

EL FACTOR NATRIURÉTICO AURICULAR, ESTUDIO AUTORRADIOGRÁFICO ACOPLADO A LA MICRODENSIDAD COMPUTARIZADA: UNA NUEVA TECNOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE RECEPTORES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Anita Israel* y Juan M. Saavedra**

* Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

** National Institute of Mental Health, Laboratory of Clinical Sciences, Bethesda, MD, USA.

RESUMEN

Mediante el empleo de técnicas autorradiográficas acopladas a la microdensitometría computarizada, se localizaron y cuantificaron los receptores del péptido natriurético auricular (PNA), en áreas discretas de cerebros individuales de rata. Se localizaron sitios de unión para el PNA, de alta densidad, en órganos circunventriculares tales como el órgano subfornical (OSF), el área postrema (AP) y en los plexos coroideos (PC).

Las ratas genéticamente hipertensas (SHR), de 4 y 16 semanas de edad, presentaron una disminución significativa en la densidad de los sitios de unión para el PNA en el OSF, los PC y el AP, en comparación con las ratas normotensas controles (WKY) ($P < 0.01$). Nuestros resultados indican la existencia de una alteración del sistema Atriopeptinérgico central en este modelo de hipertensión genética. Igualmente, soportan la hipótesis de la presencia de sistemas locales de Angiotensina y de Atriopeptina centrales, que conjuntamente podrían estar participando en la regulación de funciones autonómicas, tales como el control cardiovascular y la regulación del metabolismo de fluidos y electrolitos.

INTRODUCCION

Recientemente se ha demostrado la existencia de numerosos péptidos en la aurícula de los mamí-

feros, entre ellos el factor natriurético auricular ó FNA (Currie y col., 1983, deBold y col., 1981, deBold y Flynn, 1983, Needleman y col., 1985, Flynn y col., 1983). Estos péptidos ejercen efectos profundos sobre la función renal, la secreción de aldosterona y la resistencia vascular (deBold y Salerno, 1982, Currie y col., 1983, Kudo y col., 1984). Se ha sugerido que estos péptidos podrían ejercer un papel activo en la regulación de la presión arterial y en la homeostasis de fluidos y electrolitos (Cantin y Genest, 1985). Existen evidencias que indican que algunos de los efectos cardiovasculares del FNA podrían estar mediados a través de mecanismos centrales. En el cerebro, se ha demostrado la presencia de una amplia red de neuronas, que contienen inmunorreactividad positiva FNA, en áreas relacionadas con el control cardiovascular como la AV3V (Jacobowitz y col., 1985, Saper y col., 1985). Se ha demostrado recientemente la presencia de sitios de unión de FNA en áreas específicas del sistema nervioso central tales como el órgano subfornical (OSF), el área postrema (AP), el núcleo del tracto solitario (NTS) y los plexos coroideos (PC) (Quirion y col., 1984, Saavedra y col., en prensa). El OSF y el AP, son estructuras circunventriculares que carecen de barrera hematoencefálica expuestas al péptido circulante, implicadas en la regulación de la presión arterial y en la secreción de vasopresina y que además, contiene una alta densidad de receptores de ANG II (Israel y col., 1985).

La localización anatómica exacta y la cuantificación precisa son esenciales para el estudio de las propiedades cinéticas de los receptores, así como para el estudio de la regulación fisiológica de los mismos en un sistema neurorregulatorio en particular. La descripción de los sitios de unión de FNA en el cerebro hasta el presente han sido meramente cualitativos (Quirion y col., 1984). En los últimos años se han desarrollado técnicas para la localización precisa de receptores para neurotransmisores y neuropéptidos centrales (Goochee y col., 1980, Unnerstall y col., 1982. Israel y col., 1984). Adaptando la tecnología existente para el estudio de receptores centrales de neuropéptidos, empleando un ligando marcado con I125, autorradiografía acoplada a la microdensitometría computarizada y comparación de las densidades ópticas obtenidas con las generadas por los standards-I125, podemos cuantificar y caracterizar completamente los receptores de neuropéptidos en áreas discretas del cerebro de la rata. Este método combina la ventaja de que, además de permitir la localización anatómica precisa, es más sensible y requiere de tiempos de exposición de la película relativamente cortos.

Con el fin de establecer si existen alteraciones en los sitios de unión del PNAr en las áreas relacionadas con la regulación cardiovascular, durante el período de establecimiento y desarrollo de la hipertensión espontánea en la rata, hemos empleado dicha técnica de autorradiografía-microdensitometría para el estudio y la caracterización de los sitios de unión del péptido natriurético auricular de la rata (6-33) (PNAr) en núcleos del cerebro de ratas genéticamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos, Wistar Kyoto (WKY), tanto jóvenes (4 semanas) como adultas (16 semanas).

MATERIALES Y METODOS

Preparación de los portaobjetos cubiertos.

Los portaobjetos fueron sumergidos en una solución de Alconox, removidos de dicha solución y hervidos en agua desionizada durante una hora. Sucesivamente, fueron lavados tres veces con agua destilada y colocados en alcohol al 80% durante la noche. Luego, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y sumergidos uno a uno, en una solución de gelatina recién preparada (2.5 gr de polvo de gelatina y 250 mg de sulfato de potasio y cromo en 500 ml de agua destilada). Posteriormente, se secaron en un horno a 37° C y se almacenaron en cajas libres de polvo.

Preparación de los tejidos

Se utilizaron ratas machos, SHR y WKY (Taconic Farms, Germatown, NY) de 4 y 16 semanas de edad, mantenidas a temperatura y luz constante desde las 06.00 hasta las 18.00 horas, permitiéndoles el libre acceso al agua y a la comida. Previamente al sacrificio, se determinó la presión arterial de cada grupo de animales experimentales mediante el uso de un electro-esfingomanómetro (Narco Biosystems, Inc., Houston, TX). Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación, entre las 09.00 y las 11.00 horas y sus cerebros inmediatamente removidos y congelados mediante inmersión en isopentano (-30°C). Dentro de las 24 horas siguientes al sacrificio, se cortaron secciones de tejido (16 μ m) mediante un criostato a -14°C. Las secciones fueron descongeladas y montadas sobre los portaobjetos previamente recubiertos con gelatina-crom-alum y colocados al vacío a 4°C, hasta el momento de la incubación.

Preparación de los standards de I125

Se prepararon un grupo de standards tal y como se describe originalmente para los standards de tritio. (Israel y col., 1984). Brevemente, cantidades conocidas y crecientes de ANG-I125 fueron mezcladas con una pasta de tejido cerebral de rata, previamente degasificada y mezclada al vacío. Las alícuotas fueron colocadas como bloques de tejido sobre una base de bronce del microtomo y congelados en hielo seco. Se prepararon secciones de 16 μ m de espesor mediante el uso del criostato a -14°C, se descongelaron y se montaron sobre un portaobjeto cubierto. Paralelamente se obtuvieron secciones consecutivas del mismo grupo de standards para determinar el contenido de proteínas (Lowry y col., 1951) y la radioactividad.

Marcaje de los sitios de unión del PNAr y autorradiografía

Los sitios de unión de PNAr fueron marcados in vitro, mediante la incubación del tejido con PNAr sintético marcado con I125 (3-125I)-iodotirosil 28 (actividad específica 1750 Ci/mmol, Amersham Corporation, Arlington, Heights, IL).

Dentro de las 48 horas siguientes a la preparación de las secciones de tejido, estas se preincubaron durante 15 minutos, en buffer Tris-HCL, 50 mm, pH7.4, a 20°C. Luego se incubaron, durante

una hora, en buffer fresco que contenía NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, albúmina sérica de bovino 0.5%, bacitracina 40 μ g/ml, leupeptina 4 μ g/ml, quimostatina 2 μ g/ml, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0.5 μ g/ml (Quirion y col., 1985) y concentraciones del péptido marcado (PNAr-I125) comprendidas entre 10 y 400 pM. La unión no específica fue determinada en secciones incubadas con el ligando radioactivo y en presencia de PNA sintético (péptido auricular de rata, 28 aminoácidos, Península Laboratories, Inc., Belmont, CA) en concentraciones de 0.025 a 1.0 μ M (Saavedra y col., en prensa). Después de incubadas, las secciones se lavaron tres veces (2 minutos cada una) con buffer Tris-HCl, 50 mM, a 4°C, y luego se secaron con una corriente de aire frío (Israel y col., 1984).

Tanto las secciones previamente incubadas como los estándares fueron colocados en un cassette metálico (CGR Medical Corp., Baltimore, Md.) y contrapuestos a una película sensible al tritio ultrafilm (3H) (LKB Industries, Rockville, Md.), durante 1 día (para concentraciones de 10 a 100 pM) ó 2 a 3 días (para concentraciones de 125 a 400 pM) y a temperatura ambiente en ambos casos. Al final de dicho período, se precedió a revelar las películas, a 20°C, durante 4 minutos, con revelador Kodak D19 no-diluido. Se cuantificaron las densidades ópticas (DO) de los estándares y las áreas específicas de los tejidos en el Ultrafilm mediante microdensitometría computarizada (Israel y col., 1984) (Figura 1a y 2a).

La radioactividad presente en cada una de las regiones específicas del cerebro se calculó mediante la comparación de las DOs observadas en el tejido, con las generadas al procesar los estándares de I125, en cada uno de los autorradiogramas. Cada grupo de estándares contenía concentraciones de radioactividad/ μ g de proteína desde 10 a 5000 dpm. Una imagen autorradiográfica típica de los estándares, lograda con microdensitometría computarizada, después de dos días de exposición del Ultrafilm, se puede observar en la Figura 1a. El método requiere obtener linealidad. En efecto, al graficar los valores de 1n DO leída para cada uno de los estándares contra el 1n de la radioactividad presente, se obtiene una relación lineal (Figura 1b). Las concentraciones molares de ligando unidas por mg de proteína tisular fueron determinadas mediante la interpolación de las DO de cada tejido en la recta obtenida de la curva estándares 1n-1n (Figura 1b). Los resultados se corrigen por la caída de la radioactividad del I125.

“Curva característica de la película”

El gráfico semilogarítmico de las densidades ópticas leídas en la película vs la radioactividad presente/ μ g de proteína corregida por el tiempo de exposición, genera la llamada “curva característica de la película”. Esta relación es similar a la previamente establecida para los estándares de tritio (Goochee y col., 1980) (Figura 1c). La pendiente de la curva nos da una medida del contraste fotográfico. A densidades ópticas menores de 0.2, los cambios de la pendiente en función del tiempo de exposición son muy pequeños, por lo tanto la discriminación entre los valores se dificulta. A DOs superiores a 1.6 unidades, la película se satura rápidamente y los datos que se obtienen resultan subestimados. Entre valores de DO comprendidos entre 0.2 y 1.6 unidades existe una relación lineal entre las DO y los dpm/ μ g de proteína \times tiempo de exposición. En esta zona de la curva, el contraste es grande, de manera que resulta fácil discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración de sitios de unión en una estructura en particular (Figuras 1c y 2). Con esta información se puede determinar el tiempo de exposición que produce el contraste óptimo, para cada tejido.

Análisis de datos

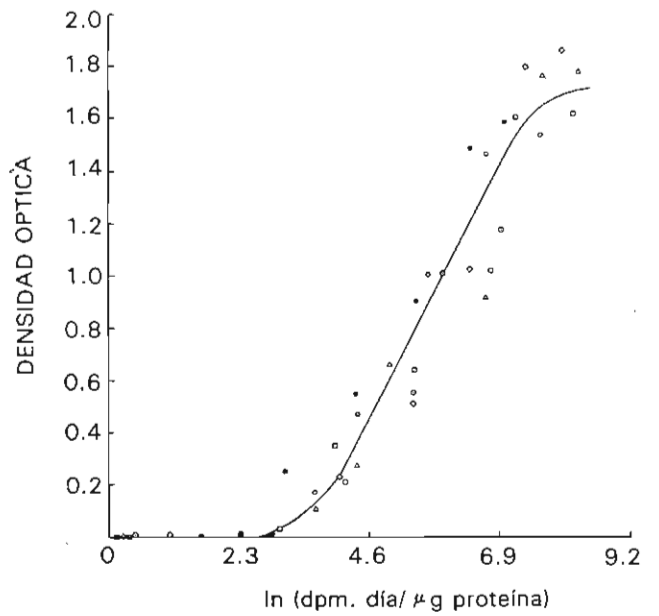
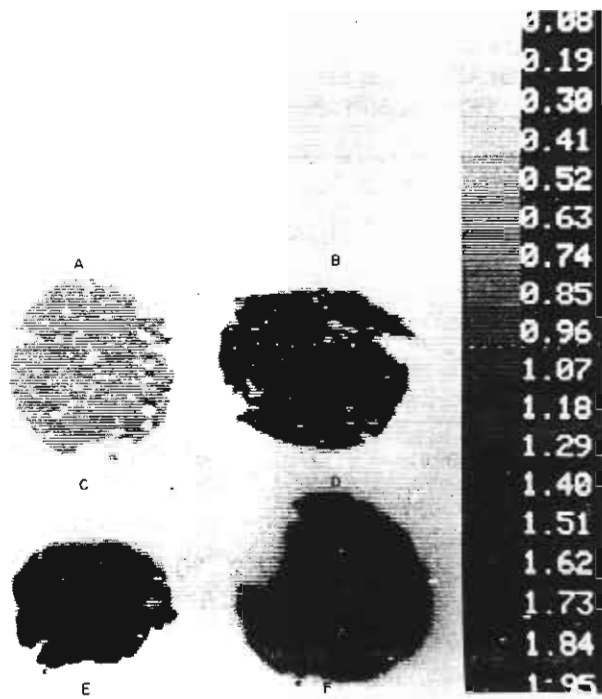
El cálculo de las cantidades molares de ligando unida a un tejido en particular, las curvas de saturación y el análisis de Scatchard se realizó mediante el empleo del programa LIGAND (Munson, 1983), seguido de la corrección de los datos en base al contenido de proteínas presente en los estándares. Los valores de máxima capacidad de unión (B_{max}) y la constante de afinidad (K_a) para el PNAr se calcularon en cada una de las áreas específicas del cerebro de cada animal.

Los resultados se presentan como medias + E.S.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante la prueba de t-Student.

RESULTADOS

Presión arterial

La presión arterial de las ratas SHR fue mayor, tanto en las de 4 como 16 semanas de edad, si se compara con las correspondientes ratas normotensas WKY. Los valores de presión arterial, en mmHg,



A. Imagen autorradiográfica con microdensitometría computarizada de un grupo de standards-I125 después de 2 días de exposición al Ultrafilm (3H). Cada sección contiene diferentes concentraciones de radioactividad por ug de proteína. A: 50 dpm; B: 75 dpm; C: 369 dpm; D: 1740 dpm; E: 4618 dpm y F: 6789 dpm.

C. Curva característica del Ultrafilm (3H) con standards-I125. Se grafican las densidades ópticas como función del \ln dpm/ug proteína \times tiempo de exposición. Cada punto representa el promedio de tres lecturas de DO de curvas standards triplicadas, generadas en los autorradiogramas. Los símbolos son los mismos que en B.

B. Gráfico 1n-1n de las densidades ópticas vs radioactividad (dpm/ug proteína) en los standards. Los tiempos de exposición fueron (\odot) 0.3, (\square, \bullet), 1 y (\diamond, \triangle) 3 días. Cada punto representa el promedio de tres lecturas de DO de curvas standards triplicadas, generadas en los autorradiogramas y preparadas para cada una de las películas usadas en la cuantificación de los receptores de PNAr. Las líneas punteadas representan el error standards estimado de X de Y. La ecuación general de la línea recta fue, para 39 pares de puntos, $Y = 0.665X + 0.73$; $r = 0.893$; F: 68.4 ($p < 0.0001$).

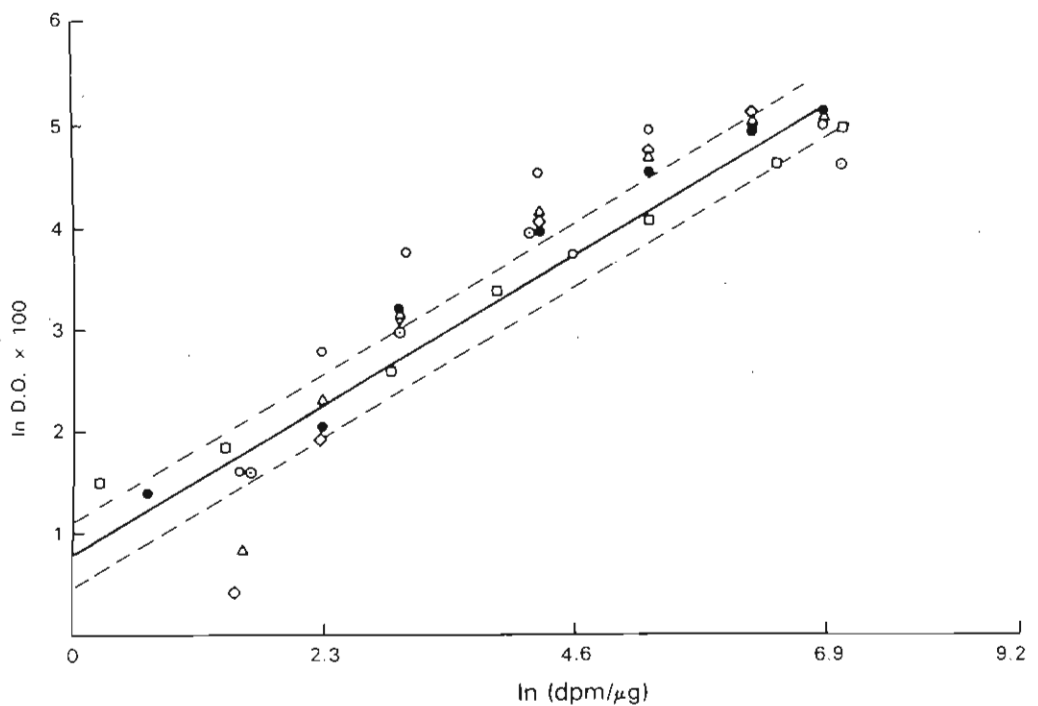


Figura 1. Cuantificación autorradiográfica con microdensitometría computarizada y standards-I125.

fueron: en las ratas jóvenes, WKY = 81 ± 3 , SHR = 111 ± 2 y en las adultas, WKY = 120 ± 2 , SHR = 193 ± 3 .

Unión de PNAr al cerebro de la rata

Se observó una gran densidad de sitios de unión del PNAr en áreas específicas del cerebro de la rata, incluyendo algunas relacionadas con la regulación cardiovascular.

El órgano subfornical, los plexos coroideos y el área postrema contienen una única clase de sitios de unión, que presentan alta densidad y alta afinidad para el PNAr-I125 (Figuras 2, 3 y 4). La adición de PNAr no marcado produce el desplazamiento de más del 80% del péptido marcado (no se muestran los resultados).

Cinética de unión de PNAr al cerebro de ratas WKY y SHR

Se realizaron las curvas de saturación y el análisis de Scatchard en secciones consecutivas de cerebros individuales de rata. Se observaron diferencias significativas en la máxima capacidad de unión del PNAr al OSF, a los PC y al AP en las ratas SHR, al compararlas con las normotensas WKY. Los resultados obtenidos en la máxima capacidad de unión (Bmax) y la constante de afinidad (Ka) se resumen en la Tabla 1 y en las figuras 3 y 4. En las ratas SHR jóvenes, el número de sitios de unión (Bmax) en las tres estructuras, fue significativamente menor que en las ratas controles normotensas (WKY). En relación a las constantes de afinidad, sólo se observaron diferencias significativas (incremento) en los plexos coroideos al comparar las SHR con las WKY.

Una alteración similar fue observada en dichas estructuras en las ratas adultas. En efecto, las ratas hipertensas presentaron una densidad de sitios de unión mucho menor para el PNAr-I125 en el OSF, los PC y el AP, que las ratas normotensas control (Tabla 1, Figuras 3 y 4). En relación a las constantes de afinidad, sólo se observó una disminución significativa en el OSF de las ratas SHR adultas comparadas con las WKY control.

DISCUSION

Las técnicas autorradiográficas acopladas a la microdensitometría computarizada y a la comparación contra standards-I125, han permitido la lo-

Tabla N. 1

SITIOS DE UNION DEL PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR (6-33) EN EL CEREBRO DE LAS RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS

	Máxima capacidad de unión (Bmax) (fmoles/mg proteína)	Constante de afinidad (ka) ($\times 10^{-9}$ M ⁻¹)
Ratas jóvenes:		
Organos subfornical WKY (7) SHR (5)	157.2 ± 20 $78.9 \pm 6^*$	4.03 ± 0.62 5.12 ± 0.74
Plexos coroideos WKY (7) SHR (7)	187.2 ± 12 $55.9 \pm 6^*$	3.84 ± 0.44 10.50 ± 2.50
Area postrema WKY (4) SHR (3)	109.9 ± 10 $54.1 \pm 7^*$	20.90 ± 4.00 18.01 ± 0.44
Ratas adultas:		
Organo subfornical WKY (7) SHR (6)	124.3 ± 11 $61.7 \pm 9^*$	11.10 ± 1.67 $4.25 \pm 0.55x$
Plexos coroideos WKY (7) SHR (5)	173.6 ± 23 $72.8 \pm 11^*$	7.60 ± 2.06 6.28 ± 0.82
Area postrema‡: WKY SHR	106.3 ± 8 $78.9 \pm 6^*$	ND ND

Los valores representan la media de n experimentos \pm E.S.M. Se realizaron los análisis Scatchard usando secciones consecutivas de tejido, para cada uno de los animales (ver métodos). * $P < 0.01$ (Prueba t de Student).

‡Datos obtenidos mediante la incubación de las secciones con una concentración única de PNAr-I125 (0.2 nM). ND: no determinado.

calización anatómica precisa y la caracterización del sitio de unión del PNAr en áreas específicas del cerebro de la rata. Este método presenta ventajas en relación a los métodos de unión a receptores en preparaciones de membranas parcialmente purificadas ya que, además de permitir la localización anatómica precisa, resulta ser mucho más sensible. Así, con este método se puede determinar, en un solo animal, la cinética completa de los receptores del PNAr en grupos celulares discretos de un tejido.

La cuantificación se logra optimizando el tiempo de exposición de la película sensible al tritio, que a su vez requiere de la determinación previa de la "curva característica de la película" (Unnerstall y col., 1982, Israel y col., 1984), así como el uso de standards de I125 recientemente preparados.

El tiempo óptimo de exposición de la película depende de la densidad de los sitios de unión en un área en particular, así como de la concentración y actividad específica del ligando marcado. Para tejidos con alta densidad de receptores ó cuando la concentración del ligando empleado es elevada, el tiempo de exposición del Ultrofilm (3H) es relativamente corto (de uno a tres días), a fin de prevenir la saturación de la película y obtener valores de DO en el rango lineal de la "curva característica".

Nuestros resultados demuestran que mediante esta tecnología es posible realizar la cinética completa del receptor de PNAr en núcleos discretos de una rata individual. El análisis cinético es una parte importante en los estudios cuantitativos de unión a receptores, ya que no solo nos permite determinar la máxima capacidad de unión (B_{max}) -una medida de la densidad de los receptores- sino que también nos permite calcular la constante de afinidad de la interacción ligando-receptor (K_a).

Nosotros hemos empleado el método autorradiográfico para localizar y caracterizar sitios de unión del PNAr en el tejido cerebral de la rata. Los sitios de unión, de alta densidad, para el PNAr se localizaron en el OSF, los PC y el AP. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones previas para un péptido sintético similar (ANF 8-33) en las mismas áreas cerebrales (Quirion y col., 1984).

Las tres estructuras presentaron una única clase de sitios de unión, de alta afinidad, saturables y específicos (Figura 3). Tanto el OSF como el AP son estructuras que pertenecen a los órganos cir-

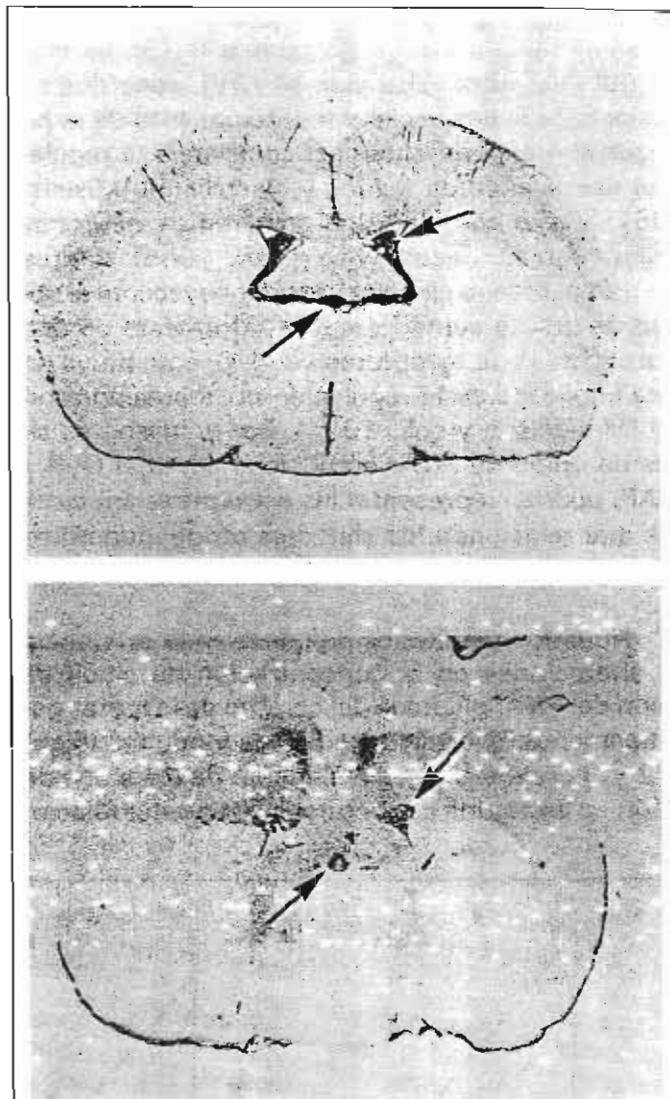


Figura 2. Localización autorradiográfica de los sitios de unión del PNAr I125 en secciones coronales de cerebro a nivel del órgano subfornical* de la rata. Las secciones fueron incubadas en presencia de 0.3 nM de PNAr I125 y expuestas por 2.5 días al Ultrofilm (3H). Las flechas apuntan al órgano subfornical y a los plexos coroideos. Nivel superior: sección de una rata WKY. Nivel inferior: sección de una rata SHR. * A 5780 μ m, eje antero-posterior de acuerdo a König y Klippel, 1963.

cuventriculares, que se caracterizan por carecer de barrera hematoencefálica. Si los sitios de unión en dichas estructuras fuesen fisiológicamente activos, estas áreas podrían representar un órgano blanco para el PNA circulante y un sitio para la interacción con el sistema angiotensinérgico central, así como para la regulación central de la presión arterial (Quirion y col., 1984) y para la secreción de vasopresina (Samson, 1985a).

El órgano subfornical envía proyecciones hasta el hipotálamo y en especial a la región anteroventral del tercer ventrículo (AV3V), zona que es crítica para el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión experimental, así como para la regulación del balance de fluidos y electrolitos (Miselis, 1981) y que contiene una gran red de neuronas ANF-positivas (Jacobowitz y col., 1985). El área postrema, órgano circunventricular adyacente al núcleo del tracto solitario, que está provisto de una alta densidad de receptores de ANG, constituye un área implicada en la regulación de la presión arterial (Mendelson y col., 1984). Por lo tanto, los sitios de unión de PNAr en núcleos como el OSF y el AP, podrían representar las estructuras anatómicas que relacionan los sistemas atriopeptinérgico central y periférico.

Nuestros resultados demuestran la existencia de alteraciones en la concentración de sitios de unión del PNAr en áreas del cerebro de las ratas genéticamente hipertensas, jóvenes y adultas (Figura 2 y 3; Tabla 1). La disminución de los sitios de unión en estas dos estructuras podría estar relacio-

nada con el incremento de la presión arterial en este modelo de hipertensión. En efecto, se ha reportado que el ANF inhibe la liberación de vasopresina inducida por hemorragia ó deshidratación, a través de un mecanismo central (Samson, 1985b). Por lo tanto, dicha reducción de los sitios de unión, podría estar relacionada con el incremento de los niveles circulantes de vasopresina reportados en las ratas SHR (Crofton y col., 1978). Adicionalmente, la reducción de los sitios de unión del PNAr podría estar modificando la función de los receptores de ANG que están presentes, en alta densidad, en estas estructuras (Israel y col., 1984). De esta manera, el PNAr podría estar actuando como un antagonista fisiológico en la modulación de la liberación de vasopresina, en la regulación de la presión arterial y del balance de fluidos y electrolitos, que está mediado por la angiotensina II.

Por otra parte, la presencia de sitios de unión de PNAr en los plexos coroideos podría estar relacionado con el papel de este péptido en el control del flujo de iones a través de la barrera cerebro-líquido cefalorraquídeo (Cantin y Genest, 1985). La

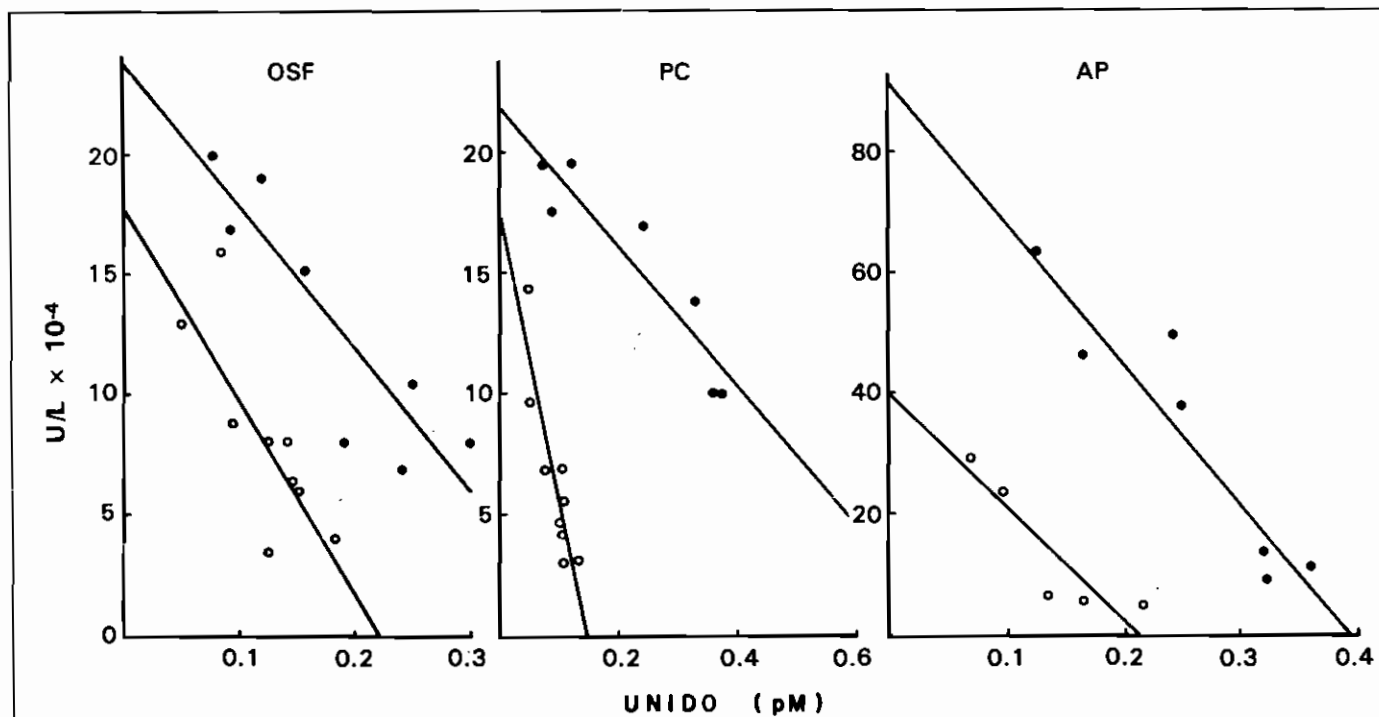
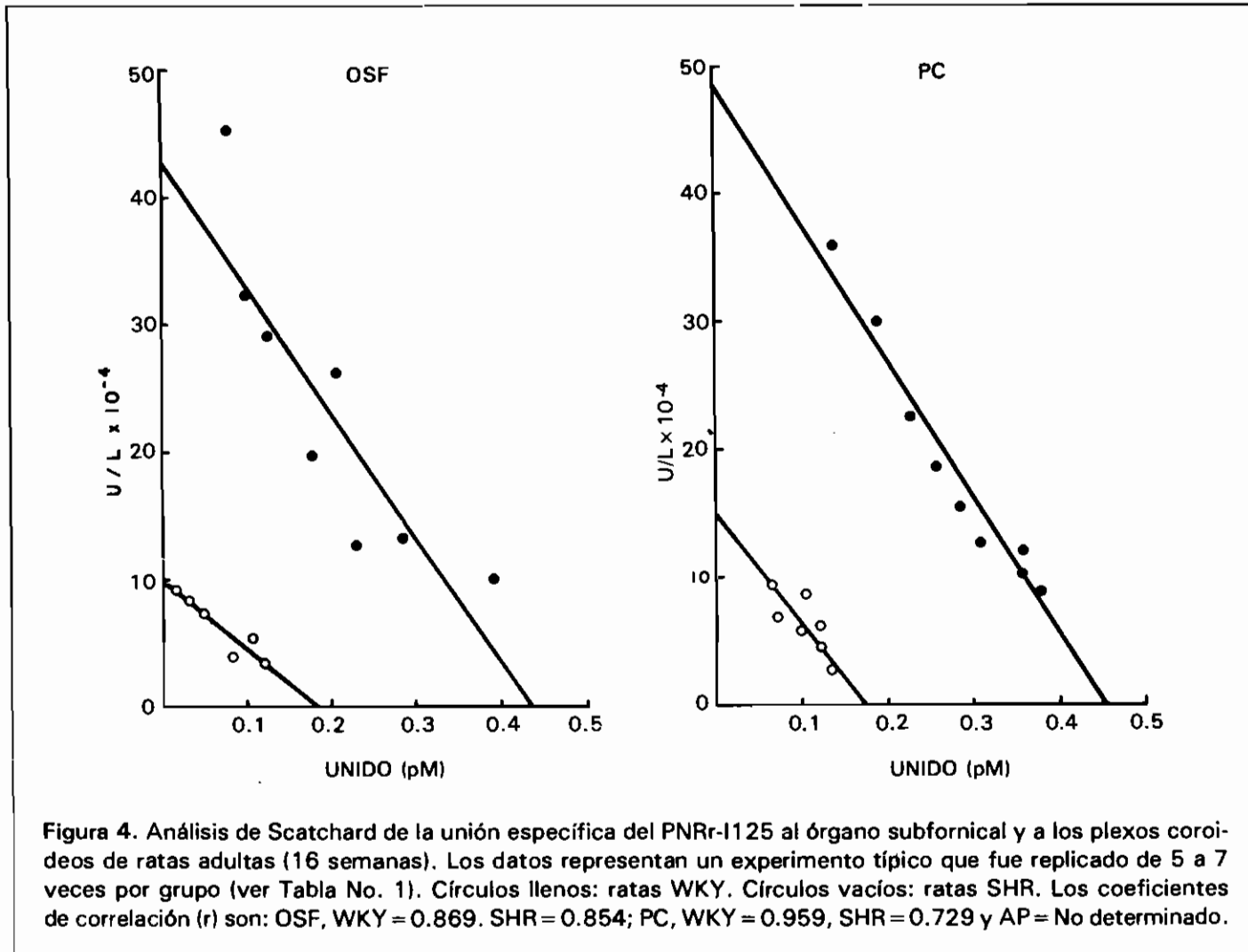


Figura 3. Análisis de Scatchard de la unión específica del PNAr-1125 al órgano subfornical, a los plexos coroideos y al área postrema de ratas jóvenes (4 semanas). Las secciones de tejidos de cada rata fueron incubadas tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan un experimento típico que fue replicado de 3 a 7 veces por grupo (ver Tabla No. 1). Círculos llenos: ratas WKY, Círculos vacíos: ratas SHR. Los coeficientes de correlación (r) son: OSF, WKY=0.902, SHR=0.765; PC, WKY=0.926, SHR=0.868; AP, WKY=0.928, SHR=0.898.

alteración observada en las ratas SHR sugiere un papel de estos péptidos en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión a nivel de los plexos coroideos.

Nuestros resultados soportan la hipótesis de una alteración del sistema atriopeptinérgico en este modelo de hipertensión genética. Las ratas SHR presentan una disminución en el contenido auricular de ANF (Sonnenberg y col., 1983) y un incremento de los niveles circulantes del péptido auricular (Cantin y Genest, 1985) comparados con los de las ratas normotensas WKY. La disminución de los sitios de unión del PNAr central podría representar un mecanismo de retroregulación negativa de los receptores centrales inducida por los niveles incrementados del péptido circulante, que resulta de la liberación crónica del mismo. Alternativamente, la reducción podría constituir la alteración primaria que llevaría a un incremento secundario de la liberación del péptido hacia la circulación.

Es interesante notar que en las ratas SHR, las alteraciones que sufren dos sistemas que coexisten en las mismas estructuras, como lo son el atriopeptinérgico y el angiotensinérgico son opuestas. Así, durante la fase de hipertensión establecida, el sistema renina-angiotensina se encuentra estimulado, tal y como se manifiesta por el incremento de los receptores del OSF (resultados no publicados), y por el incremento de los niveles de ANG y de la actividad de la enzima convertidora en el líquido cefalorraquídeo en ratas SHR (Ganten y col., 1975 y 1976, Israel y Saavedra, sometido), mientras que por el contrario, el sistema atriopeptinérgico central se encuentra deprimido (Saavedra y col., en prensa; Tabla 1 y Figura 3 y 4). Ambas alteraciones estarían dirigidas en una misma dirección, es decir, a un incremento del tono simpático, con elevación de los niveles circulantes de catecolaminas, ACTH y vasopresina, que contribuiría a la elevación de la presión arterial.



El uso de la técnica autorradiográfica además de permitir la determinación de los valores de Bmax y Ka de la unión de PNAr-1125 y la comparación de los mismos entre diferentes grupos de animales experimentales, nos ha permitido determinar alteraciones en las constantes cinéticas de la unión del PNA a los receptores en los núcleos centrales individuales de rata. Mediante la aplicación de esta tecnología se podrán aclarar los mecanismos fisiológicos de los sistemas atriopeptinérgicos central y periférico. Estas técnicas no están restringidas al estudio de los receptores de la atriopeptina, también ha sido aplicada para el estudio de la Angiotensina II (Israel y col., 1984); Israel y col., 1985), de la Sustancia P (Niwa, Shigematsu, Saavedra), del 351A-1125, un inhibidor específico de la enzima convertidora (Plunkett y col., en prensa) y podría ser aplicable para el estudio de cualquier otro receptor, amina o neuropéptido, en el sistema nervioso central ó en el periférico, con la única restricción de la disponibilidad del ligando marcado con 1125.

REFERENCIAS

- Cantin, M., and Genest, J.: The heart and the atrial natriuretic factor, *Endocrine Reviews* 6: 107-127, 1985.
- Crofton, J.T., Share, L., Shade, R.E., Allen, C. and Tarnowski, D.: Vasopressin in the rat with spontaneous hypertension. *Amer. J. Physiol.* 235: H361-H366, 1978.
- Currie, M.G., Geller, D.M., Cole, B.R., Boylan, J.G., Wu, Y.S., Holmberg, S.W. and Needleman, P.: Bioactive cardiac substances: Potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science* 221: 71-73, 1983.
- deBold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T. and Sonnenberg, H.A.: Rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.*, 2B: 89-94, 1981.
- deBold, A.J. and Flynn, T.G.: Cardionatrin I a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Life Sci.* 33: 297-302, 1983.
- deBold, A.J. and Salerno, T.A.: Natriuretic activity of extracts obtained from hearts of different species and from various rat tissues. *Can J Ohysiol Pharmacol* 61: 127-130, 1983.
- Flynn, T.G., deBold, M.L. and deBold, A.J.: The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 859-865, 1983.
- Ganten, D., Hutchinson, J.S., Ganten, U. and Schelling, P.: In *Central Nervous Control of Na+ Balance: Relations to the Renin-Angiotensin System*, eds. Kaufman, W. and Krause, D.K. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart) pp. 35-50, 1976.
- Ganten, D., Hutchinson, J.S. and Schelling, P.: The intrinsic brain isorenin-angiotensin system in the rat: its possible role in central mechanisms of blood pressure regulation. *Cli. Sci. Molec. Med.*, 48:265-268, 1975.
- 1) Gooch, C., Rasband, W. and Sokoloff, L: Computerized densitometry and color coding of (14C) deoxyglucose autoradiograms. *Ann. Neurol.* 7: 359-370, 1980.
- 1) Israel, A., Correa, F.M.A., Niwa, M. and Saavedra, J.M.: Quantitative determination of angiotensin II binding sites in rat brain and pituitary gland by autoradiography. *Brain Res.* 322: 341-345, 1984.
- 2) Israel, A., Plunkett, L.M. and Saavedra, J.M.: Quantitative autoradiographic characterization of receptors for angiotensin II and other neuropeptides in individual brain nuclei and peripheral tissue from single rats. *Cellular and Molecular Neurobiol.* 5: 211-222, 1985.
- Israel, A. and Saavedra, J.M.: High levels of angiotensin converting enzyme (Kininase II) in cerebrospinal fluid of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Sometido.*
- Jacobowitz, D.M., Skoftsch, G., Keiser, H.R., Eskay, R.L. and Zamir N.: Evidence for the existence of atrial natriuretic factor-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 40: 92-94, 1985.
- Konig, J.F.R. and Klippel, R.A.: *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* Williams and Wilkins, Baltimore, 1963.
- Kudo T. and Baird A.: Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature* 312: 756-757, 1984.
- 1) Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- Miselis, Richard R.: The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res.*, 230: 1-23, 1981.
- 1) Mendelson, F.A.O., Quirion, R., Saavedra, J.M., Aguilera, G. and Catt, K.J.: Autoradiographic localization of angiotensin ii receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1575-1579, 1984.

- Munson, P.J.: Ligand: a computerized analysis of ligand binding data. In: Langone, J.J., and Van Vunakis, H. (Eds. *Methods in Enzymology*, Vol 92, Immunological Techniques. Academic Press, New York, part E: p. 543, 1983.
- Plunkket, L.M., Correa, F.M.A. and Saavedra, J.M.: Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme binding in rat pituitary and adrenal glands with 125I-351A, a specific inhibitor. *Regulatory Peptides*, in press.
- Needleman, P., Adams, S.P., Cole, B.R., Currie, M.G., Geller, D.M., Michener, M.L. Saper, C.B., Schwartz, D. and Tandaert, D.G.: Atriopeptins as cardiac hormones. *Hypertension*, 7, 469-482, 1985.
- Quirion, R., Dalpe, M., De Lean, A., Gutkowska, J., Cantin, M. and Genest, J.: Atrial natriuretic factor (ANF) binding sites in brain and related structures. *Peptides*, 5: 1167-1172, 1984.
- Saavedra, J.M., Israel, A., Kurihara, M. and Fuchs, E.: Decreased number of rat atrial natriuretic peptide (6-33) binding sites in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. *Circulation Res.*, in press.
- Samson, W.K.: Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. *Neuroendocrinology*, 40, 277-279, 1985a.
- Samson, W.K: Dehydration-induce alterations in rat brain vasopressin and atrial natriuretic factor immunoreactivity. *Endocrinology*, 117: 1279-1281, 1985b.
- Saper, C.B., Standaert, D.G., Currie, M.G., Schuwartz, D., Geller, D.M. and Needleman, P.: Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: presence in cardiovascular regulatory areas. *Science* 227, 1047-1049, 1985.
- Sonnenberg, H., Milojevic, S., Chong, C.K. and Veress, A.T.: Atrial natriuretic factor: reduced cardiac content in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 5, 672-675, 1983.
- Unnerstall, J.R., Niehoff, D.L., Kuhar, M.J. and Palacios, J.M.: Quantitative receptor autoradiography using (3H) Ultrofilm: Application to multiple benzodiazepin receptors. *J. Neurosci. Methods*, 6: 59-73, 1982.