

¿Está el sistema renina-angiotensina implicado en el efecto hipertensor de un extracto tisular hidrosoluble?

J. M. de Gandarias*, E. Casis, C. Iribar y L. Casis

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de País Vasco
48080 Bilbao (España)

(Recibido el 28 de septiembre de 1987)

J. M. DE GANDARIAS, E. CASIS, C. IRIBAR and L. CASIS. *Is the Renin-Angiotensin System Implicated in the Hypertensive Response of a Splenic Hydrosoluble Material?* Rev. esp. Fisiol., 44 (2), 191-196, 1988.

A deproteinized hydrosoluble splenic extract, which produces a hypertensive effect, injected in rats intravenously is described. The pressure action is very similar to the synthetic angiotensin II, and the (Sarcosine¹-Isoleucine⁸)—angiotensin II, a competitive antagonist, produced partial inhibition of both responses. There were no significant differences between control and experimental rats in the plasmatic levels of angiotensin II, aldosterone and ADH. Therefore, the splenic extract does not seem to release these hormones included in the renin-angiotensin pathway. Significant Angiotensin II levels were detected in the splenic material. These results support the view that forty per cent of the pressure action is due to Angiotensin II present in the extract.

Key words: Splenic extract, Angiotensin II, Hypertension.

En 1959, DE GANDARIAS (8) obtuvo, a partir de tejido esplénico, un material hidrosoluble que se caracterizaba por su notable actividad sobre la musculatura lisa, vascular y no vascular, así como sobre diversos aspectos de la hemostasia. Sobre este último punto, se ha descrito que su actividad podría ser debida a la presencia en el extracto de alguna sustancia simil-heparina (12). La actividad sobre musculatura lisa demuestra ser resistente al tratamiento con antagonistas alfa- y

beta-adrenérgicos y colinérgicos (9-11).

En preparaciones *in vitro* de íleon aislado de cobaya, se ha sugerido la posibilidad de que los receptores H₁-Histamina medien la respuesta contráctil debida al extracto (2), pero esta hipótesis no explica el efecto presor observado *in vivo*.

En el presente trabajo se estudia la posible implicación del sistema renina-angiotensina en la respuesta hipertensora del extracto, muy similar a la producida por la angiotensina II sintética, un rápido y corto incremento de la presión arterial (14, 21, 22).

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Preparación del extracto esplénico. — Se preparó a partir de bazo de vaca obtenido tras el sacrificio y sangrado del animal. El traslado al laboratorio se realizó inmediatamente después, en recipiente refrigerado. Tras el lavado del bazo, se obtuvo el extracto mediante el siguiente procedimiento: Homogeneizado y desproteinización (3) con arena de mar en relación 3:1, arena : bazo, añadiendo después las soluciones desproteinizantes en relación peso bazo : volumen solución, 1:5 de Na(OH) 0,3 N y SO₄Zn al 5 %, homogeneizando mediante ultrasonidos el macerado obtenido, durante 2-3 minutos. Filtrado del sobrenadante, obteniéndose un líquido transparente e incoloro que se liofilizaba con el fin de mantener su actividad sin cambio durante varios meses.

Experimentos fisio-farmacológicos. — Se empleó un total de 60 ratas machos, raza Sprague-Dawley, con pesos comprendidos entre 300-400 g. Tras anestesia con Nembutal (0,2 ml/100 g i.p.), y habiendo realizado traqueotomía para evitar complicaciones respiratorias, se canuló la vena femoral para disponer de una vía de aplicación de las distintas sustancias. Posteriormente se liberó la arteria carótica común y se introdujo una cánula cuyo extremo se conectaba a un transductor electrónico de presión lleno de solución salina heparinizada, y éste a un amplificador. El registro gráfico se efectuó mediante un registrador Hewlett-Packard tipo 7754-A de cuatro canales.

Las dosis empleadas de extracto esplénico (SE) fueron las equivalentes a 50, 100, 200 y 400 mg de tejido fresco. Las dosis de angiotensina II (A II) (Sigma) fueron 10^{-2} , 2×10^{-2} , 4×10^{-2} y 8×10^{-2} μ g, y la de (Sarcosina¹-Isoleucina⁸)-angiotensina II, inhibidor competitivo de la angiotensina (13), fue en todos los casos de 0,8 μ g. Todas las infusiones

se realizaron en forma de «bolo» de 0,5 ml en un tiempo de 30 s, inyectándose el inhibidor previamente a los agonistas.

Se llevó a cabo una serie de experimentos (n = 6) con el fin de comprobar la posible influencia de los agentes químicos empleados durante el proceso de desproteinización (placebo), no apreciándose cambios significativos en los valores basales de presión tras la administración de *pool* de reactivos.

Ensayos bioquímicos. — A otras 40 ratas, anestesiadas con Nembutal (0,2 ml/100 g i.p.), se les canuló la vena yugular, para perfusión de los reactivos, y la arteria carótica, para obtención de las muestras sanguíneas. Todos los experimentos se realizaron en animales ya despiertos (20-24 h post-anestesia), con el fin de prevenir efectos del anestésico sobre el sistema renina-angiotensina (19).

Las muestras sanguíneas se recogieron 60 s después de la infusión en «bolo» (0,5 ml/30 s) de 200 mg de extracto esplénico (grupo experimental) o el equivalente de solución placebo cuya composición se ha descrito anteriormente (grupo control). Todos los análisis actividad plasmática de renina (APR) (Cea-Ire-Sorin), angiotensina II (Cea-Ire-Sorin), hormona antidiurética (ADH) (Bulman Lab., Ltd.) y aldosterona (Abbott), se realizaron por radioinmunoensayo (RIA), de acuerdo con técnicas ya descritas (7, 15, 16, 18, 20).

Estudio estadístico. — Los resultados se expresan como la media \pm error estándar, para un número de experimentos designados como n. El estudio estadístico se realizó mediante el método *t* de Student, para datos no apareados.

Resultados

Experimentos fisio-farmacológicos. — La administración de 400 mg de tejido esplénico y de 8×10^{-2} μ g de angiotensina II, ambos referidos como 100 % de

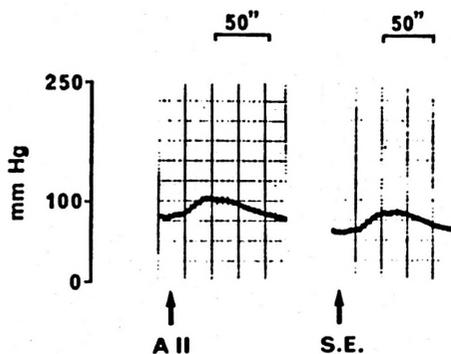


Fig. 1. Respuestas producidas por la angiotensina II (A II) ($8 \times 10^{-2} \mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$, 30 s) y el extracto esplénico (SE) ($4 \times 10^2 \text{ mg}/0,5 \text{ ml}$, 30 s) inyectados ambos intravenosamente.

respuesta, muestran una reacción similar, ya que provocan un corto y rápido incremento en la presión arterial media de ratas normales (fig. 1). El efecto de las distintas dosis de ambas soluciones se expresan como porcentajes de respuesta en relación con el control 100 % (fig. 2, sup.).

El antagonista ($\text{Sar}^1\text{-Ile}^8$)-angiotensina II ($0,8 \mu\text{g}$) produce inhibición en ambas respuestas, A II y SE, aunque esta dosis que inhibe totalmente la respuesta de dosis bajas de A II, no inhibe totalmente la respuesta de dosis bajas de SE (fig. 2, inf.). De hecho, dosis mucho más elevadas ($5\text{-}10 \mu\text{g}$), no inhiben más del 60 % de la respuesta presora producida por el SE.

Ensayos bioquímicos. — No se observan diferencias significativas en los niveles plasmáticos de A II entre las ratas control ($23,43 \pm 2,77 \text{ pg A II/ml}$) y las tratadas con SE ($25,5 \pm 5,75 \text{ pg A II/ml}$) (fig. 3a). Similares resultados se obtuvieron para ADH y aldosterona: $7,17 \pm 0,86 \text{ pg ADH/ml}$ en el grupo control frente a $5,93 \pm 0,65 \text{ pg ADH/ml}$ en el experimental (fig. 3b), y $920 \pm 120,28 \text{ pg aldosterona/ml}$ en el control frente a $864,66 \pm$

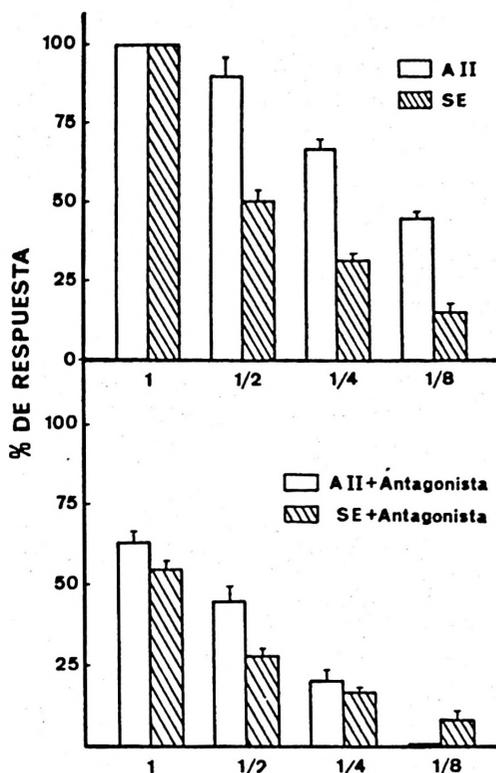


Fig. 2. Porcentaje de respuesta producida por la angiotensina II (A II) y por el extracto esplénico (SE) en sus distintas dosis ($1 = 8 \times 10^{-2} \mu\text{g A II}$ y $4 \times 10^2 \text{ mg SE}$), sin inhibidor (superior) y tras el tratamiento con $0,8 \mu\text{g}$ de ($\text{Sar}^1\text{-Ile}^8$)-angiotensina II (inferior).

La altura de las columnas indica las medias obtenidas con al menos 6 experimentos. Las líneas verticales indican el error estándar.

$138,33 \text{ pg aldosterona/ml}$ en el tratado con SE (fig. 3c).

Sin embargo, midiendo directamente A II en el extracto, se detectan pequeñas concentraciones de la misma, ($1,03 \pm 0,533 \text{ ng}/100 \text{ mg}$ de tejido fresco) cantidad que provoca al menos un 40 % de la respuesta total. Además, se observan diferencias significativas en los niveles de angiotensina I generados por ml de plasma y por hora de incubación (APR) entre los animales control ($23,92 \pm 4,17$

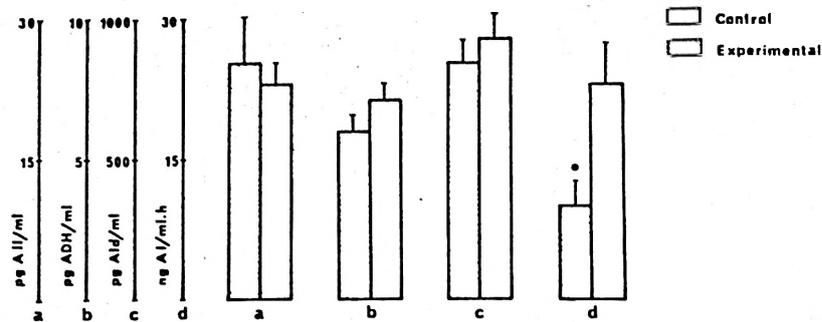


Fig. 3. Niveles plasmáticos de angiotensina II (a), hormona antidiurética (b) y aldosterona (c) obtenidos en los animales control y experimentales, como de la actividad plasmática de renina (d). Número de animales por grupo, 10. ($p < 0,01$).

ng/ml/h) y los tratados con SE ($9,53 \pm 1,86$ ng/ml/h) (fig. 3d).

Discusión

Los mecanismos de acción de los extractos esplénicos, particularmente en lo que se refiere a actividad sobre músculo liso, son relativamente desconocidos. Los resultados fisiológico-farmacológicos aquí presentados, pueden servir como una primera aproximación para tratar de clarificar los mecanismos sobre musculatura lisa vascular, ya que al producir el antagonista de la A II una clara inhibición en la respuesta presora producida por el extracto, se puede pensar en una acción del mismo vía sistema renina-angiotensina. En este caso, no se realizó un estudio farmacológico completo (24) debido a que diversos factores *in vivo* podrían modificar los resultados.

La ausencia de diferencias significativas en los niveles plasmáticos de A II y aldosterona entre los animales control y experimentales, parece sugerir la no participación del extracto en la liberación de estas hormonas incluidas en el sistema renina-angiotensina en el intervalo de tiempo estudiado. Sin embargo, la cantidad de A

II detectada en el SE demuestra ser capaz no sólo de provocar un 40 % de su respuesta presora, sino también de producir un retroefecto negativo en la liberación de renina (4, 23). A pesar de ello, ésta A II inyectada con el SE parece ser degradada muy rápidamente, ya que no es detectada en las determinaciones hormonales. La aparición de estas pequeñas cantidades de A II en el extracto es totalmente inesperada, ya que estudios previos con técnicas más sencillas (2, 6), descartaban esta posibilidad. Asimismo, se podía suponer que el método de desproteínización empleado eliminaría incluso los pequeños péptidos. En cualquier caso, dicho método destruye todo tipo de moléculas con peso molecular superior a los 1.500 d (1), pero pequeñas concentraciones de A II ($PM < 1.500$ d), parecen escapar a la desproteínización. Es importante entonces tener en cuenta estos resultados a nivel de cualquier experimentación que requiera el empleo de agentes desproteínizantes.

No está todavía clarificada la naturaleza total de la respuesta presora producida por el extracto, pero los resultados aquí presentados parecen excluir la liberación de ADH, otra hormona hipertensora (5, 17), al menos en el intervalo de tiempo estudiado.

Resumen

Se describe la respuesta presora que produce un extracto esplénico desproteinizado hidrosoluble cuando es inyectado intravenosamente en ratas. Dicha respuesta es muy similar a la producida por la angiotensina II sintética. El inhibidor competitivo (Sarcosina¹-Isoleucina⁸)-angiotensina II, produce una inhibición parcial en la respuesta del extracto y de la angiotensina, pero no existen diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de ratas control y tratadas con extracto, de angiotensina II, aldosterona y hormona antidiurética. Por tanto, el extracto esplénico parece no producir liberación de estas hormonas incluídas en la vía renina-angiotensina. Sin embargo, la cantidad de angiotensina presente en el extracto, es suficiente para producir al menos un 40 % de la respuesta presora del mismo.

Palabras clave: Extracto esplénico, Angiotensina II, Hipertensión.

Bibliografía

1. Ainz, L. F.: Tesis Doctoral, Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco, Bilbao. 1974.
2. Ainz, L. F., Casis, E., Gandarias, J. M. de, Gil-Rodrigo, C. E. y Goirieta de Gandarias, J. J.: *Br. J. Pharmacol.*, 79, 373-378, 1983.
3. Ashwell, G.: En «Methods in Enzymology» (Collowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.) Academic Press, Inc., Nueva York, 1957, Vol III, pp. 73-105.
4. Blair-West, J. R., Cain, M. D., Catt, K. J., Coghlan, J. P., Denton, D. A., Funder, J. W., Scoggins, B. A. y Wright, R. D.: *Acta Endocrinol.*, 66, 229-247, 1971.
5. Burnier, M. y Brunner, H. R.: *Am. J. Physiol.*, 244, H253-H258, 1983.
6. Brown, C. B., Drum, D. E. y Hollenberg, N. K.: *Am. J. Physiol.*, 232, F84-F91, 1977.
7. Dusterdieck, M. J. y McElwee, G.: *Eur. J. Clin. Invest.*, 2, 32-38, 1971.
8. Gandarias, J. M. de: *Rev. Clin. Esp.*, 71, 16, 1959.
9. Gandarias, J. M. de: Real Academia de Medicina, Bilbao, 1971.
10. Gandarias, J. M. de, Ainz, F., Fernández, B., Goirieta, J. J., Lacort, M. y Rabanal, S.: *Arch. Farmacol. Toxicol.*, IV (3), 331-118, 1978.
11. Gandarias, J. M. de, Ainz, F., Gil-Rodrigo, C. E., Goirieta, J. J. y Gómez, R.: *Rev. esp. Fisiol.*, 42, 241-246, 1986.
12. Gandarias, J. M. de, Casis, E., Casis, L., Gil-Rodrigo, C., Iribar, M. C. y Goirieta, J. J.: *Arch. Farmacol. Toxicol.*, XI, 205-210, 1985.
13. Gandarias, J. M. de, Casis, L., Casis, E., Gómez, R. e Iribar, M. C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 43 (1), 77-80, 1987.
14. Gandarias, J. M. de, Iribar, C. y Casis, L.: *Gac. Med. Bilbao*, 80, 521-538, 1983.
15. Haber, E., Koerner, T., Page, L. B., Kleman, B. y Purnode, A.: *J. Clin. Endocrinol.*, 29, 1349-1355, 1969.
16. Ito, I., Woo, J., Haning, R. y Horton, R. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34, 106-112, 1972.
17. Irazusta, J., Casis, L., Casis, E. e Iribar, C.: XXI Congreso, Soc. Esp. C. Fisiol., Oviedo. 1985, p. 105 (A).
18. Morton, J. J., Semple, P. F. y Waite, M. A.: En: «Hormones in human blood: Detection and assay» (Antoniades, H. N., ed.). Harvard University Press, Massachusetts, 1976, pp. 642-665.
19. Pettinger, W. A., Tanaka, K., Keeton, K., Campbell, W. B. y Brooks, S. N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 625-630, 1975.
20. Robertson, G. L., Mahr, E. A., Athar, S., Sinha, T.: *J. Clin. Invest.*, 52, 2340-2347, 1973.
21. Satoh, S., Itsukaichi, O., Ohyama, Y. y Hayaschi, M.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 251, 301-309, 1981.
22. Stokland, O., Thorwaldson, J. y Ilebekk, A., Kill, F.: *Acta Physiol. Scand.*, 115, 455-465, 1982.
23. Vander, A. J. y Miller, R.: *Am. J. Physiol.*, 207, 537-546, 1964.
24. Van Rossum, J. M.: *Archs. Int. Pharmacodyn.*, 43, 299-320, 1963.

