

## LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA SE ENCUENTRA INCREMENTADA EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO DE LAS RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

Anita Israel y Juan M. Saavedra

Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela y Section of Preclinical Neuropharmacology, Laboratory of Clinical Science, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland 20892 USA.

### RESUMEN

Las ratas de 4 y 10 semanas de edad, espontáneamente hipertensas (SHR) y sus correspondientes controles normotensos Wistar Kyoto (WKY). Las ratas SHR adultas mostraron una mayor actividad EC en el líquido cefalorraquídeo que las normotensas WKY ( $32.5 \pm 5$  y  $19.6 \pm 1.01$  nmol/hr/ml respectivamente,  $P < 0.025$ ). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en la actividad enzimática del LCR de los animales jóvenes.

Nuestros resultados soportan la hipótesis de que el sistema renina-angiotensina central se encuentra sobreactivado en las ratas genéticamente hipertensas y sugieren que la medición de la actividad EC del LCR podría constituir un índice de los cambios fisiopatológicos que ocurren en el sistema renina-angiotensina central durante el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión.

### INTRODUCCION

La enzima convertidora (EC, Kininasa II, EC. 3.4.15.1) es una dipeptidil-peptidasa que escinde el dipéptido His-Leu de la porción COOH-terminal de la angiotensina I para formar la angiotensina II (ANG) (1, 2). Se ha reportado actividad EC en el ce-

rebro de ratas hipertensas (4, 9, 13, 20), lo cual sugiere que la enzima podría estar contribuyendo con la regulación de los niveles de ANG central, en áreas cerebrales relacionadas con la regulación cardiovascular. Se ha demostrado igualmente, la presencia de EC en el líquido cefalorraquídeo de la rata y de humanos (12, 17). Existen evidencias que indican que el sistema angiotensinérgico se encuentra asociado con la hipertensión genética. En efecto, se ha demostrado que las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) presentan alteraciones del sistema renina-angiotensina tanto periférico como central. En estos animales se observa una actividad EC plasmática disminuida (5) así como una depresión generalizada del sistema renina-angiotensina periférico (21). Por el contrario, el sistema angiotensinérgico central se encuentra sobreactivado. Así, las ratas SHR presentan una mayor actividad renina e inmunoreactividad positiva a ANG en áreas del cerebro relacionadas con la regulación cardiovascular, cuando se comparan con los controles WKY (7, 11). Mediante técnicas autorradiográficas se ha demostrado un incremento de la afinidad y de los sitios de unión de la ANG en estructuras cerebrales localizadas, tales como el órgano subfornical, el área postrema y el núcleo del tracto solitario de las ratas SHR

(26, 28). Adicionalmente, se han reportado alteraciones de la actividad EC en áreas específicas del cerebro de las ratas hipertensas (5, 28). Tanto la administración intracerebroventricular de Captopril —un inhibidor específico de la EC— como la infusión central de Saralasin —bloqueante de los receptores de ANG— reducen más efectivamente la presión arterial en las ratas SHR que en las WKY (10, 20, 23). Igualmente, las ratas genéticamente hipertensas presentan una supersensibilidad a la administración central de ANG (9). Estos resultados sugieren que todo el SRA central se encuentra estimulado (20, 24), hecho que a su vez contribuiría al desarrollo y mantenimiento de la elevada presión arterial en las ratas SHR.

Estudios en líquido cefalorraquídeo, tanto de ratas genéticamente hipertensas (20, 24) como de humanos hipertensos (22, 27), revelan que algunos de los componentes del sistema renina-angiotensina, como la angiotensina II (20, 24) y el angiotensinógeno (22, 27), se encuentran elevados durante la hipertensión. Aún no se ha establecido el significado de la elevación de estos componentes, el cual dependería de la actividad de los receptores de los mismos alterada durante la hipertensión genética, cambio éste que podría reflejar la hiperactividad del sistema ANG central en estos animales. Para ello, se determinó la actividad EC-LCR en ratas jóvenes (4 semanas) y adultas (16 semanas) SHR y en sus respectivos controles normotensos, Wistar Kyoto (WKY).

## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Se emplearon ratas de 4 y 16 semanas de edad, espontáneamente hipertensas (SHR) y sus respectivos controles normotensos, Wistar Kyoto (WKY) (Taconic Farms, German Town, N.Y.). Los animales se mantuvieron durante una semana en condiciones constantes de temperatura y foto-períodos (con luz desde las 06:00 hasta las 18:00). Se les proporcionó agua y alimento ad libitum. Dos días antes del experimento se determinó la presión arterial, en animales no anestesiados, mediante el ple-tismógrafo de cola, y empleando un electroesfigmomanómetro (Narco Biosystems, Houston, TX). Para las determinaciones de la actividad EC-LCR, se emplearon un total de 9 ratas jóvenes y 17 adultas SHR y WKY, respectivamente.

### Recolección de las muestras del líquido cefalorraquídeo

Se recolectó una muestra de los 50  $\mu$ l iniciales de LCR, mediante punción de la Cisterna Magna, bajo anestesia con pentobarbital (40 mg/kg p.é.). Para ello, bajo anestesia, se expuso la membrana atlanto-occipital, y se insertó en la Cisterna Magna una aguja de 23-Gauge conectada a un tubo de polietileno. Se dejó fluir el LCR libremente a través del tubo y se tomaron precauciones para evitar la contaminación del LCR con sangre. Las muestras se examinaron al microscopio y aquellas en las que se detectó la presencia de glóbulos rojos fueron desechadas. Las muestras de LCR se congelaron inmediatamente y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo.

### Método para la determinación de la actividad enzima convertidora

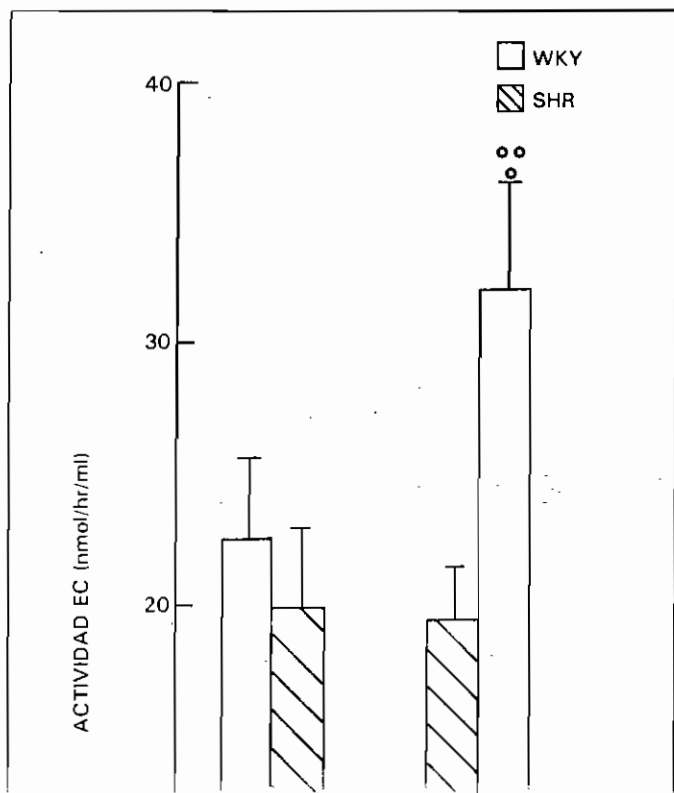
Las muestras de LCR de cada uno de los animales individuales, fueron incubadas con alfalogta (1.0  $\mu$ mol/l) (3.0 Ci/mol, New England Nuclear, Boston, MA) durante 30 minutos a 37°C en un volumen final de 1 ml. La reacción se detuvo con la adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v).

El precipitado se centrifugó y se resuspendió en 1 ml de agua destilada. La actividad de la enzima se determinó mediante la medición de la actividad de la alfalogta (1 mivi) (3.0 Ci/mol, New England Nuclear, Boston, MA). Los resultados se expresaron como actividad enzimática por ml de LCR (nmol/hr/ml). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  E.S.M. La significancia entre las medias se determinó mediante la prueba de t de Student. La regresión lineal y el coeficiente de correlación se efectuaron mediante el método de los mínimos cuadrados (31).

## RESULTADOS

La presión arterial se encontró elevada tanto en las ratas SHR de 4 y 16 semanas de edad si se compara con las respectivas ratas normotensas control WKY. Sin embargo, el incremento en la P.A. de las ratas jóvenes SHR no resultó estadísticamente significativo. Las presiones arteriales medias fueron (en mmHg): WKY  $96 \pm 9$ , SHR  $111 \pm 5$  (4 semanas); WKY  $122 \pm 8$ , SHR  $178 \pm 11$  (16 semanas) ( $P < 0.01$ ).

Se observaron diferencias significativas entre las actividades EC del LCR de las ratas SHR adultas cuando se comparan con las de las ratas WKY control. En efecto, las ratas SHR de 16 semanas de edad presentaron una actividad EC (pmol/hr/ml)



**Figura 1.** Actividad Enzima Convertidora (EC) del líquido cefalorraquídeo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus correspondientes controles normotensos Wistar Kyoto (WKY). La actividad EC se expresa como pmol/hr/ml. Los valores representan la media  $\pm$  E.S.M. En las ratas adultas SHR > WKY (\*\*P < 0.025) y en las ratas SHR: adultas < jóvenes (\*P < 0.05) (Prueba de t de Student).

del LCR mayor que las correspondientes WKY:  $32.3 \pm 5$  y  $19.64 \pm 1.01$ , respectivamente,  $P < 0.025$ ) (figura 1). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la actividad EC del LCR en las ratas jóvenes de 4 semanas ( $17.3 \pm 2.8$  y  $22.5 \pm 3$  nmol/hr/ml para las SHR y WKY, respectivamente). Adicionalmente, se observó que la actividad de la EC del LCR de las ratas SHR adultas fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que en las ratas SHR jóvenes. No se observaron diferencias entre las actividades EC-LCR de las ratas jóvenes y adultas WKY.

En las ratas adultas, aun cuando no se encontraron correlaciones significativas entre la EC-LCR y la presión arterial media en las ratas WKY y SHR separadamente, al combinar los dos grupos, se observó una correlación baja, pero significativa:  $Y = 131.4X + 0.589$ ;  $r = 0.349$ ;  $P < 0.05$ , para 33 puntos. En ningún caso, se observaron correlaciones significativas en los animales jóvenes.

## DISCUSION

La participación del sistema renina-angiotensina central (SRA) en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión ha sido ampliamente establecido (6). La presencia de renina y otros elementos del SRA en el sistema nervioso central de la rata, en áreas asociadas con el control cardiovascular han sido demostrados mediante estudios tanto bioquímicos como inmunohistoquímicos (6, 7, 11, 16). Algunos de los componentes de SRA han sido identificados en el LCR: angiotensinógeno, angiotensina I y II y EC (12). La ANG del LCR podría ser sintetizada en

re la transferencia de la EC hacia el LCR?, aún no se ha establecido. Sin embargo, algunos estudios soportan el origen central de la EC-LCR. En efecto, evidencias bioquímicas indican que existen diferencias entre la actividad EC plasmática y del LCR (17), también se ha demostrado que en las ratas hipertensas existe una disociación de la alteración de los niveles de la EC plasmáticas y del LCR (5 y resultados presentes). Nuestros resultados muestran una actividad EC incrementada en el LCR de las ratas hipertensas espontáneas, lo que indicaría una alteración del SRA central. Esta alteración sólo ocurre en los animales adultos, lo que sugiere que la misma pudiera tener alguna relación con el estado de hipertensión establecida o bien podría constituir una consecuencia secundaria a la presión arterial elevada.

Nuestras observaciones complementan las previamente reportadas acerca de incrementos en los niveles de ANG y de angiotensinógeno centrales (12, 20, 22), tanto en ratas genéticamente hipertensas como en sujetos humanos hipertensos y soportan la hipótesis de un SRA central sobreactivado en la hipertensión genética (6, 7, 8, 20).

- chemical studies in rats, *Neurosc. Lett.*, 22 (1981) 125-130.
15. Mikami, H., Suzuki, H., Smeby, R.R. and Ferrario, C.M.: Cerebrospinal fluid angiotensin II immunoreactivity is not derived from plasma, *Hypertension* 7 (1985) 65-71.
  16. Fuxe, K., Ganten, D., Hokfelt, T. and Bolme, P., Immunohistochemical evidences for the existence of angiotensin II containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat, *Neurosc. Lett.*, 2 (1976) 229-234.
  17. Schweisfurth, H. and Schiöberg-Schieguitz, S., Assay and Biochemical characterization of angiotensin-I-converting enzyme in cerebrospinal fluid, *Enzyme* 32 (1984) 12-19.
  18. Ganten, D. and Speck, G., The brain renin-angiotensin system. A model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochem. Pharmacol.*, 27 (1978) 2379-2389.
  19. Schelling, P., Ganten, D., Heckl, R., Hayduk, K., Buckley, J.P. and Ferrario, C.M. eds. (Pergamon press, N.Y.) (1977) 519-526.
  20. 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 (1975) 265-268.
  21. Shioni, K. and Sokabe, H., Renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol.*, 231 (1976) 259-266.
  22. Finkielman, S., Fischer-Ferraro, C., Diaz, A., Goldstein, D.J. and Nahmod, V.E., A pressor substance in the cerebrospinal fluid of normotensive and hypertensive patients, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69 (1972) 3341-3344.
  23. Hutchinson, J.S., Mendelsohn, F.A.O. and Doyle, A.E., Blood pressure responses of conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats to intracerebroventricular and peripheral administration of Captopril, *Hypertension*, 2 (1980) 546-550.
  24. Healy, P.D. and Prinz, M., Angiotensinogen levels in the brain and cerebrospinal fluid of the genetically hypertensive rat, *Hypertension* 7 (1985) 752-759.
  25. Saavedra, J.M. and Chevillard, C.: Angiotensin-converting enzyme is present in the subfornical organ and other circumventricular organs of the rat. *Neurosc. Lett.* 29 (1982) 123-127.
  26. Plunkett, L.M. and Saavedra, J.M.: Increased angiotensin II binding affinity in nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82 (1985) 7721-7724.
  27. Ito, T., Eggena, P., Barrett, J.D., Katz, D., Metler, J. and Sambhi, M.A.: Studies on angiotensinogen of plasma and cerebrospinal fluid in normal and hypertensive human subjects. *Hypertension* 2 (1980) 433-439.
  28. Chevillard, C., Niwa, M. and Saavedra, J.M.: Angiotensin converting enzyme in discrete forebrain areas of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 309 (1984) 389-392.
  29. Saavedra, J.M., Correa, F.M.A., Plunkett, L.M., Israel, A., Kurihara, M. and Shigematsu, K.: Angiotensin and atrial natriuretic peptide binding in brain of hypertensive rats. *Nature* 320 (1986) 758-760.
  30. Rohrbach, M.S.: (Glycine-1-C14) Hippuryl-L-Histidyl-L-leucine: A substrate for the radiochemical assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal. Biochem.* 84 (1978) 272-276.
  31. Snedecor, G.W. and Cochran, W.C.: *Statistical Methods*, 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1980.

Enviar correspondencia a: Dra. Anita Israel. Apartado Postal 50176, Sabana Grande 10-50 A, Caracas, Venezuela.