

03.75.06

RADIOQUIMICA

Preparación de angiotensina I ¹²⁵I*

Determinación de la actividad plasmática de la renina por radioinmunoensayo

J. H. HAUGER-KLEVENE,¹ E. L. QUIHILLALT y A. E. A. MITTA

* Comisión Nacional de Energía Atómica dependiente de la Presidencia de la Nación.

¹ Miembro de la Carrera del Investigador CONICET - Hospital Rawson, Centro de Medicina Nuclear.

Resumen

Se describe la preparación de Angiotensina I ¹²⁵I de actividad específica 150-200 mCi/mg, la preparación del antisuero de Angiotensina I y su utilización en el dosaje del nivel plasmático de la renina por radioinmunoensayo en distintas situaciones fisiológicas y patológicas.

Summary

The preparation (150-200 mCi/mg) Angiotensina I ¹²⁵I is described, as well as its use in the measurement of plasma renin levels by radioimmunoassay in a variety of clinical situations.

Introducción

A partir de fines de 1959 en que Yallow y Berson (1) describieron la técnica de radioinmunoensayo para la medición de insulina, se empezó a utilizar la misma metodología para la determinación de los niveles de varias hormonas de naturaleza proteica, entre ellas la hormona de crecimiento (2) y el ACTH (3).

La División Moléculas Marcadas, Área Radioisótopos y Radiaciones de la CNEA, se ha ocupado de la marcación y control de: insulina (4), hormona del crecimiento humano (5), hormona tiroestimulante (6), hormona coriónica gonadotrófica (7), hormona luteinizante (8), parathormona (9) y ACTH (10).

En este trabajo se describe el método usado para la marcación y purificación de Angiotensina I y aplicación en la clínica.

MARCACIÓN DE ANGIOTENSINA I (AT I)

La Angiotensina I fue obtenida de la Beckton Dickinson and Co. USA.

El método utilizado para marcar la AT I fue el de Hunter y Greenwood (11) y la hormona fue purificada, después de la marcación, utilizando una resina de intercambio iónico.

REACTIVOS

- 1) 1 mCi ¹²⁵INa, libre de portador y reductor. Concentración de actividad 400 mCi/ml.
- 2) Solución reguladora de fosfato de sodio 0,5 M, ajustada a pH 7,5.
- 3) Solución de cloramina T (1,5 mg/ml).

ACTA BIOQUÍMICA CLÍNICA LATINOAMERICANA, Vol. IX, Nº 3, 177-190, 1975.
Incorporada al Chemical Abstract Service. Código bibliográfico: **BQCLAW**.

- 4) Solución de metabisulfito de sodio (2 mg/ml).
- 5) Resina De Acidite FF (1,5 mEq/ml).

MÉTODO DE MARCACIÓN

En una celda de reacción previamente siliconada, colocada en hielo y protegida con película "parafilm", se añaden:

- 1) Aproximadamente 1 mCi de ¹²⁵I Na sin portador ni reductor (400 mCi/ml).
- 2) 25 µl de una solución reguladora de fosfato 0,5 M pH 7,5.
- 3) 25 µl (37 µg) de cloramina T, recientemente preparada, disuelta en solución reguladora de fosfato 0,05 M pH 7,4.
- 4) 25 µl (5 µg) Angiotensina I, disuelta en ácido acético 0,01 N.
- 5) 50 µl (100 µg) de metabisulfito de sodio en solución de fosfato 0,05 M, pH 7,4 recientemente preparada.
- 6) 1 ml de albúmina humana al 7 % en solución reguladora de fosfato 0,5 M (con agregado de lisozima de huevo 0,25 % como inhibidor proteolítico).

PURIFICACIÓN

A) Intercambiador aniónico

Se prepara una columna de vidrio siliconada de 5 cm de largo por 1 cm de diámetro llevándola con 250 mg de resina aniónica De Acidite FF, previamente saturada con albúmina humana al 1 % y 0,25 % de lisozima de huevo, todo en solución reguladora de fosfato 0,5 M.

Se introduce el contenido de la celda de reacción en la columna y se lava con albúmina humana 0,3 %, lisozima de huevo 0,25 % en solución reguladora de veronal 0,02 M. El producto marcado es eluido en aproximadamente 2 ml.

PURIFICACIÓN ANGIOTENSINA

L-Asp-L-Arg-L-Val-L-Tyr(¹²⁵I)-L-Ileu-L-His-L-Pro-L-Phe-L-His-L-Leu

PH: 1419 SEPHADEX: G-25 (medio

RENDIMIENTO: 79 %

Act. Especifica: 144 mCi/mg

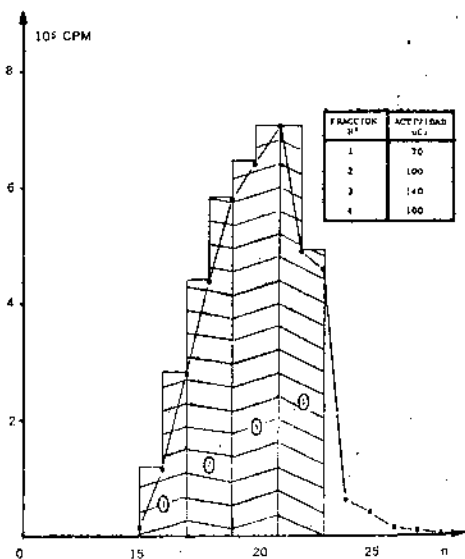


Fig. 1. Purificación de Angiotensina I ¹²⁵I.

B) Filtración en gel

A fin de separar la posible dilodoangiotensina formada en la reacción de marcación, caracterizada por una menor inmunorreactividad que la monoiodoangiotensina (12), se ensayó la purificación por filtración en gel.

Para ello, la mezcla de reacción se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 (medio) de 1 cm de diámetro por 50 cm de largo, previamente saturada con albúmina humana al 0,25 %, en solución reguladora de fosfato 0,35 M, pH 7,5 que contiene lisozima de huevo al 0,25 %, siendo la velocidad de elución de 15 ml/h. Se recogieron alícuotas de 1 ml; la angiotensina marcada comenzó a aparecer a partir del eluido 15 al 26 (fig. 1). Se consideraron cuatro fracciones, I, II, III y IV, cuyas actividades fueron de 70, 100, 140 y 100 μ Ci, respectivamente.

CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DE REACCIÓN

Se efectúa por cromatoelectroforesis de una alícuota del tubo de reacción y con veronal 0,02 M y Azul de Bromofenol. Se siembra en papel Whatman 3 MM (tiras de 3,5 cm de ancho y 45 cm de largo), se corre a 500 voltios durante 90 minutos. Se sacan las tiras y se pasan por un radioscanner Packard, modelo 7200; se determinan los porcentajes por pesada.

FRACCIONAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN

La hormona marcada se envía en alícuotas congeladas en envases de poliestireno de 5 ml de capacidad, dentro de las 24 h de producida y con las siguientes especificaciones:

- Actividad específica: 150-200 mCi/mg
- Daño: 5 %
- Volumen: 2 ml
- Actividad total: 200 μ Ci

RADIOINMUNOENSAYO PARA ANGIOTENSINA I

El método de radioinmunoensayo utilizado para medir los niveles plasmáticos de AT I se basa en la capacidad de la AT I humana de competir con la AT I sintética, marcada con ¹²⁵I por unirse a un antisuero contra AT I sintético.

PREPARACIÓN DEL ANTISUERO A LA AT I

El antisuero se obtuvo inmunizando conejos con AT I. Los animales utilizados fueron conejos machos (raza New Zealand) de 4 a 6 semanas de edad. El antígeno para cada inyección se preparó de la siguiente manera: 1 mg de AT I (Asp³-isoleu⁵-AT I (a); se mezcló con 0,5 mg de carbón (Norit A) (b); 0,1 mg de bacilos tuberculosos muertos (lavados, dializados y liofilizados) (c); 0,5 mg de Belloid DT (d). Esta mezcla se disolvió en 1 ml de adyuvante de Freund incompleto y 0,5 ml de solución fisiológica. Las inyecciones se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Boyd y Perar (13). La primera inyección se realizó en el tejido esplénico y las inyecciones siguientes se realizaron cada 15 días por vía subcutánea.

El 50 al 75 % de los conejos respondió, produciendo anticuerpos a la AT I entre la 6ª y 8ª semana después de la primera inyección. Los títulos máximos de anticuerpos se encontraron entre la 10ª y 18ª semana después de la primera inyección. El plasma del animal con mayor título se utilizó para los estudios.

Para obtener una mayor sensibilidad en las determinaciones, se estudiaron curvas variando la dilución del antisuero. La tabla I muestra la relación entre la AT I ^{125}I , ligada al anticuerpo (B) y la AT I ^{125}I libre (F), obtenida utilizando antisuero en diluciones de 1/1.000 a 1/24.000 y (A) con concentraciones máximas y mínimas de mg. AT I entre 125 y 150 mg. La dilución de 1/16.000 del anticuerpo permitió obtener curvas con mayor sensibilidad que las logradas con diluciones más bajas. Por otra parte, en diluciones más altas (ej.: 1/24.000), la relación de B/F es demasiado baja y no permite realizar determinaciones correctas.

TABLA I - Relación entre la Angiotensina I ^{125}I , ligada al anticuerpo (B) y la AT I ^{125}I libre (F), variando la concentración del anticuerpo.

ANTISUERO CONCENTRACIÓN FINAL	B/F
1 = 1.000	0,41
1 = 3.000	0,40
1 = 6.000	0,50
1 = 12.000	0,55
1 = 16.000	0,76
1 = 24.000	0,32

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL RADIOINMUNOENSAYO

1. Solución madre de carbón-dextrán

0,25 g de dextrán 70 (PM: 70.000) (e) se disuelven en 85 ml de solución buffer de barbital. Después se agrega 2,5 g de Norit A y se disuelve esta mezcla en 100 ml de solución reguladora de barbital (solución Nº 7). Esta solución debe agitarse continuamente durante 24 h a 4 °C y se debe guardar refrigerada.

2. Solución de trabajo de carbón-dextrán

Esta solución es la que se va a utilizar en el radioinmunoensayo. Esta solución es una dilución 1:4 de la solución madre de carbón dextrán, disuelta en la solución reguladora de barbital (solución Nº 7). Se agrega 1 ml a cada tubo.

3. Solución de 8-hidroxiquinolina

Se disuelven 660 mg de sulfato de 8-hidroxiquinolina (f) en 10 ml de agua destilada (solución 0,34 M). Esta solución se debe conservar en la oscuridad.

4. Dimercaprol (2,3 dimercaprol-1-propanal: MAL g)

Se diluyen 0,8 ml de dimercaprol en 9,2 ml de benzoato de bencilo (solución 0,806 M).

5. Solución reguladora de tris-acetato

Se diluyen 6 g de tris base (h) en 500 ml de agua destilada (solución 0,1 M). El pH se ajusta a 7,4 con aproximadamente 2,5 ml de ácido acético glacial.

6. Solución reguladora de tris-acetato con lisozima (i)

Se agrega 1 mg de lisozima por ml de la solución buffer N° 5. Esta solución se utiliza para diluir las muestras de plasma.

7. Solución reguladora de barbital

Se disuelven 3,8 g de cloruro de sodio, 0,7 g de barbital sódico y 0,4 g de acetato de sodio en 450 ml de agua destilada. El pH se ajusta a 7,4 con aproximadamente 25 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. Esta solución se debe conservar refrigerada.

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

La sangre se saca en tubos que contienen 0,3 ml EDTA (etilendiaminotetraacético). Los tubos se mantienen en hielo hasta el momento de ser centrifugados en frío (4 °C). El plasma se separa inmediatamente y se conserva congelado hasta el momento del radioinmunoensayo. Inmediatamente antes de comenzar el radioinmunoensayo, se agrega a cada tubo una de las muestras de plasma, 10 μ l de la solución de 8-hidroxiquinolina (solución N° 3) y 0,2 ml dimercaprol. El EDTA, dimercaprol y la 8-hidroxiquinolina se utilizan para inhibir las angiotensinas (14) (15). Para el radioinmunoensayo se utilizan de 0,2 a 0,5 ml de plasma. Cada muestra de plasma se diluye a 3 concentraciones distintas con la solución N° 6. Las muestras se incuban a 37 °C durante 3 h y después se realiza el radioinmunoensayo.

RESULTADOS OBTENIDOS VARIANDO EL TIEMPO DE INCUBACIÓN

Se tomó un pool de sangre de los sujetos normales (posición de pie, dieta libre). La sangre se sacó en tubos que contienen EDTA como fue descrito más arriba y al plasma se le agregó la solución de 8-hidroxiquinolina y dimercaprol. Los plasmas fueron incubados a 37 °C de 0 a 24 h. La figura 1 muestra los resultados. Al aumentar el tiempo de incubación se produjo un aumento de la generación de AT I (fig. 2). Para el radioinmunoensayo, se utilizó un tiempo de incubación de 3 h.

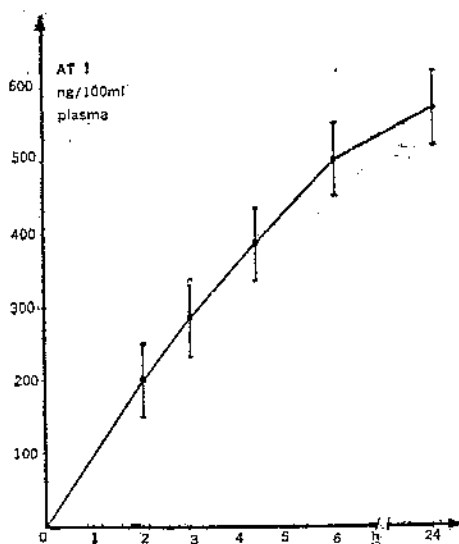


FIG. 2. Generación de Angiotensina I variando el tiempo de incubación.

PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR (figura 3)

1. Se enumeran los tubos del Nº 1 al Nº 18 y se mantienen refrigerados en hielo.

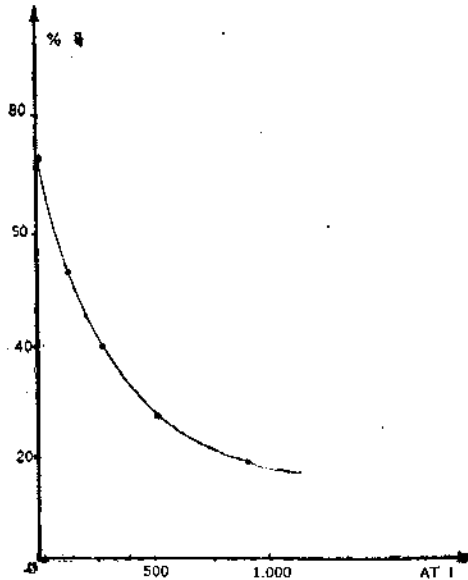


FIG. 3. Angiotensina I. Curva de referencia anti-sueros: 1/16.000 DIL.

2. En cada tubo se pipetea 0,9 ml de la solución reguladora tris.
3. Se agrega la AT I estándar en distintas concentraciones.
4. La AT I ^{125}I se diluye con solución reguladora de tris-acetato con lisozima (solución 6) para obtener alrededor de 10.000 ó 15.000 cpm por 50 μl de solución. En los tubos numerados del Nº 1 al Nº 16 se agrega 50 μl de solución de AT I ^{125}I . Para certificar el método se agrega 100 μl de AT I ^{125}I en el tubo Nº 17 y 150 μl de AT I ^{125}I en el tubo Nº 18.
5. Se agregan 50 μl del antisuero a AT I en la dilución seleccionada en los tubos numerados del Nº 3 al Nº 18. Los tubos Nº 1 y Nº 2 sirven de control.
6. Se mezcla cada tubo en el mezclador.
7. Se incuban los tubos durante 72 h a 4 °C.
8. Se agrega a cada tubo 1 ml de la solución de trabajo de carbón dextrán (solución Nº 2).
9. Se centrifugan los tubos a 5.000 r.p.m., a 4 °C, durante 20 min.
10. Se decanta el sobrenadante en tubos numerados.
11. Se cuentan los tubos en secuencia (sobrenadante del tubo Nº 1, seguido del precipitado tubo Nº 1, etc.) en un contador de pozo.

CALCULOS

La curva se realiza calculando % B donde B es la AT unida al anti-cuerpo (sobrenadante).

La concentración de AT I de las muestras se detiene interpolando en

la curva estándar y los resultados se expresan en mg de AT I/100 ml de plasma.

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEPARACIÓN CON SEPHADEX G 25 DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE LA AT I

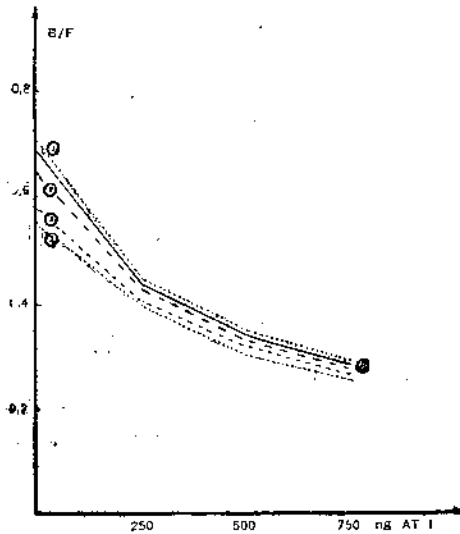


FIG. 4. Angiotensina I. Microcurvas de referencia usando distintas fracciones de AT I ¹²⁵I. Anti-suero: 1/16.000 DIL.

El control de inmunorreactividad con las fracciones I, II, III y IV, obtenidas separando con Sephadex, se llevó a cabo mediante incubación de las mismas interpoladas en microcurvas estándar. Como muestra la figura 4, la relación B/T no varió significativamente cuando se trabaja entre 0 y 850 mg de AT I.

REPRODUCTIBILIDAD

Se agregaron 500 a 1.000 ng de AT I a muestras de 10 ml de pool de plasma. La recuperación varió entre 85 a 90 % de la AT I agregada al pool de plasma.

ESTUDIOS CLÍNICOS

La renina es una sustancia proteica de origen renal. Se considera a la renina como la hormona renal, debido a que se la encuentra en la sangre circulante y que su concentración se modifica en diversas situaciones fisiológicas y patológicas (18). La renina es una hormona que posee algunas características particulares. A diferencia de otras hormonas, no ejerce su acción directamente sobre las células reactivas, sino que lo hace a través de su acción enzimática (18).

La renina es en realidad una enzima que actúa sobre un sustrato plasmático (α -2 globulina), el hipertensinógeno genera un decapeptido, que es biológicamente inactivo, la angiotensina I (AT I), que por la acción de otra enzima, la enzima de conversión, forma la angiotensina II, un octapeptido que tiene actividad biológica. La AT II se destruye rápidamente por acción de las angiotensinas plasmáticas y de los tejidos.

La actividad plasmática de la renina (APR) se mide por la cantidad de AT I generada por una cantidad de plasma a 37 °C en condiciones que impiden su transformación a AT II y la acción de las angiotensinasas (BAL, EDTA y 8-hidroxiquinolina) (18). La renina es parte de un sistema homeostático, el que regula el volumen del líquido extracelular, a través de la secreción de aldosterona y de la retención de sodio y agua. Por ello, su concentración en el plasma, aún en condiciones fisiológicas, está sujeto a grandes variaciones vinculadas con las necesidades del organismo. Las condiciones en las cuales se determinan los niveles de la APR deben ser establecidas y determinadas, ya que los factores que modifican la secreción de renina son múltiples: las variaciones de la perfusión arterial renal, las variaciones de la actividad del sistema simpático y el aporte de sodio y potasio a la mácula densa (18) (19).

Se reconoce actualmente que el cambio de posición corporal, de la supina a la posición de pie, está asociada a una disminución en la perfusión arterial renal y a un aumento del tono simpático. Estas modificaciones producen un aumento de la APR en los sujetos normales (fig. 5). El aporte de sodio juega también un papel importante en la regulación de los niveles de APR (19). La disminución de la cantidad de sodio en la dieta aumenta los niveles de APR (fig. 6). En forma similar, la administración de un diurético, la fursenida (40 mg, eV; Hoechst Pharmaceutical Co) aumenta rápidamente los niveles de la APR (fig. 7) debido a su acción natriurética y a la disminución del volumen del líquido extracelular.

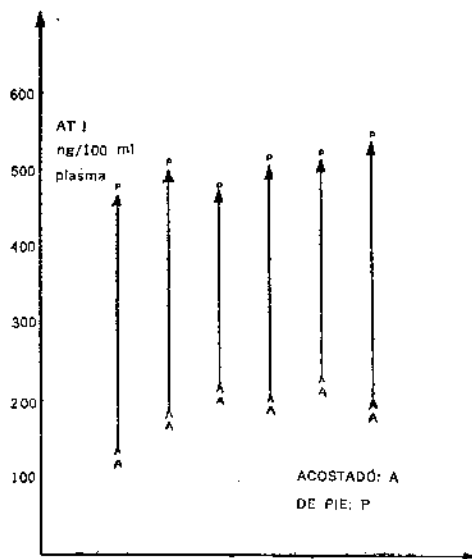


FIG. 5. Actividad plasmática de la renina en distintas posiciones corporales.

Se ha sugerido que en el hipertiroidismo existe una actividad de sistema simpático y se reconoce actualmente que el sistema simpático estimula la APR. La figura 8 muestra que en el hipertiroidismo los niveles de APR están elevados y que en el hipotiroidismo están más bajos que los observados en los sujetos normales (21). El tratamiento exitoso de ambas situaciones está asociado a niveles normales de APR (21). La figura 9 muestra los niveles de PBI y de la APR en 3 pacientes con

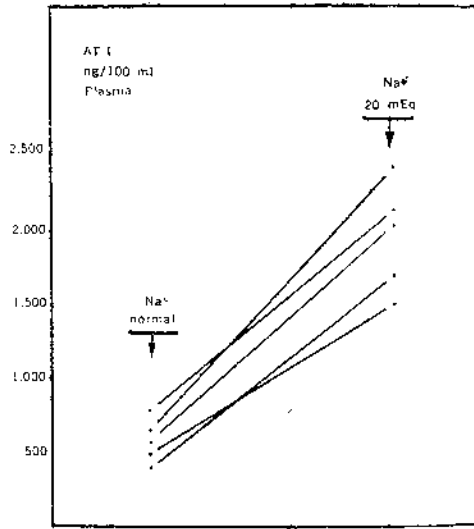


FIG. 6. Actividad plasmática de la renina. Efecto de la dieta hiposódica.

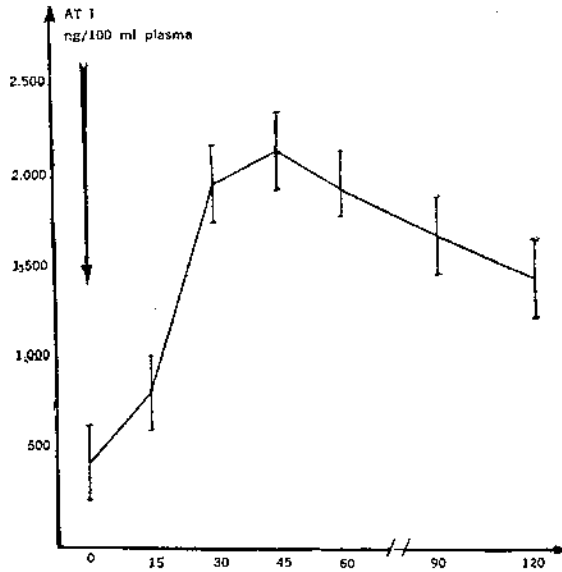


FIG. 7. Niveles de la APR por administración de un diurético.

hipertiroidismo. En estos pacientes el tratamiento con ^{131}I produjo un estado transitorio de eutiroidismo con niveles normales de PBI y APR. Cuando el estado de hipotiroidismo se corrigió con terapia sustitutiva, los niveles de APR y de PBI se normalizaron.

Se estudiaron además (fig. 10) los niveles de la APR en 4 pacientes con cirrosis hepática, con edema; 3 pacientes con hipertensión renovascular; 7 pacientes con acromegalia activa; 5 pacientes con acromegalia inactiva; 3 pacientes con enfermedad de Cushing; 4 pacientes con hiper-

tensión y 3 pacientes en el tercer trimestre de embarazos normales (fig. 10). Puede verse que en los pacientes con hipertensión renovascular y en la cirrosis hepática con edema (aldosteronismo secundario) y en el embarazo (aldosteronismo secundario fisiológico) la APR está aumentada, mientras los niveles de APR observados en la acromegalia activa e inactiva (22) en la enfermedad de Cushing y en la hipertensión esencial son similares los valores de APR observados en los sujetos normales.

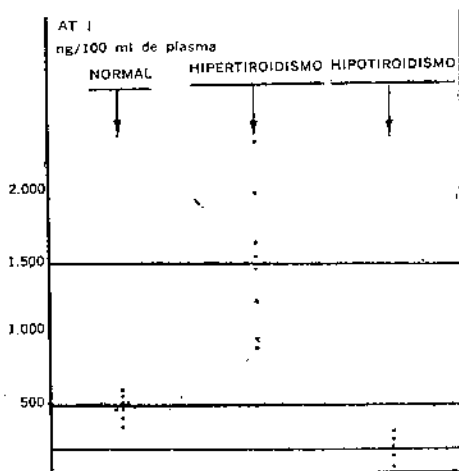


FIG. 8. Actividad plasmática de la renina en el hiper-eu-hipotiroidismo.

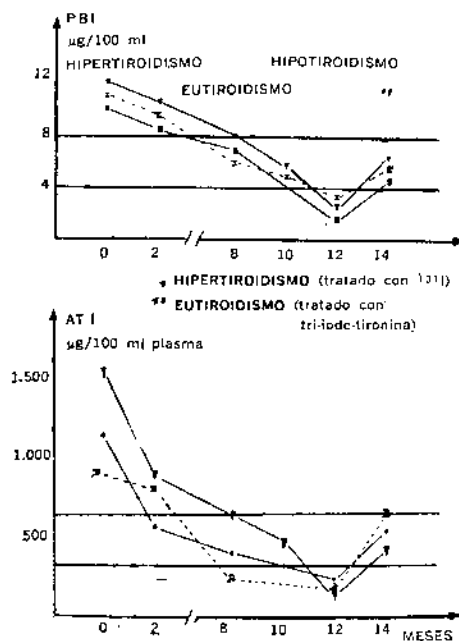


FIG. 9. Efecto del tratamiento hipertiroidismo en los niveles de la actividad plasmática de la renina y en el PBI.

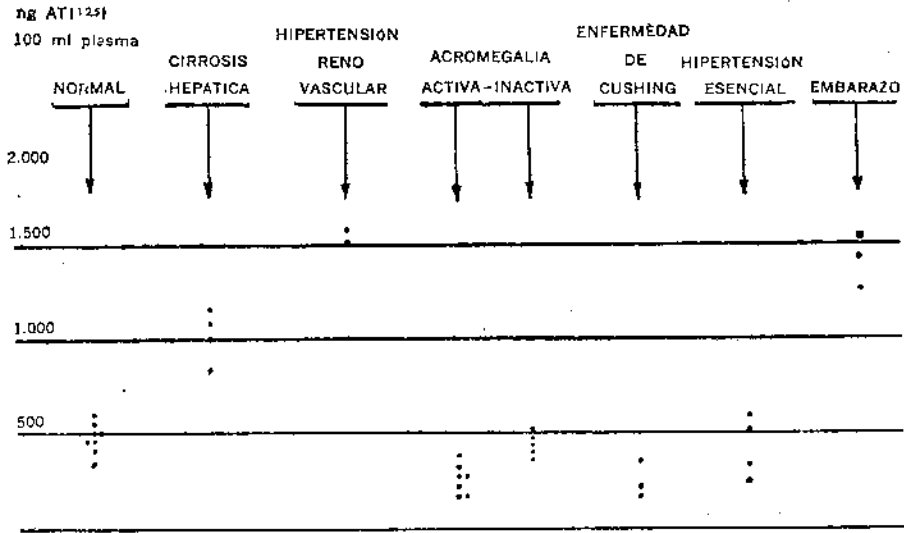


Fig. 10. Niveles de la actividad plasmática de la renina en distintas situaciones clínicas.

La figura 11 muestra la APR en pacientes con enfermedades de Addison antes y después del tratamiento con glucocorticoides. Puede observarse que los niveles basales de APR en los pacientes con enfermedad de Addison son significativamente más altos que en los sujetos normales ($p: 0,001$) y que el tratamiento sustitutivo con hidrocortisona produjo un descenso marcado de los mismos (23).

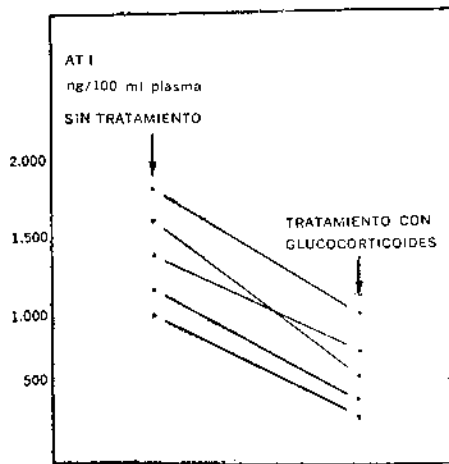


Fig. 11. Actividad plasmática de la renina. Efecto del tratamiento en la enfermedad de Addison.

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL RADIOINMUNOENSAYO Y BIOENSAYO

Se compararon los resultados del radioinmunoensayo con los resultados obtenidos, midiendo los niveles de angiotensina II (AT II) por el bioensayo utilizando ratas anestesiadas tratadas con pentolinium (21).

El bioensayo mide la respuesta precisa obtenida por la inyección de las muestras. Las muestras a probar y los estándares de AT II (5-valil-angiotensina amida, Ciba) se administraron por vía endovenosa. La respuesta presora se midió para 2 dosis diferentes de cada muestra por duplicado y cada resultado es el promedio de 4 ensayos. La recuperación de la angiotensina II agregada a las muestras fue de 90-100 %, lo que indica la ausencia de angitensinasa en los extratos.

La tabla II muestra los resultados de los niveles de AT I y AT II, medidos por el radioinmunoensayo y bioensayo respectivamente. La actividad de renina medida por radioinmunoensayo como AT I fue $17,8 \pm 2,0$ ng AT I/ml y medida por bioensayo $15,5 \pm 1,8$ ng AT II/ml p.N.S.

Esta experiencia demuestra que existe una excelente correlación entre los métodos inmunológicos y biológicos y que los resultados pueden ser comparados. Kotchen y col (25) demostraron que existe una buena correlación entre los métodos de radioinmunoensayo de Haber y col. (17) y el bioensayo de Skinner (26). Otros investigadores como Hass y Goldlatt (27) y Boyd y col. (28) demostraron que el método de bioensayo da valores más altos que el método de radioinmunoensayo, mientras que Secley y col. (29), Cohen y col. (30) y Ménard y Catt (31) demostraron que los valores de actividad de la renina, medidos por el bioensayo, son más bajos que los medidos por el radioinmunoensayo. Nuestros resultados son algo más altos utilizando el radioinmunoensayo que el bioensayo, lo que demuestra que los resultados pueden ser comparables.

TABLA II

<i>Comparación de los valores de la actividad de renina medida por bioensayo y radioinmunoensayo</i>		
Nº	<i>Radioinmunoensayo ng AT I/ml</i>	<i>Bioensayo ng AT I/ml</i>
1	12,0	7,4
2	15,0	11,8
3	12,0	11,4
4	18,0	11,6
5	30,0	22,7
6	22,0	24,4
7	24,0	19,0
8	6,0	6,8
9	21,0	19,0
10	18,0	19,7
11	18,0	15,6
Media + B. S.	$17,8 \pm 2,0$	$15,5 \pm 1,8$

Conclusiones

Se marcó la Angiotensina I con ^{125}I Na, utilizando el método de Hunter y Greenwood (11). Además se pasó la ^{125}I AT I por una columna de filtración en gel. Los resultados obtenidos, utilizando distintas fracciones de ^{125}I AT I permiten afirmar que el pasaje de la AT I, marcada por una columna de filtración en gel, no es necesario, ya que los resultados de la curva estándar fueron similares a los obtenidos con la resina de intercambio iónico.

Se describió el método de dosaje radioinmunológico y su aplicación en distintas situaciones fisiológicas y patológicas. El método de radioinmunoensayo presenta sensibilidad adecuada para detectar concentraciones bajas de AT I en plasma. Valores similares de AT I en plasma de sujetos normales han sido descritos por Boyd y col. (16) y por Haber y col. (17).

BIBLIOGRAFÍA

1. YALLOW, R. S. y BERSON, S. A., *Nature*, **184**, 1.648, 1959.
2. SCHALCH, D. S. y PARKER, M. L., *Nature*, **203**, 1.141, 1969.
3. FELBER, J. P., *Experientia*, **19**, 227, 1963.
4. ALBANI, H.; CRESPO, J. C.; NÚÑEZ, G. N. de y MITTA, A. E. A., Presentado al II Congreso de ALASBIMN, México, 1970.
5. CRESTO, J. C.; ALBANI, H.; DEGROSSI, J. O. y MITTA, A. E. A., Premio E. J. Varela de la Soc. Arg. de Biol. y Med. Nucl., 1972.
6. BARMACH, M. F. de; NÚÑEZ, G. N. de; ALTSCHULER, N. y MITTA, A. E. A., *Informe N° 346*, CNEA, 1973.
7. TEMPONE, A.; QUIHILLALT, L. E.; ARRIGHI, L. y MITTA, A. E. A., *Informe N° 317*, CNEA, 1972.
8. DUJOVNE, L. I.; ALBANI, H.; NÚÑEZ, G. N. de; DEGROSSI, J. O. y MITTA, A. E. A., a publicar, 1972.
9. ARATA, R. O.; NÚÑEZ, G. N. de; MAUTALEN, C. A. y MITTA, A. E. A., *Informe N° 332*, CNEA, 1973.
10. BRUNO, O.; QUIHILLALT, L. E. y MITTA, A. E. A., Presentado al IV Congreso Argentino y Ira. Jornada Regional de ALASBIMN, Tucumán, 1973.
11. HUNTER, W. M. y GREENWOOD, F. C., *Nature*, **194**, 495, 1962.
12. GANDOLFI, C.; MALVANO, R. y ROSA, U., *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 254, 1971.
13. BOYD, G. W. y PEART, W. S., *Lancet*, **2**, 129, 1968.
14. BOYD, G. W.; LANDON, J. y LANCET, W. S., **2**, 1.002, 1967.
15. RYAN, J. W.; MCKENZIE, J. K. y LEE, M. R., *Biochem.*, **G 108**, 870, 1968.
16. BOYD, G. W.; ADAMSON, A. R.; FITZ, A. E. y PEART, W. S., *Lancet*, **1**, 213, 1969.
17. HABER, E.; KOERNER, T.; PAGE, L. B.; KLIMAN, B. y PURNODE, A., *J. Chem. End.*, **29**, 1.349, 1969.
18. FASCILOLO, J. C., en "La Secreción de Renina", Conferencias E. Braun Menéndez, Buenos Aires, 1965.
19. PAGE, I. H. y McCUBBIN, J. W., en *Renal Hypertension*, Year Book Medical Publishers Inc., Chicago, 1968.
20. WINER, N.; CHOKSHI, S. D.; YOON, M. S. y FREEDMAN, A. D., *J. Clin. End.*, **29**, 1.168, 1964.
21. HAUGER-KLEVENE, J. H.; BROWN, H. y ZAVALETA, J., *J. Clin. End.*, **34**, 625, 1972.
22. HAUGER-KLEVENE, J. H.; BARATONI de G. MOYANO, M. y NABLA, G., *Clin. Res.*, **20**, 865, 1972.
23. NABLA, G.; HAUGER-KLEVENE, J. H. y SOTO, R. J., *Clin. Res.*, **20**, 893, 1972.
24. DE VITO, E. y GASCILOLO, J. C., *Acta Physiol. Lat. Amer.*, **15**, 129, 1965.
25. KOTCHEM, T. A.; FLAMENBAUN, W.; CIRKSENA, W. y GAMBLE, W., *J. Clin. End. Metab.*, **36**, 804, 1973.
26. SKINNER, S. L., *Circ. Res.*, **20**, 391, 1967.
27. HASS, E. y GOLDBLATT, H., *Lancet*, **1**, 1.330, 1972.
28. BOYD, G. W.; ADAMSON, A. R.; FITZ, Q. y PEART, W. S., *Lancet*, **1**, 213, 1969.
29. SEALEY, J. E.; GERTEN BARRES, J. y LAVAGH, J. H., *Kidney International*, **1**, 240, 1972.
30. COHEN, E. L.; GREEM, C. E.; CONN, J. W.; BLAUGH, W. M.; GUYER, L. B.; KEM, D. C. y LUCAS, C. P., *J. Lab. Clin. Med.*, **77**, 1.025, 1971.
31. MENARD, J. y CATT, J. K., *End.*, **90**, 422, 1972.