición.

	N	% de inhibición	P
Arteria ilíaca	6	64 ± 11	<0,005
Vena Yugular	7	94 ± 6	<0,0005
Vena porta extrahep.	6	85 ± 4	<0,0005

Tabla III-5: Inhibición de la respuesta a GP debida al tratamiento con mepacrine. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de inhibición ± error estándar. N indica el número de ensayos; P indica la significación de la inhibición.

4. DISCUSION

Las diferencias funcionales en los vasos sanguíneos pueden deberse a diferencias en alguno o algunos de los sistemas por los cuales se inicia y se controla la contracción del músculo vascular, que son:

- 1° las propiedades intrínsecas del músculo liso vascular;
- 2° la inervación de los vasos sanguíneos;
- 3° la producción y degradación local de sustancias vasoactivas.

Los estudios "in vitro" son de gran utilidad para conocer lo concerniente a los puntos 1° y 3° independizándose de la inervación simpática y parasimpática que reciben los vasos. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que los resultados obtenidos por estudios "in vitro" no siempre coinciden con los realizados "in vivo", debido a los cambios en el ambiente local (por transferencia del tejido a un baño), pérdida de la inervación, y daño tisular (Robinson, 1983).

Se ha observado que vasos sanguíneos morfológicamente similares, pero que irrigan distintos órganos o tejidos, difieren notablemente en sus propiedades funcionales. Esta diversidad funcional es muy notoria entre los vasos sanguíneos de

una misma especie (Robinson, 1983). En el perro, el ultrafiltrado conteniendo GP tuvo acción en algunas de las venas y arterias estudiadas, produciendo una contracción de diferente intensidad en los distintos vasos. El número de venas que respondieron al ultrafiltrado conteniendo GP fue mayor que el número de arterias que lo hicieron, sugiriendo que las venas son más sensibles a este principio activo.

En la vena porta de la rata el ultrafiltrado conteniendo GP produjo como respuesta un aumento de frecuencia de las contracciones espontáneas -y no un aumento de la tensión basal como lo hizo en el perro-, mostrando que la misma vena porta de distintas especies puede responder de manera diferente a la misma hormona.

El ultrafiltrado conteniendo GP no tuvo actividad en las venas cava, yugular, ilíaca y porta extrahepática del conejo, ni en la porta extrahepática del hamster. Conviene resaltar que venas que respondieron en el perro, no lo hicieron en sus similares de las otras especies mencionadas, a pesar de que es poco frecuente que vasos sanguíneos comparables muestren grandes variaciones entre especies (Robinson, 1983).

En trabajos anteriores se observó que la incubación del ultrafiltrado conteniendo GP, con β -glucuronidasa, produ-

cía la pérdida de la actividad biológica (del Castillo et al., 1977; Uranga et al., 1979; Bonetto et al., 1981). Se ensayó la acción del ultrafiltrado, previamente incubado con esta enzima, sobre las venas del perro más sensibles a la hormona (yugular, porta extrahepática y femoral) y la vena porta de la rata, observándose una disminución significativa de la actividad.

Muchos autores (Chandler and Strong, 1972; Levy, 1980; Toda, 1982; Uski et al., 1984) expresan sus resultados como porcentajes respecto a la contracción inducida por K^+ , por lo que los resultados experimentales se expresaron en relación a la contracción producida por K^+ 50 mM. Se observó que el error estadístico obtenido con este tratamiento era similar al obtenido con los datos brutos; esto se puede atribuir a los diferentes mecanismos por los que la GP y el K^+ iniciarían y mantendrían la contracción del músculo vascular. Por este motivo se prefirió expresar los resultados en términos absolutos, ya que éstos dan una idea más clara de la magnitud de la respuesta.

En la curva dosis-respuesta se observa que una concentración de GP mayor produce una contracción también mayor. Además se ve que la vena porta extrahepática es más sensible a los cambios de concentración de GP que la arteria ilíaca, ya que para una dada diferencia de concentración, la vena porta pro-

cuce una mayor diferencia de respuesta. En el presente trabajo se utilizó una concentración final de 15 % (v/v) de ultrafiltrado conteniendo GP en el baño del tejido; por lo tanto, la cantidad de GP circulante en el animal diabético vivo sería más de seis veces mayor que la usada en los experimentos. La relación observada entre la concentración de GP y su actividad sugiere que la respuesta en el animal entero sería mayor, si bien es importante notar, como se dijo anteriormente, que las respuestas de los vasos sanguíneos "in vitro" no siempre coinciden con las obtenidas "in vivo".

El ácido araquidónico y los ácidos grasos poli-insaturados relacionados son metabolizados ya sea por la ciclo-oxigenasa, para producir PGs, o por las lipo-oxigenasas, para generar derivados hidroperoxidados que posteriormente se transforman en LTs. Entre estos últimos, LTC₄ y LTD₄ tienen una acción potente en el sistema cardiovascular (Piper, 1983). Entre los productos de la ciclo-oxigenasa, la prostaciclina (un importante metabolito del ácido araquidónico en todas las arterias y venas), es un fuerte agente vasodilatador, y el TXA₂ es un potente constrictor del músculo liso vascular (Higgs and Moncada, 1983).

La acción de la GP en el sistema vascular parece es-

tar relacionada con la síntesis de PGs, ya que el efecto de la GP sobre el flujo sanguíneo ovárico de la perra "in vivo" no se observa si el animal se trata previamente con indometacina, un inhibidor de la ciclo-oxigenasa (Uranga and del Castillo, 1979 b). Además, la acción de la GP sobre la resistencia vascular del mesenterio "in vivo" se inhibe por el tratamiento previo del animal con tranilcipromina, un inhibidor de la síntesis de prostaciclina (del Castillo et al., 1981). La GP produce la relajación de las arterias coronarias "in vitro"; este efecto desaparece cuando se agregan diferentes inhibidores de la ciclo-oxigenasa a los baños de los tejidos (del Castillo et al., 1985).

Las PGs y LTs, conjuntamente llamados eicosanoides, no se almacenan dentro de las células y por lo tanto son biosintetizados inmediatamente antes de su liberación. El sustrato, que usualmente es ácido araquidónico, debe estar en su forma no esterificada. Los ácidos grasos no saturados se almacenan en la célula principalmente formando ésteres en la posición β de los fosfátidos, y por lo tanto la fosfolipasa A_2 , que hidroliza estas uniones, regula toda la cascada de eicosanoides (Blackwell and Flower, 1983).

En el presente trabajo se estudió si el mecanismo por el que la GP produce la contracción de ciertas arterias y ve-

nas del perro "in vitro" estaría relacionado con algún eicosanoide. Para esto se utilizaron los dos inhibidores de fosfolipasa A_2 más corrientemente usados: clorpromazina (Blackwell et al., 1978) y mepacrine (Weksler et al., 1978). Estas drogas forman complejos con los fosfolípidos, interfiriendo en la unión de la enzima al sustrato (Lüllmann and Wehling, 1979). El estudio se realizó sobre los tres vasos sanguíneos más sensibles del perro, que son la arteria ilíaca, y las venas yugular y porta extrahepática. Ambas drogas disminuyeron de manera significativa la respuesta de la GP en los tres vasos. Esto sugiere que la GP podría actuar en estos tejidos liberando ácido araquidónico, que, a través de uno de sus derivados, provocaría la contracción del músculo liso vascular.

5. SUMARIO

Se investigó el efecto de la GP sobre diversas arterias y venas del perro, y sobre algunas venas del conejo, rata y hamster. La GP provocó un aumento de la tensión basal en algunas de las venas del perro estudiadas, que respondieron con distinta sensibilidad: yugular > porta extrahepática > femoral > cava > ilíaca > esplénica; no tuvo efecto en las venas pulmonar, mesentérica y renal. Las arterias del perro también respondieron a la GP con diferente sensibilidad: ilíaca > femoral > renal; las arterias aorta, hepática, esplénica y pulmonar no produjeron respuesta. En la rata, la GP provocó el aumento de la frecuencia de las contracciones espontáneas de la vena porta extrahepática. En cambio, no tuvo actividad en ninguna de las venas de conejo ensayadas (cava, yugular, ilíaca y porta extrahepática), ni en la vena porta extrahepática del hamster.

Con el objeto de estudiar si en los vasos activos del perro existiría una relación dosis-respuesta, se probaron distintas concentraciones de GP sobre la arteria ilíaca y la vena porta extrahepática, observándose una relación lineal para ambos vasos sanguíneos.

En otro grupo de experimentos se estudió la acción

de dos inhibidores de fosfolipasa A_2 , clorpromazina y mepacrine, sobre la respuesta de los vasos del perro a la GP. La presencia de una u otra droga en los baños de los tejidos, inhibió muy significativamente la respuesta de los vasos ensayados (arteria ilíaca y venas yugular y porta extrahepática) a la GP. Estos resultados sugieren que la acción de la GP en estos vasos sanguíneos estaría mediada por la liberación de ácido araquidónico.

- Aiken, J. and Vane, J.R.: "Blockade of angiotensin-induced prostaglandin release from dog kidney by indomethacin". *Pharmacologist* 15, 564-566 (1971).
- Anthony, W.L.; Béher, W.T.: "Colour detection of bile acids using layer chromatography". *J. Chromatog.* 13, 567-570 (1964)
- Anton, A. and Sayre, D.: "A study of the factors affectin the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines". *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 138, 360-375 (1962).
- Arany, E.; del Castillo, E. and Uranga, J.: "Some factors affecting glomerulopressin production by perfused rat liver". *Horm. metabol. Res.* 14, 667-670 (1982).
- Arany, E.; Uranga, J.; Bonetto, R. and del Castillo, E.: "Induction of glomerulopressin production by cyclic AMP". *Horm. metabol. Res.* 17, 72-77 (1985).
- Blackwell, G.J.; Flower, R.J.; Nijkamp, F.P. and Vane, J.R.: "Phospholipase A₂ activity of Guinea-pig isclated perfused lungs: estimation and inhibition by anti-inflammatory steroids". *Br. J. Pharmacol.* 62, 79-89 (1978).
- Blackwell, G.J. and Flower, R.J.: "Inhibition of phospholipase" *British Medical Bulletin* 39, 260-264 (1983).

- Bonetto, R.; del Castillo, E. and Uranga, J.: "Effect of glomerulopressin on the lymphatic hearts of the toad, probably mediated by prostaglandins". *Experientia*, 37, 209-210 (1981).
- Bunting, S.; Gryglewsky, R.J.; Moncada, S.; Vane, J.R.: "Arterial wall generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation". *Prostaglandins*, 12, 897-913 (1976).
- Chandler, J.T. and Strong, C.G.: "The actions of prostaglandin E₁ on isolated rabbit aorta". *Archs. int. Pharmacodyn. Ther.* 197, 123-131 (1972).
- del Castillo, E.; Fuenzalida, R. and Uranga, J.: "Increased glomerular filtration rate and glomerulopressin activity in diabetic dogs". *Horm. metabol. Res.* 9, 46-53 (1977).
- del Castillo, E.; Fuenzalida, R.; Rapoport, A.L. and Uranga, J.: "Effect of glucagon on glomerulopressin production in diabetic dogs". *Acta physiol. latinoam.* 28, 179-184 (1978).
- del Castillo, E.; Rapoport, A.L.; Bonetto, R. and Uranga, J.: "Glomerulopressin in dogs mesenteric blood flow and prostaglandins". *Horm. metabol. Res.* 13, 126-127 (1981).
- del Castillo, E.; Arany, E.; Bonetto, R. and Uranga, J.: "Isolated dog coronary arteries response to glomerulopressin". *Horm. metabol. Res.* 17, 194-196 (1985).

- Fahmy, R.A.; Niederwieser, A.; Pataki, G. and Brenner, M.:
"Dunnschicht-Chromatographie von aminosäuren auf Kieselgel
G. Eine schnellmethode zur trennung und zur qualitativen
nachweis von 22 aminosäuren". *Helv. chim. Acta* 44, 2022-
2026 -251- (1961).
- Flower, R. J.: "Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis"
Pharmac. Rev. 26, 33 (1974).
- Foglia, V.G. y Gerschman, R.: "Trastornos humorales y circula-
torios por destrucción de los corazoncitos linfáticos del sa-
po" *Revta. Soc. argent. Biol.* 15, 113-124 (1939).
- Fuenzalida, R.; del Castillo, E. and Uranga, J.: "Effect of
glomerulopressin and mannitol in acute renal failure in rats"
Horm. metabol. Res. 12, 212-215 (1980).
- Gryglewsky, R.J.; Bunting, S.; Moncada, S.; Flower, R. and
Vane, J.R.: "Arterial walls are protected against deposition
of platelet thrombi by a substance (Prostaglandin X) which
they make from prostaglandin endoperoxidase". *Prostaglandins*
12, 685-713 (1976).
- Higgs, E.A. and Moncada, S.: "Prostacyclin-physiology and
clinical uses". *Gen. Pharmac.* 14, 7-11 (1983).
- Jayle, M.F. and Pasqualini, J.R. in "Glucuronic acid, free and
combined", edited by Geoffrey J. Dutton, page 509. Academic
Press, New York and London, 1966.

- Levy, J.V.: "Prostacyclin-induced contraction of isolated aortic strips from normal and spontaneously hypertensive rats (SHR)" *Prostaglandins* 19, 517-525 (1980).
- Lisboa, B.P.: "Characterization of Δ^4 -3-oxo-C₂₁ steroids on thin layer chromatograms by in situ colour reactions". *J. Chromatog.* 16, 136-151 (1964).
- Lüllmann, H. and Wehling, M.: "The binding of drugs to different polar lipid in vitro". *Biochem. Pharmacol.* 28, 3409-3415 (1979).
- Michalec, C.: "The nature of cholesterol esters in human blood serum". *Biochem. et Biophys. Acta* 19, 187-188 (1956).
- Moncada, S. and Vane, J.R.: "Pharmacology and endogenous role of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin". *Pharmacological Reviews* 30, 293-324 (1979).
- Neher, R. and Wettstein, A.: "Farbreaktionem mit steroiden, insbesondere corticosteroiden, im papierchromatogramm" *Helv. chim. Acta* 34, 2278-2285 -281- (1951).
- Orehek, J.; Douglas, J.S.; Lewis, A.J. and Bouhuys, A.: "Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone". *Nature New Biol.* 245, 84-85 (1973).

- Piper, P.J.: "Pharmacology of leukotrienes". British Medical Bulletin 39, 255-259 (1983).
- Robinson, B.F.: "Differences in blood vessels between species: relation to differences in blood vessels of varying type within the same species". Gen.Pharmac. 14, 43-46 (1983).
- Sun, F.F.; Chapman, J.P. and Mc Guirre, J.C.: "Metabolism of prostaglandin endoperoxide in animal tissues". Prostaglandins 14, 1055-1074 (1977).
- Tohill, A.; Rathbone, L. and Willman, E.: "Prostaglandin E₂. Relation to adrenaline reversal in rat uterus". Nature 233, 56-57 (1971).
- Terragno, N.A.; Lonigro, A.J.; Malik, K.U. and Mc Giff, J.C.: "The relationship of the renal vasodilator action of bradykinin to the release of a prostaglandin E-like substance". Experientia 28, 437-439 (1972).
- Toda, N.: "Different responsiveness of a variety of isolated dog arteries to prostaglandin D₂". Prostaglandins 23, 99-112 (1982).
- Uranga, J.: "The influence of changes in plasma volume on glomerular filtration rate and ureteral pressure in the toad" Acta physiol. latinoam. 13, 177-183 (1963).

- Uranga, J.: "The pressure in Bowman's capsule and the occluded ureter of the toad". *Acta physiol. latinoam.* 15, 77-85 (1965).
- Uranga, J.: "Influence of the liver on regulation of glomerular pressure in the toad". *Am. J. Physiol.* 213, 1244-1248 (1967).
- Uranga, J.: "The hepatic production of a glomerular pressure substance in the toad (*Bufo arenarum*)". *Gen. Comp. Endocrinol.* 13, 179-184 (1969).
- Uranga, J.: "Some characteristics of hepatic glomerular pressure substance". *Am. J. Physiol.* 220, 1617-1620 (1971).
- Uranga, J.: "Effect of glomerulopressin, oxytocin, and norepinephrine on glomerular pressure in the toad" *Gen. comp. Endocrinol.*, 20, 515-521 (1973).
- Uranga, J. and Fuenzalida, R.: "Effect of glomerulopressin and a rabbit glomerulopressin-like substance in the rat". *Horm. metab. Res.* 7, 180-184 (1975).
- Uranga, J., del Castillo, E. and Gimeno, M.: "Action of glomerulopressin on smooth muscle contraction, probably mediated by the release of prostaglandins". *Archs. int. Pharmacodyn. Ther.* 238, 19-27 (1979) a.

- Uranga, J. and del Castill, E.: "Effect of glomerulopressin on ovarian blood flow in dogs". *Horm. metab. Res.* 11, 513-515 (1979) b.
- Uranga, J.; Fuenzalida, R.; Rapoport, A.L. and del Castillo, E.: "Effect of glucagon and glomerulopressin on the renal function of the dog". *Horm. metab. Res.* 11, 275-279 (1979) c.
- Uranga, J.; Rapoport, A.L.; Bonetto, R.; Arany, E. and del Castillo, E.: "Influence of insulin and glucagon on the production of glomerulopressin by isolated rat liver". *Horm. metabol. Res.* 14, 539-542 (1982) a.
- Uranga, J.; Rapoport, A.L.; Arany, E.; Bonetto, R. and del Castillo, E.: "Influence of corticoids on the production of glomerulopressin by isolated rat liver". *Acta physiol. latinam.* 32, 153-156 (1982) b.
- Uski, T.K.; Andersson, K.E.; Brandt, L. and Ljunggren, B.: "Characterization of the prostanoid receptors and of the contractile effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in human pial arteries". *Acta Physiol. Scand.* 121, 369-378 (1984).
- Vane, J.R.: "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs". *Nature New Biology* 231, 232 (1971).

Vane, J.R.; "Adventures and excursions in bioassay: the stepping stones to prostacyclin". Br. J. Pharmac. 79, 821-838 (1983).

Weksler, B.B.; Ley, C.W. and Jaffe, E.A.: Clinical Res. 26, 619 A (1978).

Rombouts

Julie Vange