

R. 17.670
0

T.D.
T/24

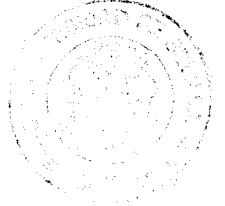


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
el tomo 228 número 20 del libro
correspondiente. 30 JUN 1990
Sevilla.



El día 30 de Junio de 1990

Alena Raffitte

**FACTOR ATRIAL NATRIURETICO EN LA INSUFICIENCIA
RENAL TERMINAL**

Tesis Doctoral presentada por:
D. Juan Manuel Triguero de la Torre
Sevilla, 1990

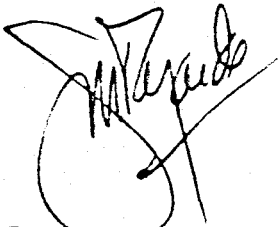
A mis padres

DON JOSE FAJARDO GALVEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO
DE MEDICINA INTERNA,

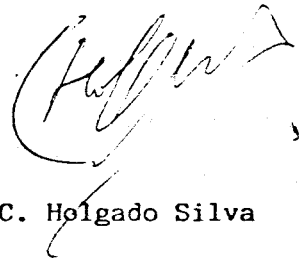
CERTIFICA:

Que, Don Juan Manuel Triguero de la Torre, Licenciado en Me-
dicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección y como coo-
director Don Carlos Holgado Silva, el trabajo titulado: ---
"FACTOR AURICULAR NATRIURETICO EN LA INSUFICIENCIA RENAL --
TERMINAL", con el que aspira al grado de Doctor.

Sevilla a uno de Noviembre de mil novecientos noventa.



Fdo.: Prof. J. Fajardo Galvez



Fdo.: C. Holgado Silva

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento al Director y Codirector de la Tesis Doctoral por sus sabias directrices

Profesor D. José Fajardo Gálvez

Profesor D. Carlos Holgado Silva

Así mismo, agradecemos a las personas (médicos, ATS, diplomados en enfermería y personal auxiliar y administrativo) de los distintos Servicios y Unidades que han colaborado de forma decisiva en la puesta a punto de las Técnicas de determinación del Factor Atrial Natriurético, y el estudio de la población facilitada.

Servicio de Medicina Interna

Servicio de Nefrología

Secciones de Cromatografía y Electroforesis del Departamento de Bioquímica

Laboratorio de R.I.A. del Servicio de Medicina Nuclear

Y al Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la Facultad de Matemáticas, con quien realizamos los cálculos estadísticos bajo la dirección del Profesor Moreno Rebollo.

FACTOR ATRIAL NATRIURETICO

EN LA

INSUFICIENCIA RENAL TERMINAL

INDICE

1. INTRODUCCION	6
1.1. MECANISMOS REGULADORES DE LA PRESION ARTERIAL	7
1.2. FACTOR ATRIAL NATRIURETICO	20
1.3. FACTOR ATRIAL NATRIURETICO "EXTRAAURICULAR"	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
3. MATERIAL Y METODO	37
3.1. GRUPOS DE TRABAJO	38
3.2. MATERIAL EMPLEADO	42
3.2.1. Jeringas	42
3.2.2. Tubos de ensayo	42
3.2.3. Productos químicos	42
3.2.4. Columnas de purificación de las muestras ...	43
3.2.5. Sistemas de radioinmunoanálisis	43
3.2.6. Parrilla móvil	43
3.2.7. Evaporador múltiple	44
3.2.8. Congeladores	44
3.2.9. Centrifugadora	44
3.2.10. Vortex	44
3.2.11. Separador magnético	45
3.2.12. Contador del radioinmunoanálisis	45
3.3. VARIABLES ESTUDIADAS	46
3.3.1. Situación clínica	46

3.3.2. Situación hemodinamica	46
3.4. METODOS EMPLEADOS	47
3.4.1. Método 1	47
3.4.1.1. Recogida de las muestras	47
3.4.1.2. Purificación de las muestras	47
3.4.1.3. Procedimiento de radioinmunoanálisis	48
3.4.2. Método 2	52
3.4.2.1. Recogida de las muestras	52
3.4.2.2. Purificación de las muestras	52
3.4.2.3. Procedimiento de radioinmunoanálisis	53
3.4.3. Método 3	55
3.4.3.1. Recogida de las muestras	55
3.4.3.2. Purificación de las muestras	55
3.4.3.3. Procedimiento de radioinmunoanálisis	55
3.5. CONTROLES DE SEGURIDAD	56
3.5.1. Porcentaje de recuperación de la columna	56
3.5.2. Correlación lineal del Standard RIA	57
3.5.3. Estandar Interno	57
3.5.4. Valores finales de las muestras	58
3.6. ENSAYOS	59
3.6.1. Ensayo 1	59
3.6.2. Ensayo 2	60
3.6.3. Ensayo 3	60
3.6.4. Ensayo 4	60
3.6.5. Ensayo 5	61
3.7. CALCULO ESTADISTICO	62

4. RESULTADOS	63
4.1. RESULTADOS NUMERICOS	64
4.2. CONTROLES DE SEGURIDAD	93
4.3. RESULTADOS GRAFICOS	95
5. DISCUSION	122
6. CONCLUSIONES	138
7. RESUMEN	142
8. BIBLIOGRAFIA	145

1. INTRODUCCION

1.1. MECANISMOS REGULADORES DE LA PRESION ARTERIAL

A medida que profundizamos en las investigaciones sobre los factores y mecanismos fisiopatológicos implicados en la regulación de la presión arterial, más se amplía el campo de estudio.

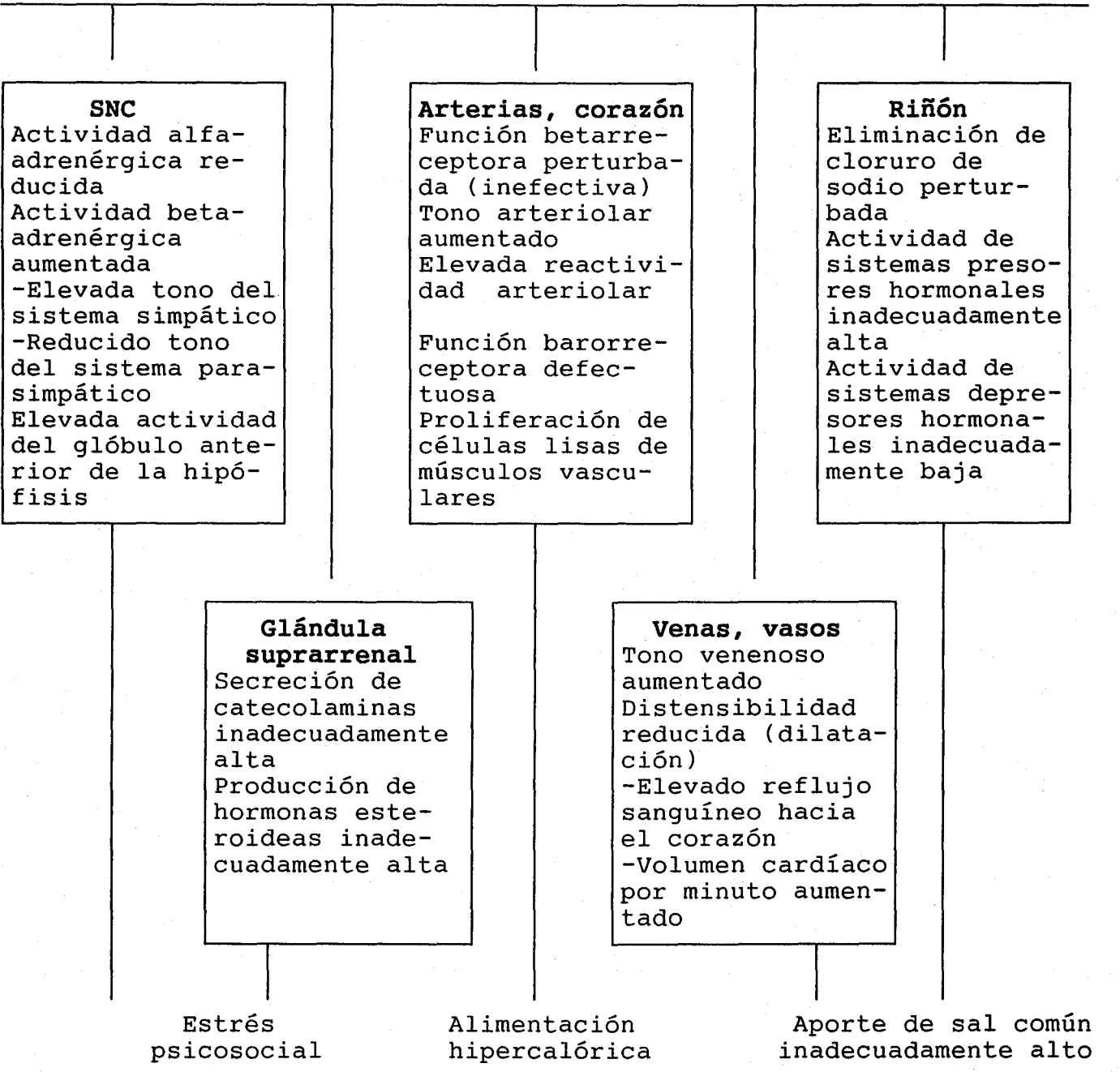
Diversas áreas de investigación, como la epidemiología, clínica y los métodos experimentales han aportado un gran avance en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos que regulan la tensión arterial, así como la fisiopatología y patogenia de la hipertensión arterial esencial.

El desarrollo de técnicas como el radioinmunoensayo, la fotometría iónselectiva, las técnicas inmunohistoquímicas o de recombinación genética, nos han permitido conocer mejor los mecanismos implicados en la génesis de la hipertensión arterial.

La importancia de los factores genéticos viene apoyada por el descubrimiento de cifras tensionales más elevadas en hijos de hipertensos, y en la predisposición de tipo poligénica ampliamente aceptada (1, 2). Asimismo, encontramos una alta correlación de hipertensión arterial tanto en hijos de hipertensos, como entre gemelos (3). Diversos trabajos apuntan hacia la importancia de la herencia en el manejo renal del sodio (4). Ha sido puesto de manifiesto la importancia del HLA-B12 como predictor de la gravedad en la hipertensión arterial (5).

INTERACCION DE LOS MECANISMOS HIPERTENSIVOS

Factores genéticos



Factores ambientales

El **stress psicosocial**, sabemos que provoca hipertensión arterial, quedando demostrado que el **dolor** y la **emoción** son estimuladores de la secreción de ADH (6, 7, 8) y otras hormonas.

Desde hace años, sabemos que el uso de **anticonceptivos orales** eleva las cifras de tensión arterial (9).

La importancia de la **dieta** viene reflejada por el hecho de que las dietas hipercalórica aumentan las cifras de tensión arterial (10), quedando demostrado que a menor ingesta calórica y menos peso corporal, en sujetos hipertensos, las cifras tensionales son menores (11).

El **tabaco** es uno de los factores de riesgo en la hipertensión arterial, según fue puesto de manifiesto en el estudio Framingham. Respecto del **alcohol**, está demostrada la relación directa entre las cifras de tensión arterial y los gramos de alcohol ingeridos en bebedores de más de 80 gramos al día (12).

El **calcio** y el **magnesio** parece que mejoran la bomba Na/K-ATPasa, no quedando aún demostrado el beneficio de la ingesta extra de calcio en la hipertensión arterial (13)

Sobre la ingesta de **sodio**, aunque está ampliamente aceptada su relación directa con el aumento en las cifras de tensión arterial, siguen existiendo controversias, no quedando aún clarificados los mecanismos íntimos que expliquen la influencia del sodio sobre la tensión arterial, permaneciendo la duda sobre si una mayor ingesta de sodio provoca elevaciones en las cifras de tensión arterial (3, 14 y 15).

El **cadmio**, **plomo**, **zinc**, **litio** y otros agentes pesados siguen siendo estudiados para delimitar su papel en la producción y mantenimiento de la hipertensión arterial esencial (16).

En cuanto al **potasio**, queda demostrada su acción sobre el volumen, secreción de ADH, respuesta vascular a los agentes presores, producción de prostaglandinas y acción natriurética, así como la inhibición en la producción de aldosterona (17, 18).

La regulación del **flujo de iones** a nivel celular va teniendo un interés creciente en los últimos años, ante la posibilidad de poder explicar algunos aspectos de la hipertensión arterial esencial como consecuencia de alteraciones en la homeostasis intracelular de algunos iones, especialmente el sodio y el calcio, y siendo regulados por los sistemas de cotransporte Na/K/CL, Na-Na, sistemas Na/H⁺, cotransporte Na-Ca, etc, (19, 20).

Respecto al Factor Atrial Natriurético, no ha quedado aún demostrado su participación en la bomba Na/K-ATPasa (21), habiendo sido definido un factor ouabaina-like que inhibe la ATPasa que jugaría un papel en el manejo del sodio por el riñón, vasos sanguíneos y tejidos (22). Sigue siendo buscada una hormona natriurética, quizás sintetizada y liberada en el cerebro, que inhibe el transporte transepitelial de Na por su efecto inhibitor de la bomba Na/K ATPasa (19, 23).

El volumen sanguíneo, se ve influido por la edad, el sexo, excreción circadiana de sodio y el manejo de agua, y sal por riñón, el funcionamiento del ventrículo izquierdo, la capacitancia vascular, el sistema nervioso y las prostaglandinas (24).

Los factores reguladores del volumen, serían: la aldosterona, el sistema ADH, el Factor Atrial Natriurético y la secreción del ACTH, entre otros (5, 19, 21).

La autorregulación de la volemia se efectúa por los mecanismos metabólicos dependientes de la hipoxia y acidosis, viscosidad sanguínea, presión transmural y cambios en la presión perivascular. (5, 25).

Los cambios adaptativos en la estructura cardiovascular son de gran importancia por sus consecuencias hemodinámicas.

Las variables de grosor de la pared y radio interno de los ventrículos y vasos sanguíneos modifican los flujos periféricos de presión y capacitación.

La relación radio interno/grosor de la pared, suele permanecer convenientemente equilibrada para la presión que sostiene en cada momento (26).

El estudio del papel del **cerebro** en la regulación de la presión arterial está comenzando, siendo conocido que factores emocionales, de comportamiento, situaciones de stress, patrones de personalidad, frustración, etc. pueden producir cambios hemodinámicos a través de los sistemas neurales aferentes-eferentes e interconexiones centrales (27). Existen complejas conexiones entre los núcleos sensitivos y los motores.

Las estructuras que controlan tanto las respuestas integradas como los actos de comportamiento, deben estar informados en todo momento del estado circulatorio antes de enviar las señales que alteran las distintas variables, para un ajuste cardiocirculatorio concreto, y muchas de las localizaciones del sistema nervioso incluidas en los circuitos neuronales, tienen interconexiones recíprocas, pudiendo alterar la información procedente del sistema cardiovascular, encontrando una gran variedad de transmisiones químicas que participan en los envíos de información dentro del sistema nervioso central.

En la transmisión del mensaje desde el cerebro a la periferia intervienen tanto los sistemas adrenérgicos como colinérgicos, siendo mediadas las respuestas por las aminos biogénicas.

Las localizaciones periféricas ha sido divididas claramente en pre y postsinapticas, y los receptores en alfa y beta.

Los neurotransmisores son: los clásicos (dopamina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina), y más de sesenta nuevos péptidos, entre los que destacan los proopiomelanocorticoïdes y sus derivados, ACTH, beta y gamma LPH, alfa-MSH, endorfinas, metencefalinas, dinorfinas, etc.

Su acción es de transmisión y modulación con efecto postsináptico, positivo y negativo sobre otros neurotransmisores.

Estos neurotransmisores son sintetizados como precursores de alto peso molecular inactivos y por clivaje enzimático, se activan actuando sobre diferentes receptores situado en riñón, sistema nervioso autónomo, síntesis hormonales, etc. Los receptores reciben las señales aferentes de riñón, barorreceptores, etc, modulando, transformando e integrando los diferentes impulsos en hipotálamo, sistema límbico y corteza cerebral para realizar el ajuste de gasto cardíaco, resistencias periféricas y presión arterial (28, 29).

Dentro de los sistemas de regulación central de la presión arterial, merece mención especial el **sistema renina-angiotensina cerebral**.

La angiotensina cerebral parece ser sintetizada localmente en el cerebro (28, 30). Sus características son diferentes de la renal, habiendo quedado demostrada su síntesis intracerebral con los métodos de traslación del RNA, e identificando la proteína sérica recién sintetizada como renina por el c-DNA.

La molécula precursora, es un péptido señal de 24 aminoácidos, seguido del angiotensinógeno "maduro". La angiotensina II en el cerebro

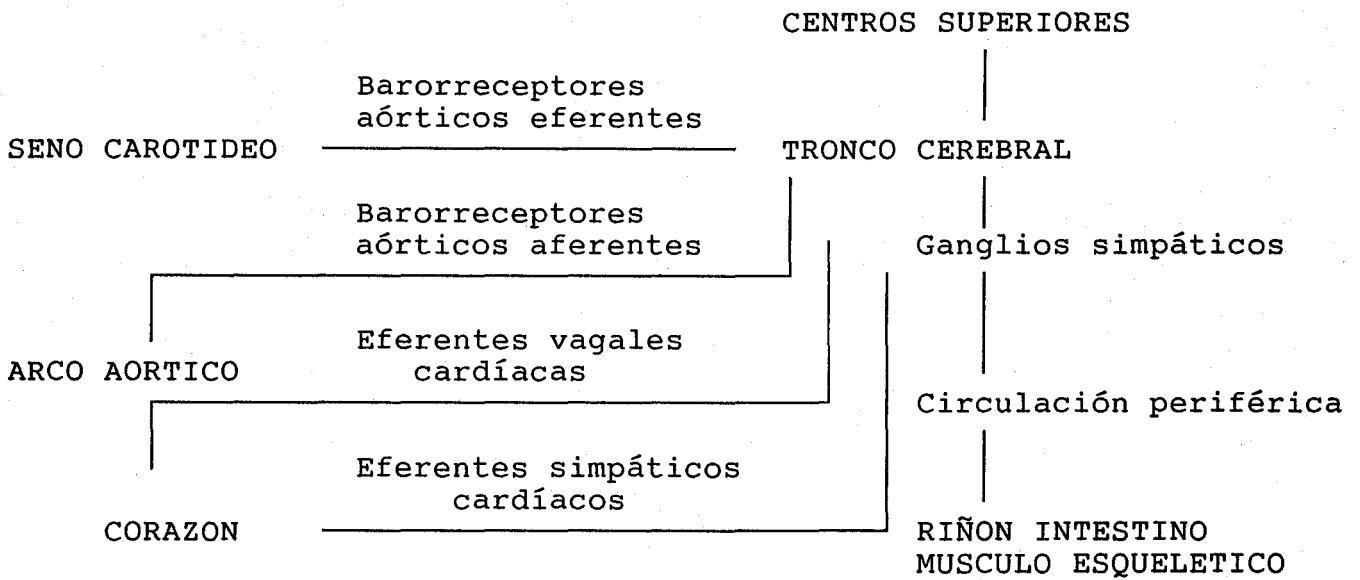
ha sido descrita en hipotálamo, hipófisis, sistema límbico, bulbo y médula, siendo su localización principal la hipófisis y el hipotálamo.

Hay tres áreas cerebrales, dentro de la barrera hematoencefálica, donde la angiotensina cerebral tendría acción local como son los núcleos paraventricular y supraóptico, y la corteza cerebral. El esquema de activación "en cascada" que se produce en una sola célula es similar al de los tejidos periféricos.

Las acciones cerebrales del sistema son el aumento del tono simpático, liberación de vasopresina y alteración en la respuesta del ADH, a los impulsos de los barorreceptores. (27, 29, 30, 31).

El **sistema nervioso autónomo** es fundamental en los mecanismos de adaptación rápida del sistema cardiovascular a los cambios posturales y en situaciones de stress.

La información es enviada desde los barorreceptores al glosofaríngeo y vago, y de aquí manda impulsos al corazón y los sistemas vasculares periféricos, o bien a zonas más superiores, pudiéndose decir que la información va de periferia a centros automáticos, y de aquí a periferia; o bien de centros automáticos a áreas complejas y de nuevo a centros automáticos.



La **vasopresina** es sintetizada en el hipotálamo y es regulada por una serie de factores entre los que destacan la osmolaridad plasmática, la depleción de volumen, la angiotensina, el dolor, estrés y la emoción, hipoxia e hipercarbia, catecolaminas, prostaglandinas, alcohol, etc.

Actúa sobre riñón fundamentalmente, haciendo los túbulos más permeables al agua y facilitando la reabsorción de ésta, y sobre los vasos sanguíneos provocando vasoconstricción.

Este sistema está interrelacionado con las catecolaminas y el sistema renina-angiotensina interviniendo también sobre la secreción de ACTH, el aprendizaje y la memoria (29).

Durante la última década se ha investigado ampliamente el aislamiento y caracterización de sustancias con capacidad para modificar la vascularización renal y la excreción de sal. Dentro de estas, las **prostaglandinas renales** han sido unas de las más estudiadas.

Es conocido que el riñón tiene capacidad para producir, a partir de fosfolípidos de la membrana celular, prostaglandinas D₂, E₂, F₂ alfa, prostaciclina, y tromboxanos.

Sus acciones principales son la vasodilatación, manejo renal de sodio, liberación de renina por riñón y modulación de la respuesta del ADH a la estimulación osmótica. Se sabe que este sistema está interrelacionado con el sistema renina-angiotensina y sistema kalicreina-kinina, estando involucrado en la génesis y mantenimiento de la hipertensión arterial. (4).

El sistema **kalicreina-kinina** está constituido por proteasas sericas que forman kininas a partir de proteínas precursoras (32).

Existen dos sistemas kaliceína-kinina, el primero es plasmático no interviniendo en la regulación de la tensión arterial y activándose durante el proceso de fibrinólisis, coagulación y activación del complemento, y el segundo o glandular, localizado en riñón, páncreas y glándulas salivares, estando ligado a otros sistemas vasoactivos renales, postulándose que modifica la excreción renal de sodio y las resistencias vasculares renales, aumentado el flujo plasmático renal, diuresis y natriuresis y estimulando la producción de prostaglandinas por el riñón (25, 33).

Sistema renina-angiotensina renal.

La renina es una endoproteasa altamente específica sintetizada fundamentalmente a partir de las células yuxtaglomerulares y de la arteriola aferente del glomérulo renal y descubierta en 1898 por Tigerstedt y Bergman a partir de extractos de corteza renal de conejo (34).

La renina no tiene efecto vasopresor directo, pero sí actúa sobre un sustrato presente en forma de agente vasoactivo.

El componente esencial de sustrato renina es un tetradecapéptido del que la renina fracciona un decapeptido o angiotensina I, que es activada por el enzima conversor para producir el principal componente activo del sistema: el octapéptido angiotensina II (35, 36) realizándose este proceso fundamentalmente en el tránsito a través de la circulación pulmonar en el hombre.

La vida media de la angiotensina II en la circulación es breve, siendo fragmentada rápidamente en péptidos más pequeños y eliminada por riñón.

El producto final, angiotensina II, va a tener una serie de acciones entre las que destacan: su efecto vascular directo, la estimulación de la secreción de aldosterona, la estimulación del sistema ADH, la distribución intra-extracelular de electrolitos, acciones sobre el sistema autónomo y modificaciones en los niveles de ACTH, prostaglandinas y catecolaminas.

El hecho de encontrar niveles de renina en diversos tejidos extrarrenales superiores a los plasmáticos y haber encontrado en cultivos celulares extrarrenales la existencia de un sistema renina-angiotensina intracelular complejo, nos lleva a que la angiotensina II no puede ser considerada como una hormona plasmática clásica, ya que también actúa como hormona tisular, neurohormona o neurotransmisor.

Las determinaciones de la actividad renina plasmática son hoy día insuficientes para valorar la actividad del sistema renal y extrarrenal, siendo de esperar que la angiotensina generada en los diversos tejidos, presente funciones más amplias que el mero control de la tensión arterial.

La **aldosterona** tiene regulada su secreción por diversos factores, entre los que destacamos, la angiotensina II, niveles plasmáticos de sodio, proopiomelanocorticoides, beta y gamma melano hormonas, serotonina, histamina, dopamina, inhibidores en la liberación de aldosterona, etc. siendo su acción fundamental la regulación del volumen de líquido corporal.



El lípido polar renomedular, que se localiza en la médula intersticial de riñón, es diferente a las prostaglandinas y actúa en la síntesis de sustancias lipídicas vasodilatadores.

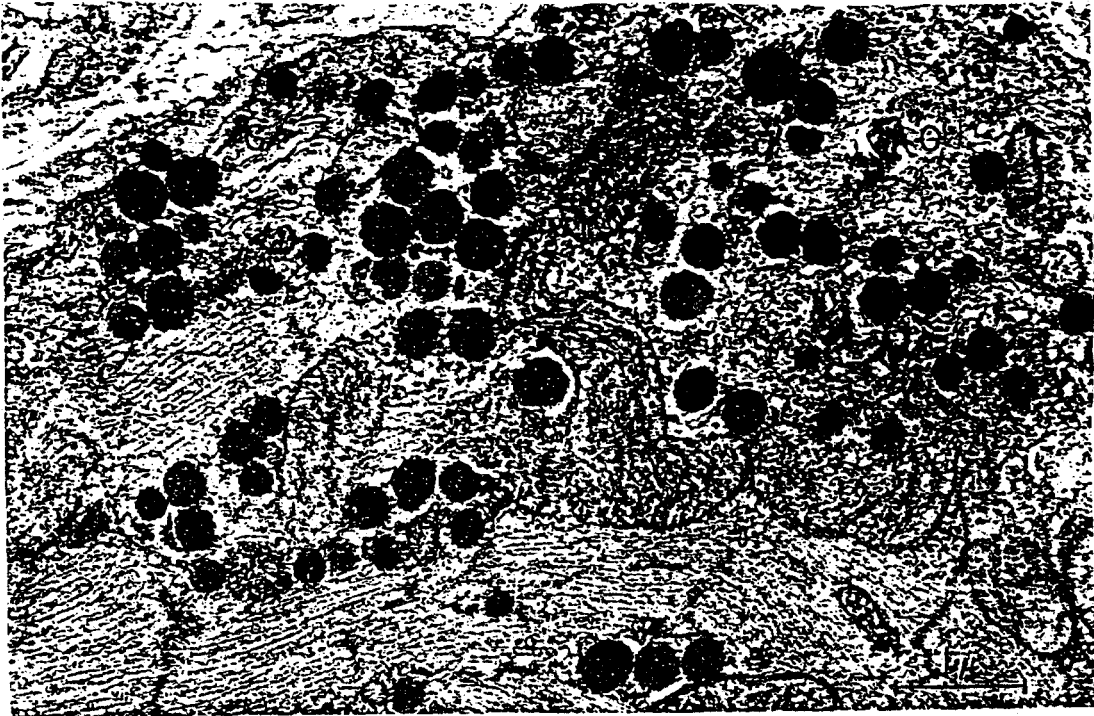
A nivel humano, no tenemos aún evidencia de que un fallo en la producción de esta hormona sea responsable de la génesis y mantenimiento de la hipertensión arterial (4, 25).

La presión sanguínea y el volumen están íntimamente ligados, así mismo, los factores involucrados en el control de la primera están implicados también, de algún modo, en la regulación del segundo. Uno de los factores, descubierto más recientemente, que juega un papel, posiblemente relevante en la regulación presión-volumen-capacitancia es el Factor Atrial Natriurético.

1.2. FACTOR ATRIAL NATRIURETICO

El 1935, Peters sugirió que el corazón era capaz en alguna manera de registrar el estado de expansión o depleción del volumen circulante, así como de modular de alguna forma su cantidad (37). Los trabajos de Gauer y Henry en 1956, y 1963, indicaron que la aurícula poseía una importante función detectora de las variaciones de volumen, y que la distensión de la aurícula llevaba a un importante aumento de la diuresis y natriuresis. (38, 39).

Ya que el sistema renina-angiotensina glomerular no podía explicar la relación entre volumen circulante, presión arterial y función renal, los fisiólogos renales postularon la existencia de un "tercer factor" u "hormona natriurética", no quedando suficientemente demostrada su identidad (40).



Accumulation of specific granules at the periphery of an atrial muscle fiber (rat). G, peripheral extension of Golgi complex. X 18,000.

Fueron los **estudios histológicos** de Jamieson y Palade, en 1964, los que pusieron de manifiesto la presencia de gránulos osmófilos, en los cardiocitos auriculares de mamíferos, a los que definieron como gránulos no lisosomales íntimamente asociados al aparato de Golgi y presentes sólo en la aurícula (41).

Posteriormente Huet y colaboradores, en 1974 establecieron su **carácter proteico**.

En 1976, Marie y colaboradores demostraron la relación entre el número de gránulos y la **ingesta hidrosalina** (42, 43).

De Bold y posteriormente Thibault, entre 1979 y 1983, mostraron la dependencia de el estado de granulación y el **volumen extracelular** (44, 45).

La **naturaleza endocrina** de esta proteína, localizada en la aurícula, fue puesta de manifiesto por De Bold en 1980, al demostrar que la inyección de preparados homogeneizados de tejido auricular de rata, en ratas normales, producía una rápida, potente y corta diuresis y natriuresis no provocada con tejido ventricular (46), quedando establecida una estrecha relación entre la actividad y la presencia de gránulos específicos (47, 48).

Grupos de trabajo en 1982, establecieron los **efectos vasodilatadores** del Factor Auricular, en experimentos animales sobre recto y aorta de pollo y conejo (49, 50).

En la denominación de la proteína han sido barajados los siguientes términos: Péptido o Factor Natriurético Auricular, Auriculina y Auriculopectina. (51 y 52)

Podemos concluir que la aurícula de los mamíferos es el lugar de secreción de una hormona (**Factor Auricular Natriurético**) cuyos efectos vasodilatadores, diuréticos y natriuréticos la convierten en una importante reguladora de la presión arterial y del volumen de líquido extracelular.

Desde 1982 se ha aislado, purificado y sintetizado gran número de péptidos auriculares, habiendo sido las etapas iniciales de su **purificación**: la extracción a partir de homogeneizados auriculares ácidos, en presencia de inhibidores de proteasas, sobre un gel de octadecil sílice (53,54,55).

La separación de las distintas formas de alto y bajo peso molecular, realizadas con Sephadex G-50, G-75 y Bio-Gel P-10, permitió seguir avanzando con cromatografía de filtración molecular, siendo la separación en CM-Bio-Gel o Mono-S, lo que estableció el carácter básico del Factor Atrial Natriurético.

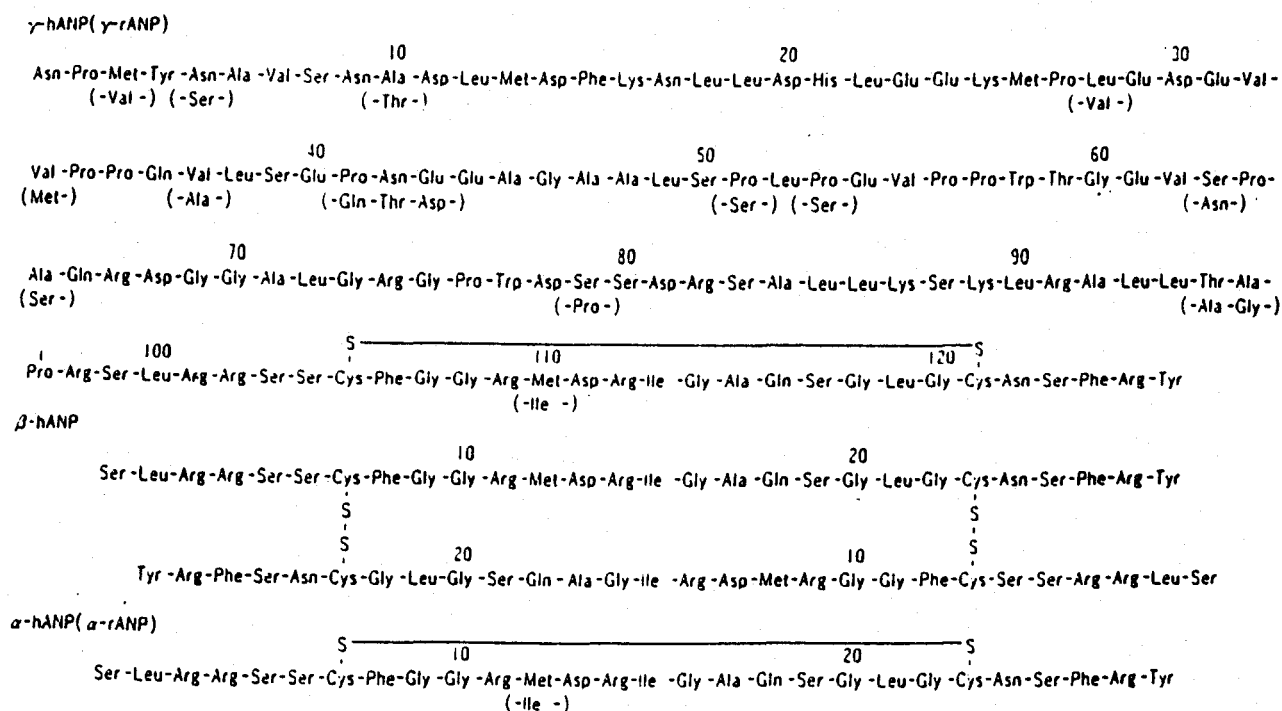
A estos péptidos con peso molecular entre 3000 y 4000 daltons se les ha ido designando como **Auriculina A y B, Atriopeptina I, II y III, Cardionatrina I, II, III y IV, y Factor Atrial Natriurético alfa, beta y gamma**, presentado todos actividad biológica (56, 57).

Los primeros péptidos secuenciados estaban constituidos por menos de 30 aminoácidos (58), siendo observados entre 1983 y 1984

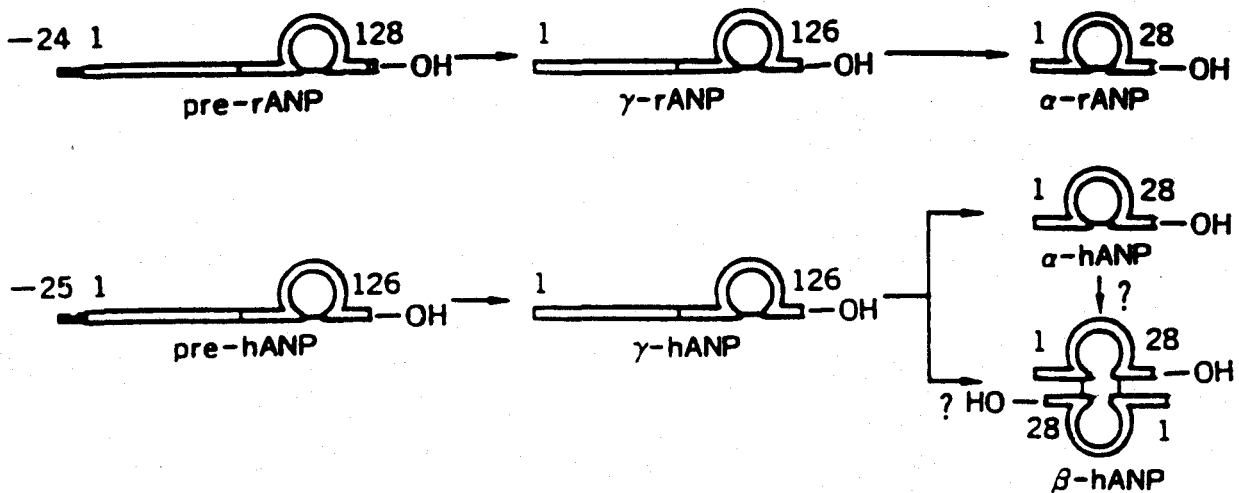
una gran variedad de péptidos entre 19 y 35 aminoácidos (52, 55, 59-62) quedando demostrada la longitud óptima para su acción biológica entre 24 y 28 aminoácidos (atriopeptina y ANF-humano-alfa) (50, 53), pareciendo ser fragmentos C-terminales del ANF-prohormona. Posteriormente fueron aisladas formas de más peso molecular, constituidas por un número de aminoácidos entre 63 y 123 (27, 63).

1		151
<hr/>		
125	τ -ANP	150
<hr/>		
	123 α -ANP	150
<hr/>		
	123 rat α -ANP	150
<hr/>		
	126	147
<hr/>		
	Atriopeptin I	
	126	149
<hr/>		
	Atriopeptin II	
	126	150
<hr/>		
	Atriopeptin III	
	124	150
<hr/>		
	rat ANF (8 - 33)	

Actualmente sabemos que el Factor Atrial Natriurético se sintetiza en forma de Pre-Pro-ANF, con características similares a otros precursores hormonales (64), estando el péptido precursor dividido en tres regiones: péptido señal o fragmento pre (en un extremo), porción Ct o fragmento activo (en el otro extremo) y un péptido de unión (64). El Factor Atrial Natriurético consta de un anillo de 17 aminoácidos delimitado por la existencia de un puente disulfuro intracatenario C y S = C y S en los aminoácidos 105 y 121 (65). La integridad del anillo de la estructura nativa del Factor Atrial Natriurético es esencial para su eficacia biológica (65, 67).



Complete amino acid sequences of α -, β - and γ -hANP. β -hANP is an anti-parallel dimer of α -hANP. () indicates amino acid replacement observed in α - and γ -rANP.



— signal peptide

Scheme for biosynthetic pathways of hANP and rANP

La biosíntesis del Factor Atrial Natriurético se produce en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi de los cardiocitos auriculares y es almacenado dentro de los gránulos específicos, siendo sintetizada como precursor de 151 aminoácidos en el hombre (54, 64), coincidiendo la eliminación del péptido señal con la forma Pro-ANF de 126 aminoácidos (68). La formación del ANF activo se produce por reacciones enzimáticas tanto en los miocardiocitos como en sangre circulante, donde al parecer las plaquetas están implicadas en el procesamiento del Pro-ANF (69), no quedando aún totalmente claro si la

prohormona es liberada a la circulación sanguínea para dar lugar a la forma activa o si el precursor es procesado en los miocitos auriculares.

El primer intento para cuantificar la hormona auricular fue el **bioensayo**, (49, 62, 68) resultando que no era suficientemente sensible como para medir los niveles circulantes de ANF en plasma.

Posteriormente, la puesta en marcha de un radioinmunoanálisis (**RIA**) permitió evaluar los niveles de ANF en plasma y tejidos (70), quedando identificada la forma circulante del Factor Atrial Natriurético humano como un péptido de 28 aminoácidos que es el fragmento c-terminal de la prohormona (71).

Estas técnicas, aplicadas sobre muestras de plasma, generaron una gran variabilidad de resultados atribuidos a diversas circunstancias como el método de procesamiento del plasma, influencias sobre la recuperación de la columnas, grado de inhibición de las muestras de plasma, etc. (72).

Actualmente, aunque el método de determinación es experimental, y cada laboratorio permite a los investigadores tener sus **valores de normalidad**, se admiten valores entre 2 y 50 fmol/ml dependiendo de los investigadores, modificándose en límites estrechos en condiciones fisiológicas normales (51, 73).

Tras la inyección de ANF marcado con I radiactivo a ratas, se ha observado una captación muy rápida del Factor Atrial Natriurético en la mayoría de los órganos, lo que sugiere una amplia distribución de los sistemas de unión (74).

La **vida media** del péptido auricular en ratas, oscila entre 16 y 27 segundos (75), no siendo modificada por la nefrectomía en ratas anestesiadas, pero sí en ratas conscientes. Estudios recientes sobre los receptores, apuntan la posibilidad de que sean los receptores específicos, por fenómenos de endocitosis, los causantes de la rápida desaparición del Factor Atrial Natriurético. Estos receptores se localizan no solo en riñón, sino en otros órganos (76). La formación de productos de degradación fue puesta de manifiesto por las experiencias en perros y humanos con una embolada de ANF en la arteria mesentérica perfundida. En humanos ha sido detectada una vida más elevada, entre 1 y 5 minutos (77, 78).

Cada día vamos descubriendo más **situaciones clínicas** que cursan con expansión de volumen y que se acompañan de un aumento del Factor Atrial Natriurético, entre los que destacamos: cirrosis hepática (79, 80) hipertensión hiponatrémica (86) y taquicardia paroxística (87). Donde disponemos de un mayor número de trabajos es en la insuficiencia cardiaca, encontrando elevados los niveles de Factor Atrial Natriurético, y estando relacionados con el grado de fracaso cardiaco (88, 89).

Podemos definir el Factor Atrial Natriurético como un **indicador de expansión de volumen**, siendo uno de los factores implicados en la **regulación del balance hidroelectrolítico** y de la **presión arterial**. Y basándonos en estudios realizados al descubrir el Factor Atrial Natriurético en el hipotálamo (89), podemos pensar en su misión de **neurorregulador** o **neuromodulador hipotálamo-hipofisario**.

El mecanismo molecular involucrado en la liberación del Factor Atrial Natriurético parece ser la activación del sistema fosfatidil-inositol, habiendo quedado completamente demostrado que la distensión auricular promueve su liberación (45).

La activación del sistema nervioso autónomo parece ser otro de los mecanismos implicados en la liberación del Factor Atrial Natriurético, aunque no tenemos aún evidencias sobre un mecanismo nervioso, que esté realmente implicado en su estimulación.

El mecanismo de acción del Factor Atrial Natriurético parece estar mediado por un aumento de la concentración intracelular de GMPc intracitoplasmático (90, 91), debido a la activación de la guanilatociclasa (67), provocando un descenso en la concentración del calcio citosólico libre mediado por activación de proteinquinasas dependientes del GMPc (92).

La acción molecular del Factor Atrial Natriurético comienza tras la unión de esta hormona con su receptor, en la célula diana de la membrana plasmática, siendo ésta: saturable, reversible y tiempo-dependiente (93, 94, 95).

Los lugares de unión específicos para el Factor Atrial Natriurético, localizados mediante estudios practicados con I radiactivo, se encuentran principalmente en los glomerulos de la corteza renal (93) y en las células del músculo liso de todo el árbol vascular (67, 95, 96), así como en otros lugares como cerebro, corazón, hígado, pulmones, intestino delgado y colon (74).

Sobre el riñón, el Factor Atrial Natriurético produce una **diuresis** rápida, potente y de corta duración, provocando un aumento tanto del filtrado glomerular como del flujo sanguíneo renal (97).

El **efecto natriurético** de esta hormona parece que no está basado en la inhibición de los principales sistemas de transporte activo (Na-K ATPasa) de los tubulos renales (98), igualmente juega un papel complementario al del sistema renina-angiotensina para contrarrestar los efectos de este sistema: vasodilatación, bloqueo de la secreción de aldosterona, inhibición de la secreción renal de renina y oposición a la acción retenedora de sodio de la aldosterona, no pareciendo que su acción esté mediada por las prostaglandinas (99, 100).

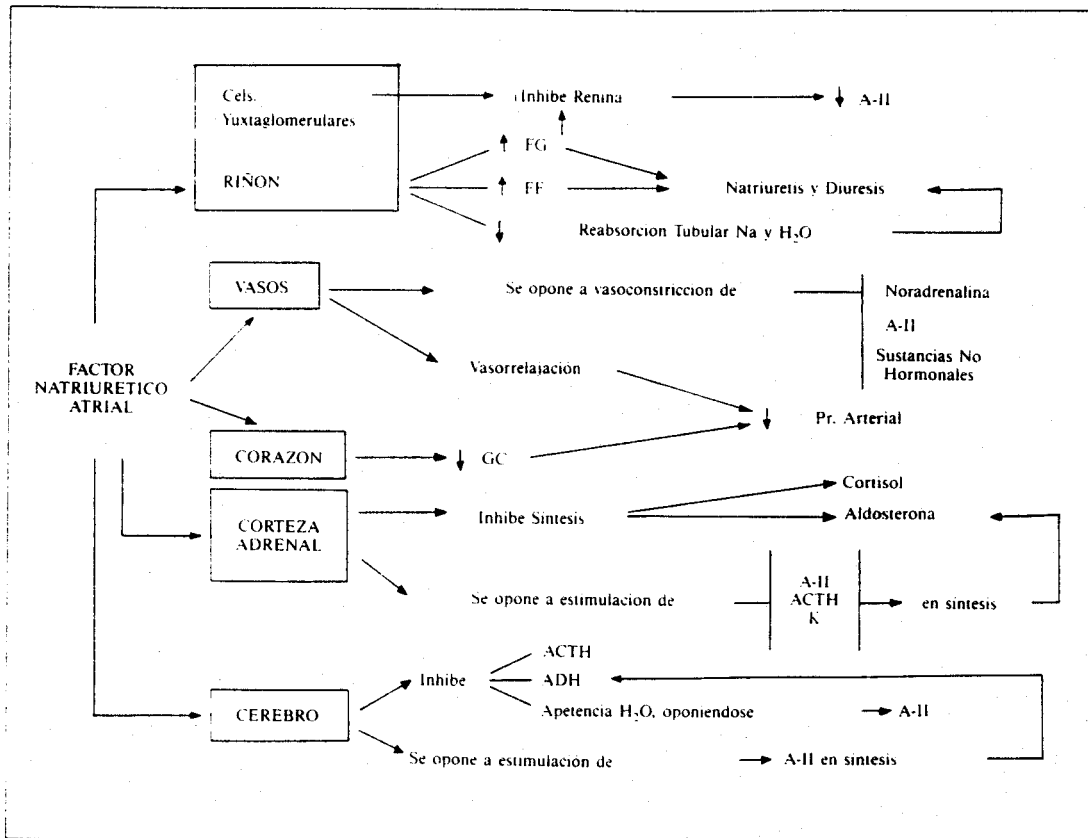
A nivel vascular, el Factor Atrial Natriurético es un potente **vasodilatador**, tanto en riñón como en las grandes arterias y otros lechos vasculares (92), disminuyendo el gasto cardiaco, y no siendo siempre debida a la reducción de la resistencia vascular periférica (101, 102).

Sabemos ya que el Factor Atrial Natriurético puede reducir la relación resistencia precapilar/postcapilar, mediante una constricción selectiva postcapilar produciendo una disminución del retorno venoso y del gasto cardiaco, provocando un descenso de la tensión arterial media (102).

La potencia vasodilatadora se ha visto que es mayor en las arterias centrales que en las periféricas.

El papel **protector** del Factor Atrial Natriurético está siendo puesto de manifiesto actualmente.

En la insuficiencia cardiaca, los niveles elevados de Factor Atrial Natriurético en sangre, podían proteger el sistema cardiocirculatorio, no sólo por su efecto diurético sino también por sus efectos extrarrenales como vasodilatación, aumento del "pool" venoso e inhibición de hormonas vasoconstrictoras y retenedoras de sodio, entre otras. En un trabajo reciente ha quedado demostrado el papel protector renal del Factor Atrial Natriurético, mediante la infusión de éste a ratas sometidas a tratamiento con ciclosporina (104).



1.3. FACTOR ATRIAL NATRIURETICO "EXTRAAURICULAR"

La presencia de un mRNA-ANF en **ventrículos cardiacos** similar al mRNA-ANF de las aurículas, sugiere que el gen del Factor Atrial Natriurético se expresa también en los ventrículos (105).

Gracias a cultivos de cardiocitos ventriculares, se ha demostrado que los ventrículos también sintetizan el Factor Atrial Natriurético (106), aunque los niveles encontrados de la hormona son de 100 a 150 veces menores que en la aurícula.

Tanaka y colaboradores, en 1984 (107), demostraron la presencia de Factor Auricular Natriurético extraauricular en **hipotálamo** de rata, habiéndose ya descrito ANF-Like inmunoreactivo en hipotálamo, tálamo, cerebro medio de rata, corteza cerebral, tálamo, bulbo olfatorio, cerebelo, hipocampo y médula pontina (108, 109).

La presencia de péptidos ANF-Like en el **sistema nervioso autónomo**, podría sugerir la acción neuromoduladora de ésta hormona sobre dicho sistema.

Aunque no está completamente dilucidado el papel del Factor Atrial Natriurético en el sistema nervioso, el hecho de haber encontrado mayores concentraciones de péptido en el tercer ventrículo anteroventral de rata (110) (lugar relacionado con el control de volumen, y regulación de la presión arterial), podría hacernos pensar en el papel de regulador central del equilibrio hidrosalino del Factor Atrial Natriurético.

El **pulmón** es otro de los lugares donde han sido encontrados cantidades de ANF-like (111, 112), habiéndose identificado diversas formas inmunoreactivas en pulmón de rata.

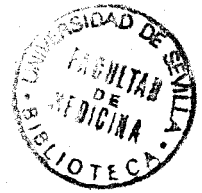
El descubrimiento de m-RNA-ANF en el pulmón sugiere la posibilidad de la síntesis pulmonar del Factor Atrial Natriurético, teniendo una prueba directa de la liberación de una forma biológicamente activa en pulmones hiperperfundidos de rata (112).

El tejido pulmonar fetal humano también libera Factor Atrial Natriurético, habiéndose encontrado en enfermedades cardiovasculares y cardiopulmonares donde se han descrito niveles circulantes elevados del péptido (113).

En el lóbulo anterior y posterior de la **hipófisis** se han detectado niveles de ANF-like inmunorreactivo (114, 115).

Los efectos de la vasopresina sobre riñón, vasos y regulación de los líquidos corporales son conocidos, siendo el descubrimiento del Factor Atrial Natriurético local en hipófisis, un paso más para intentar relacionar ADH-ANF en la regulación de los líquidos corporales, siendo posiblemente una fuente local de Factor Atrial Natriurético, la encargada de regular la liberación de vasopresina.

Aunque se ha aislado Factor Atrial Natriurético biológicamente activo en adenohipófisis de rata, no tenemos aún resultados concluyentes de su papel sobre la liberación de hormonas hipofisaria (117).



El ojo, parece ser un órgano diana ya que se han encontrados receptores específicos y Factor Atrial Natriurético inmunoreactivo, habiéndose medido por RIA niveles de ANF-like.

Gracias a la cromatografía líquida de alta eficacia, se ha visto que el principal componente de los extractos es el péptido de 28 aminoácidos.

La presencia, tanto de péptido como de receptores, en la úvea anterior sugiere que el Factor Atrial Natriurético podría estar implicado en la regulación de los líquidos intraoculares, habiendo quedado demostrado por la caída de presión intraocular al inyectar, dentro del ojo, Factor Atrial Natriurético (118, 119).

La presencia de Factor Natriurético prohormona y maduro encontrado en los gránulos cromafines de la médula adrenal, sugiere que este podría ser otro nuevo lugar de síntesis de la hormona (120); y pudiéndose pensar en un efecto inhibitor en la secreción de aldosterona por el cortex adrenal.

En conclusión, el hecho de haber encontrado Factor Atrial Natriurético inmunoreactivo en diversos órganos como páncreas, arco aórtico y tiroides, así como en las localizaciones ya referidas, confirma el papel extraauricular y extracardiaco de esta hormona, apuntando los bajos niveles inmunoreactivos hacia un papel modulador local de Factor Atrial Natriurético, pero quedando aún por aclarar este papel local en circunstancias normales y patológicas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De los comentarios anteriormente expuestos se puede deducir fácilmente que existe una gran complejidad en la regulación de la tensión arterial y del volumen sanguíneo, con implicación de múltiples sistemas interrelacionados entre sí y con influencias muy diversas, dependiendo de cada situación concreta, siendo como una gran "tela de araña" donde la tensión de cada hilo va a provocar alteraciones en las demás.

Cada día van apareciendo nuevos factores de regulación de la capacitancia vascular y el volumen sanguíneo, así como nuevas influencias sobre otros factores.

Nosotros estamos interesados por uno de los factores: EL FAN por lo que nos hemos propuesto el siguiente esquema de trabajo.

1. Poner en marcha una técnica de determinación del Factor Atrial Natriurético Humano en nuestro medio y ensayar, hasta conseguir unos resultados óptimos con el menor número de interferencias posibles.
2. Establecer los valores de normalidad de la técnica, estudiando una población normal.
3. Estudiar las variaciones del Factor Atrial Natriurético Humano en situaciones críticas de volumen, no inducida por nosotros por aporte exógeno, para lo que se escogió una población de pacientes en Insuficiencia Renal Crónica Terminal en programa de Hemodiálisis, y con unos márgenes interdialíticos de 48 y 72 horas.

4. Comprobar las variaciones en los niveles del Factor Atrial Natriurético tras la depleción de volumen mediante la Hemodiálisis.

5. Establecer las relaciones de los niveles de Factor Atrial Natriurético y diversas situaciones clínicas y hemodinámicas, estudiando en la población de pacientes, las variables de: sexo, edad, peso seco, estado del sistema nervioso autónomo, tensión arterial, pulso y pérdida de líquido durante la hemodiálisis.

3. MATERIAL Y METODO

3.1. GRUPOS DE TRABAJO

Para nuestro trabajo hemos escogido una población de 48 pacientes (27 varones y 21 hembras) en insuficiencia renal crónica, sometidos a un programa de hemodiálisis periódica.

Las edades oscilan entre 22 y 70 años.

La pérdida de líquido durante la hemodiálisis, oscilo entre 500 y 5.000 c.c.

El peso seco de los pacientes fue de 35,5 a 91 Kg.

El sistema nervioso autónomo estaba afectado parcialmente en 32 pacientes, de forma combinada en 15 y uno no presentaba afectación.

La tensión arterial sistólica antes de la hemodiálisis osciló entre 190 y 90 mm. Hg.

La tensión arterial diastólica antes de la hemodiálisis osciló entre 110 y 60 mm. Hg.

La tensión arterial sistólica después de la hemodiálisis osciló entre 175 y 90 mm. Hg.

La tensión arterial diastólica después de la hemodiálisis osciló entre 90 y 60 mm. Hg.

El pulso antes de la hemodiálisis osciló entre 110 y 60 pulsaciones por minuto.

La población control elegida fue de 50 sujetos sanos (25 varones y 25 hembras) con edades comprendidas entre 21 y 48 años.

Iniciales	Sexo	Edad	Peso	Afectación	Pérdida de del S.N.A.	Pérdida de Líquido	TAS (A)	TAD (A)	P (A)	TAS (D)	TAD (D)	P (D)
FPS	- V	- 22	- 61	- t	-	1500	- 170	- 80	- 65	- 140	- 70	- 75
DVR	- V	- 55	- 90	- p	-	3000	- 160	- 80	- 48	- 170	- 70	- 50
SCD	- V	- 31	- 78,5	- p	-	2800	- 130	- 70	- 85	- 120	- 80	- 100
MLJ	- H	- 27	- 50	- t	-	4000	- 130	- 80	- 90	- 120	- 80	- 110
FMN	- V	- 59	- 73,5	- t	-	2500	- 180	- 82	- 64	- 120	- 60	- 70
VGP	- H	- 29	- 52	- p	-	1200	- 150	- 100	- 80	- 140	- 80	- 96
FPP	- V	- 52	- 57,5	- p	-	2300	- 120	- 80	- 76	- 100	- 60	- 80
DJP	- H	- 46	- 35,5	- p	-	2000	- 160	- 80	- 72	- 170	- 90	- 85
AFG	- H	- 60	- 63	- t	-	2300	- 160	- 90	- 70	- 120	- 70	- 90
ECC	- H	- 42	- 49	- p	-	2000	- 180	- 110	- 68	- 130	- 70	- 46
RMR	- H	- 70	- 60,5	- t	-	2300	- 115	- 80	- 75	- 110	- 80	- 85
SLS	- H	- 30	- 70,5	- p	-	2700	- 120	- 80	- 68	- 90	- 60	- 70
ASL	- H	- 61	- 75	- t	-	3700	- 190	- 90	- 72	- 160	- 80	- 70
MSS	- H	- 42	- 55	- p	-	3750	- 140	- 70	- 72	- 100	- 60	- 85
DBL	- V	- 60	- 75,5	- p	-	2000	- 150	- 80	- 70	- 150	- 80	- 74
CGM	- H	- 61	- 80,5	- p	-	2000	- 150	- 80	- 70	- 150	- 80	- 80
MER	- V	- 44	- 62,5	- p	-	1900	- 130	- 80	- 70	- 110	- 70	- 78
FFG	- V	- 33	- 70	- t	-	2500	- 130	- 80	- 70	- 110	- 70	- 75
MEL	- H	- 38	- 48	- p	-	1000	- 140	- 80	- 90	- 120	- 60	- 100
JCT	- V	- 53	- 62	- t	-	3300	- 140	- 80	- 68	- 130	- 70	- 60
LMN	- V	- 34	- 62,5	- n	-	3800	- 120	- 80	- 55	- 110	- 80	- 80
RCR	- V	- 29	- 51	- p	-	3200	- 140	- 70	- 68	- 120	- 60	- 72
RZO	- V	- 63	- 76,5	- t	-	2500	- 170	- 70	- 60	- 100	- 60	- 70
CJG	- H	- 42	- 48	- p	-	1500	- 140	- 80	- 80	- 100	- 70	- 96
SPG	- H	- 52	- 76	- p	-	1700	- 150	- 80	- 84	- 175	- 80	- 100
FRR	- V	- 45	- 91	- p	-	5000	- 140	- 80	- 70	- 90	- 60	- 84
GEG	- H	- 51	- 65	- p	-	2000	- 90	- 60	- 80	- 90	- 60	- 90
AMO	- H	- 52	- 60	- p	-	3500	- 140	- 70	- 76	- 120	- 60	- 84

JDR	-	V	-	70	-	87,5	-	p	-	2700	-	160	-	80	-	84	-	140	-	70	-	90
MOR	-	V	-	58	-	61	-	p	-	3500	-	150	-	90	-	80	-	115	-	90	-	86
JJO	-	V	-	28	-	46,5	-	p	-	4500	-	130	-	70	-	80	-	90	-	60	-	65
CNM	-	H	-	58	-	90,5	-	t	-	4500	-	180	-	100	-	100	-	110	-	70	-	120
ANM	-	H	-	57	-	62	-	p	-	3800	-	140	-	70	-	76	-	110	-	60	-	84
MBP	-	V	-	50	-	53,5	-	t	-	3000	-	160	-	80	-	74	-	120	-	60	-	70
FGR	-	V	-	60	-	59,5	-	t	-	2300	-	160	-	90	-	60	-	110	-	70	-	55
MLC	-	V	-	61	-	64	-	t	-	3400	-	170	-	110	-	110	-	140	-	90	-	110
N LL	-	V	-	62	-	57	-	p	-	2500	-	140	-	100	-	70	-	140	-	80	-	80
MGM	-	V	-	59	-	50,5	-	p	-	3500	-	120	-	60	-	74	-	100	-	60	-	88
CMN	-	H	-	60	-	71	-	p	-	1500	-	140	-	70	-	100	-	140	-	60	-	120
FGL	-	V	-	46	-	70	-	p	-	1500	-	130	-	100	-	70	-	160	-	100	-	70
LMR	-	H	-	44	-	46,5	-	t	-	2200	-	130	-	70	-	76	-	120	-	70	-	80
LPC	-	H	-	55	-	56,5	-	t	-	1500	-	160	-	80	-	95	-	130	-	80	-	110
FTG	-	V	-	67	-	53	-	p	-	2700	-	140	-	70	-	84	-	130	-	60	-	90
APR	-	V	-	50	-	63,5	-	p	-	2700	-	120	-	70	-	70	-	120	-	70	-	74
PGC	-	H	-	64	-	71,5	-	p	-	2000	-	130	-	90	-	70	-	120	-	80	-	80
ICV	-	V	-	62	-	64,5	-	p	-	2500	-	150	-	80	-	70	-	150	-	80	-	80
MFC	-	V	-	41	-	69	-	p	-	4000	-	160	-	90	-	74	-	145	-	70	-	85
FGP	-	V	-	60	-	72	-	p	-	500	-	140	-	80	-	84	-	140	-	80	-	90

3.2. MATERIAL EMPLEADO

3.2.1. Jeringas

1. Jeringa LUER de 5 ml. para la recogida de las muestras de sangre.
2. Jeringa LUER de 10 ml. para la fase de purificación de las muestras.

3.2.2. Tubos de ensayo

1. Tubos de plástico EUROTUBO de 5 ml. para la recogida y transporte de las muestras de sangre.
2. Tubos de vidrio calibrados TRIMEX de 10 ml. para la recogida del eluido final en la fase de purificación de las muestras.
3. Tubos de plástico SORING para la conservación del plasma y la fase de radioinmunoensayo.

3.2.3. Productos químicos

1. Inhibidores de las proteasa: EDTA tripotásico, Pepstatin A, Soyabean Tripsin Inhibidor, Fenimetil Sulfonil Fluorido, (de laboratorios Sigma) y Aprotinin (de laboratorios Bayer).

2. Productos para la fase de purificación de las muestras: Etanol, Metanol, Acetonitrilo, Acido trifluoroacético (de laboratorios Merck) y solución salina (de laboratorios Ybis).

3.2.4. Columnas de purificación de las muestras

Columnas de Sep-Pack-C18 de Laboratorios Waters (Waters Associated) Lotes: P-8014-A1, P-8053-A2, P-7324-A1, P-8103-A2, P-8264-A1, P-9067-A1 y P-9067-A1.

3.2.5. Sistemas de radioinmunoanálisis

Human-Alfa-ANP ($I-^{125}$) de Laboratorios Amersham (Amersham International plc.) Lotes: 15-A, 15-A, 15-A, 19-A, 20-A, 20-A, 27-A, 27-A, 27-A, conteniendo:

1. Buffer Assay: Phosphate buffer concentrate with acide.
2. Standard: h-alfa-ANP Standard 1,28 pmol Liophilized.
3. Antiserum: Antiserum liophilized.
4. Trazador: I-125 alfa-ANP (human) trazer.
5. Second antibody: Amerlex-M second antibody reagent.

3.2.6. Parrilla móvil

Para la purificación de 20 muestras a la vez, de fabricación propia.

3.2.7. Evaporador múltiple

Para evaporar con gas nitrógeno 10 muestras, de fabricación propia.

3.2.8. Congeladores

1. Kelvinator AKM * * * (Kelvinator S.A.) para conservar las muestras de plasma y el producto eluido final a -15°C e incubar a 4°C en las fases de radioinmunoanálisis.
2. Scien Temp 110 (Scien Temp Corporation) para guardar las muestras del eluido final a -60°C.

3.2.9. Centrifugadora

Centrifuga Kongtrom TGA-6 para la separación del plasma a -4°C.

3.2.10. Vortex

Atomixer Atom 647 (Atom, Barcelona) para la mezcla del plasma, eluido y la fase RIA.

3.2.11. Separador magnético

Amerlex-M-separator, code 4000 (Amersham International plc) para separar la muestra final del RIA.

3.2.12. Contador del radioinmunoanálisis

Multy Crystal Conmuter, LB-2104 (Berthold, Ld, W. Germany).

3.3. VARIABLES ESTUDIADAS

3.3.1. Situación clínica

1. Edad.
2. Sexo.
3. Peso Seco.
4. Afectación del Sistema Nervioso Autónomo.

3.3.2. Situación hemodinámica

1. Tensión Arterial Sistólica, antes y después de la hemodiálisis.
2. Tensión Arterial Diastólica, antes y después de la hemodiálisis.
3. Tensión Arterial Media, antes y después de la hemodiálisis.
4. Pulso, antes y después de la hemodiálisis.
5. Pérdida de Líquido durante la hemodiálisis.

3.4. METODOS EMPLEADOS

En nuestro trabajo hemos seguido los métodos indicados de determinación del Factor Atrial Natriurético humano alfa según Amersham International plc.

3.4.1. Método 1

3.4.1.1. Recogida de las muestras

- a. Preparación de los tubos de 5 ml. con:
 - * EDTA tripotásico en cantidades superiores a 1 mg. de EDTA/ml de sangre.
 - * Fenimetil Sulfonil Fluorido: 10 μ M
- b. Conservación de los tubos a -15° C hasta su utilización.
- c. Recogida de 5 ml. de sangre por tubo.
- d. Transporte en hielo picado hasta la centrifuga.
- e. Centrifugación a 3.200 r.p.m. y 4° C durante 30 minutos.
- f. Recogida del plasma, ya separado, y conservación en tubos a -15° C hasta la fase de purificación.

3.4.1.2. Purificación de las muestras

- a. Se acoplan las jeringas de 10 ml. a las columnas de purificación.

- b. Prelavado de las columnas con 10 ml. de Etanol y 10 ml. al Acido Acético al 4 %.
- c. Preparación de la muestra problema mezclando 1 volumen de plasma con 3 volúmenes del Acido Acético.
- d. Pasar la muestra problema a través de las columnas.
- e. Lavar con 5 ml. de agua destilada y desionizada.
- f. Preparación del eluido con 86 % de Etanol y 4 % de Acido Acético.
- g. Se pasan 4 ml. de eluido a través de las columnas.
- h. Se recoge el producto final en tubos de vidrio calibrado en cantidad total de 4,5 ml.
- i. Se congelan a -60° hasta la siguiente fase.

3.4.1.3. Procedimiento de radioinmunoanálisis

- a. Preparación de los reactivos

1 Assay buffer: * Calentar el bote a 40° C hasta la disolución del gel.

* Transferir el contenido con lavados de agua destilada a un cilindro calibrado de 100 ml. y diluir hasta el total.

* Mezclarlo adecuadamente.

2 Standard: * Añadir 2 ml. de buffer.

* Mezclar por inversión.

3 Antiserum: * Añadir 11 ml. de buffer.

* Mezclar por inversión.

4 Trazer: * Para usar en el 2º día.

* Añadir 11 ml. de Buffer.

* Mezclar por inversión.

5 Amerlex-M-Second

Antibody: * Poner en suspensión el bote.

b.- Día 1

1. Poner a temperatura ambiente.

2. Preparación del Standard de trabajo:

* Rotular 6 tubos de plástico: "1", "2", "4", "8", "16" y "32".

* Pipetear 500 μ l de Buffer en los seis tubos.

* Añadir 500 μ l de estandar en el tubo "32" y mezclarlo adecuadamente.

* Transferir 500 μ l del "32" al "16", del "16" al "8", del "8" al "4", del "4" al "2" y del "2" al "1".

Resultando partes alíquotas de 100 μ l de los tubos anteriores, con seis niveles de Standard alfa-ANP de 1 a 32 fmol/ml.

3. Rotular tubos por duplicado:
 - * 2 x Tc.
 - * 2 x Bo.
 - * 2 x Standard.
 - * 2 x Muestras.

4. Pipetear 100 μ l de Buffer en los tubos Bo.

5. Pipetear 100 μ l de Standard en los tubos dobles: S1, S2, S4, S8, S16 y S32.

6. Pipetear 100 μ l de muestras en los tubos dobles: Muestras.

7. Pipetear 100 μ l de Antiserum en todos los tubos excepto los Tc.

8. Mezclar con Vortex y cubrir.

9. Incubar a 4° C durante 24 horas.

- c. Día 2
 1. Poner a temperatura ambiente.
 2. Pipetear 100 μ l de Trazer a todos los tubos.
 3. Mezclar con Vortex y cubrir.
 4. Incubar a 4° C durante 24 horas.

d. Día 3

1. Poner los tubos a temperatura ambiente.
2. Añadir 250 ul. de Amerlex-M-Second Antibody a todos los tubos excepto los Tc.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 3.200 r.p.m. y 4° C durante quince minutos.
5. Aspirar los tubos dejando el decantado.
6. Introducir los tubos en el contador RIA.
7. Resultado final:
 - * Valores de Estandar en fmol/ml
 - * Curva de correlación del método.
 - * Valores de las Muestras en fmol/ml.

3.4.2. Método 2

3.4.2.1. Recogida de las muestras

La preparación de los tubos de 5 ml. se realizaron de dos formas diferentes:

a.- Añadiendo: * EDTA tripotásico en cantidades superiores a 1 mg EDTA/ml de sangre.
* Fenimetil Sulfonil Fluorido: 10 μ M

b.- Añadiendo: * EDTA tripotásico en cantidades superiores a 1 mg. EDTA/ml de sangre.
* Fenimetil Sulfonil Fluorido: 10 μ M
* Pepstatin A: 5 μ M
* Aprotinin: 500-1000 Klu/ml.
* Soyabean Tripsin Inhibidor: 50 BAEE u/ml.

Los demás pasos del proceso de recogida de sangre, transporte, centrifugación y recogida del plasma, así como conservación de la muestras, son iguales al método 1, descrito en el punto 3.4.1.1.

3.4.2.2. Purificación de las muestras

a. Acoplar las jeringas de 10 ml. a las columnas de purificación Sep-Pack C-18.

- b. Prelavado de las columnas con 10 ml. de Metanol y 10 ml. de Solución Salina.
 - c. Se pasa la muestra de plasma en cantidad de 1 ml. a través de la columna.
 - d. Lavado con 5 ml. de Solución Salina.
 - e. Se prepara el eluido con 60 % de Acetonitrilo más 0,1 % de Acido Trifluoroacético.
 - f. Se pasan 4 ml. de eluido a través de la columna.
 - g. Se recoge el resultado final del eluido, en tubos de vidrio calibrado, en cantidad total de 4,5 ml.
- h. Se congelan de dos formas diferentes:
- 1) -60° C hasta la siguiente fase.
 - 2) -15° C hasta la siguiente fase.

3.4.2.3. Procedimiento de radioinmunoanálisis

La preparación de los reactivos y los pasos sucesivos en los días 1 y 2 son como en el método 1, descrito en el punto 3.4.1.3.

El día 3 se puede realizar de dos formas diferentes después de añadir el Amerlex-M-Second Antibody a todos los tubos excepto los Tc.

- a. * Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- * Centrifugar a 3.200 r.p.m. y 4° C durante quince minutos.
- * Aspirar y dejar el decantado.
- * Introducir los tubos en el contador RIA.



- b. * Poner los tubos en el separador magnético quince minutos boca arriba y quince minutos boca abajo.
- * Introducir los tubos en el contador RIA.

3.4.3. Método 3

3.4.3.1. Recogida de las muestras

Es igual al que hemos descrito para el método 1, (apartado 3.4.1.1.)

3.4.3.2 Purificación de las muestras

Es igual al método 2, apartado 3.4.2.2. con la diferencia de que lo recogido de eluido final son sólo los dos primeros mililitros que pasan a través de la columna.

3.4.3.3. Procedimiento de radioinmunoanálisis

Es igual al descrito en el método 1 (apartado 3.4.1.3.)

3.5. CONTROLES DE SEGURIDAD

El procedimiento de determinación del Factor Atrial Natriurético Humano alfa, al ser un procedimiento experimental, no cuenta con valores Control para comprobar la fiabilidad de la técnica, por lo que nosotros hemos utilizado tres controles de seguridad, que se describen a continuación.

3.5.1. Porcentaje de recuperación de la columna

Se realizará para saber cuanto Factor Atrial Natriurético queda retenido en la columna de purificación.

- a. Mezclar 100 ul. de α -ANP-h(I-¹²⁶) con 1 ml. de plasma.
- b. Se mide la radiactividad en c.p.m.
- c. Se prepara la columna, se vierte en ella el plasma mezclado con α -ANP-h(I¹²⁶), y se recoge el eluido final.
- d. Se mide la radiactividad en c.p.m.

El resultado final se compara con las cuentas primeras, resultando el porcentaje de recuperación de la muestra a su paso através de la columna.

3.5.2. Correlación lineal del Standard RIA

Mide la fiabilidad de la fase Ria.

Se realizará con los seis niveles de Standard preparados en esta fase, descritos en 3.4.1.3.b apartado 2.

3.5.3. Estandar Interno

Se utilizará para comprobar la fiabilidad de toda la técnica empleada.

Se preparan 2 niveles Standard. Nosotros hemos elegido los niveles 2 y 4.

- a. Mezclamos 100 ul. de cada uno de los Standard con 1 ml. de plasma preparado de muestras de plasma.
- b. Realizamos todos los pasos de la fase de purificación y de la fase RIA, descritos en cada uno de los métodos.
- c. Medimos el resultado final del Standard y Standard más muestras.
- d. Los resultados finales de las muestras y los standars preparados (Muestra más Standard) se comparan con valores correspondientes a los Standars elegidos de la Curva Standard del RIA.

Estas curvas nos indican si la técnica esta bien realizada, ya que las muestras, más el Standard Interno sufren todos los pasos del método de determinación del Factor Atrial Natriurético Humano.

3.5.4. Valores finales de las muestras

Como trabajamos con radioinmunoanálisis, que utiliza nuestras dobles, sólo aceptamos los valores cuya variación interensayo fue menor de 10 %.

3.6. ENSAYOS

Para la puesta en marcha de la técnica de determinación del Factor Atrial Natriurético Humano hemos partido de las indicaciones de los laboratorios Amersham modificándolas para adecuarla a nuestro medio.

La población escogida, ya que nos encontramos con una hormona de regulación fundamentalmente volumétrica, ha sido aquella cuya sobrecarga de volumen es fácilmente medible y su situación hemodinámica fácilmente modificable, esto es, pacientes en insuficiencia renal crónica en programa de hemodiálisis.

Durante el tiempo de hemodiálisis se les permitió adoptar las posturas desde sentados hasta acostados en decúbito supino.

Para los tres primeros ensayos se tomaron muestras de sangre, antes y después de la sesión de hemodiálisis, con un margen interdialítico de 48 horas. Para el quinto ensayo, el margen interdialítico fue de 72 horas.

3.6.1. Ensayo 1

La preparación de los tubos, recogida y transporte de sangre, así como separación y conservación de las muestras es como hemos descrito en el **Método 1**, apartado 3.4.1..

El margen interdialítico fue de 48 horas.

3.6.2. Ensayo 2

La preparación de los tubos de recogida de sangre es el descrito en el apartado a del **Método 2**, (3.4.2.1.).

El margen interdiálítico fue de 48 horas.

La recogida, transporte, separación y conservación de las muestras es la descrita en el **Método 1**.

La fase de purificación de las muestras es la seguida en el **Método 2** (3.4.2.2). congelando según lo descrito en el apartado h-1.

El procedimiento RIA es el seguido en el **Método 2** (3.4.2.3.).

3.6.3. Ensayo 3

La preparación de los tubos, recogida, transporte y separación del plasma es el descrito en el **Método 3** (3.4.3.)

El margen interdiálítico fue de 48 horas.

3.6.4. Ensayo 4

En este ensayo comparamos los distintos standars internos, porcentajes de recuperación y las ventajas de la evaporación del eluido final sobre la no evaporación de éste.

Para ello utilizamos una muestra de 100 c.c. de sangre de un sujeto joven.

Los métodos de determinación del Factor Auricular Natriurético Humano que comparamos fueron los detallados en los ensayos 1, 2 y 3, trabajando con muestras dobles en las fases de recogida y purificación de las muestras (4,5 ml. y 2 ml) de los tres ensayos y evaporando con nitrógeno una de las muestras dobles purificadas.

La fase RIA es la descrita en los tres ensayos anteriores.

3.6.5. Ensayo 5

Para este ensayo obtuvimos muestras de sangre en la misma población con un margen interdialítico de 72 horas.

La preparación de los tubos es la descrita en el apartado b del método 2, (3.4.2.1.b) siendo la recogida y transporte de sangre, la separación y conservación del plasma la descrita en el método 1. (3.4.2.1.)

La fase de purificación de las muestras es la descrita en el método 2, y la conservación de éstas según el apartado b-2 de este método. (3.4.2.2,h,2)

La fase de RIA es la descrita en el método 2, apartado b. (3.4.2.3,b).

3.7. CALCULO ESTADISTICO

Los datos obtenidos fueron estudiados con el personal del Departamento de Estadísticas e Investigación Operativa de la Facultad de Matemáticas de la Universidad de Sevilla, a cargo del profesor Moreno Rebollo.

Fue utilizado el Programa BMDP Statistical Software. Inc. 1440 Sepulveda Boulevard, Los Angeles California 90025. Versión del programa: 1987.

Realizamos estudios paramétricos y no paramétricos para datos apareados y no apareados así como correlaciones múltiples lineales y exponenciales.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS NUMERICOS

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A HEMODIALISIS. METODO 5

PACIENTES	F.A.N. ANTES	F.A.N. DESPUES
	H.D.	H.D
D.V.R.	10.20	1.77
S.C.D.	5.73	3.35
F.M.N.	6.26	3.97
M.G.M.	9.51	5.75
M.E.R.	3.00	0.64
F.F.G.	2.78	2.56
J.C.T.	6.74	1.91
L.M.N.	5.61	5.38
J.J.O.	6.35	4.65
M.B.P.	8.38	7.83
F.G.R.	8.40	2.98
M.L.C.	4.68	3.51
R.Z.O.	10.51	4.20
M.F.C.	5.40	1.03
R.M.R.	3.41	2.82
A.F.G.	4.39	1.48
S.L.S.	9.17	6.29
A.S.L.	4.53	2.58
C.N.M.	2.50	2.46
L.P.C.	4.68	2.67

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
EN UNA POBLACION NORMAL**

Ensayo 1

Máximo: 50.1860
Mínimo: 26.0880
Media: 39.3619
D.E.: 6.3619

n = 10

Ensayo 2

Máximo: 12.7050
Mínimo: 1.5830
Media: 5.5683
D.E.: 2.4070

n = 41

Ensayo 3

Máximo: 9.5470
Mínimo: 3.7110
Media: 6.1570
D.E.: 1.5068

n = 20

Ensayo 5

Máximo: 3.4800
Mínimo: 1.4700
Media: 2.4765
D.E.: 0.5841

n = 20

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO EN LOS
PACIENTES SOMETIDOS A HEMODIALISIS**

Ensayo 1

	FAN Antes HD	FAN Después HD
Máximo:	42.3260	43.4610
Mínimo:	12.2870	11.8150
Media:	31.2031	30.2157
D.E.:	10.9779	10.2962

n = 15

Ensayo 2

	FAN Antes HD	FAN Después HD
Máximo:	9.8110	8.8500
Mínimo:	0.6270	0.1540
Media:	3.7150	3.3293
D.E.:	2.4151	1.8738

n = 44

n = 40

Ensayo 3

	FAN Antes HD	FAN Después HD
Máximo:	4.3290	5.3620
Mínimo:	1.1690	0.3380
Media:	2.5771	2.1285
D.E.:	0.9617	1.4342
	n = 19	n = 15

Ensayo 5

	FAN Antes HD	FAN Después HD
Máximo:	10.5100	7.8300
Mínimo:	2.5000	0.6400
Media:	6.1115	3.3915
D.E.:	2.5070	1.8505

n = 20

**COMPARACION DE LOS VALORES DE FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL**

Ensayo 1

	Antes de la HD	Población normal
Máximo:	42.3260	50.1860
Mínimo:	12.2870	26.0880
Media:	31.2031	39.6784
D.E.:	10.9779	6.3619
	n = 15	n = 10
	p = 0.0759	

	Después de la HD	Población normal
Máximo:	43.4610	50.1860
Mínimo:	11.8150	26.0880
Media:	30.2157	39.6784
D.E.:	10.2962	6.3019
	n = 15	n = 10
	p = 0.0198	

Ensayo 2

	Antes de la HD	Población normal
Máximo:	9.8110	12.7050
Mínimo:	0.6270	1.5830
Media:	3.7150	5.5683
D.E.:	2.4151	2.4070
	n = 44	n = 41
	p = 0.0004	

	Después de la HD	Población normal
Máximo:	8.8500	12.7050
Mínimo:	0.1540	1.5830
Media:	3.3293	5.5683
D.E.:	1.8738	2.4070
	n = 40	n = 41
	p = 0.0000	

Ensayo 3

	Antes de la HD	Población normal
Máximo:	4.3290	9.5470
Mínimo:	1.1690	3.7110
Media:	2.5771	6.1570
D.E.:	0.9617	1.5068
	n = 19	n = 20
	p = 0.0001	

	Después de la HD	Población normal
Máximo:	5.3620	9.5470
Mínimo:	0.3380	3.7110
Media:	2.1285	6.1570
D.E.:	1.4342	1.5068
	n = 15	n = 20
	p = 0.0001	

Ensayo 5

	Antes de la HD	Población normal
Máximo:	10.5100	3.4800
Mínimo:	2.5000	1.4700
Media:	6.1115	2.4765
D.E.:	2.5070	0.5841
	n = 20	n = 20
	p = 0.0000	

	Después de la HD	Población normal
Máximo:	7.8300	3.4800
Mínimo:	0.6400	1.4700
Media:	3.3915	2.4765
D.E.:	1.8505	0.5841
	n = 20	n = 20
	p = 0.0462	

VARIACION DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO HUMANO DURANTE LA HEMODIALISIS

Ensayo 1

	Antes de la HD	Después de la HD
Máximo:	42.3260	43.4610
Mínimo:	12.2870	12.8150
Media:	31.2031	30.2157
D.E.:	10.9779	10.2962

n = 15

p = 0.4896

Ensayo 2

	Antes de la HD	Después de la HD
Máximo:	9.8110	8.8500
Mínimo:	0.6270	0.1540
Media:	3.4638	3.2814
D.E.:	2.1406	1.8733

n = 39

p = 0.5746

Ensayo 3

	Antes de la HD	Después de la HD
Máximo:	4.0890	5.3620
Mínimo:	1.1690	0.3380
Media:	2.2981	2.1174
D.E.:	0.8113	1.4877

n = 14

p = 0.6765

Ensayo 5

	Antes de la HD	Después de la HD
Máximo:	10.5100	7.8300
Mínimo:	2.5000	0.6400
Media:	6.1115	3.3915
D.E.:	2.5070	1.8505

n = 20

p = 0.0000

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO EN LOS PACIENTES
EN HEMODIALISIS RESPECTO AL SEXO**

	Varones	Hembras
Máximo:	10.5100	9.1700
Mínimo:	2.7800	2.5000
Media:	6.6821	4.7800
D.E.:	2.4439	2.3053
	n = 14	n = 6

p = 0.1226

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO AL SEXO**

	Varones	Hembras
Máximo:	8.4300	2.9100
Mínimo:	0.2200	0.0400
Media:	3.1443	1.7300
D.E.:	2.4737	1.1830
	n = 14	n = 6

p = 0.2028

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA EDAD

Edad versus Factor Atrial Natriurético antes de la Hemodiálisis.

	EDAD	FAN(A)
Máximo:	70.000	10.5100
Mínimo:	28.000	2.5000
Media:	50.200	6.1115
D.E.:	12.944	2.5070

$$n = 20$$

$$r = 0.042$$

Edad versus Factor Atrial Natriurético después de la Hemodiálisis

	EDAD	FAN(D)
Máximo:	70.000	7.8300
Mínimo:	28.000	0.6400
Media:	50.200	3.3915
D.E.:	12.944	1.8505

$$n = 20$$

$$r = 0.202$$

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO A LA EDAD**

**Edad versus variación del Factor Atrial Natriurético durante de la
hemodiálisis.**

	EDAD	FAN(V)
Máximo:	70.000	8.4300
Mínimo:	28.000	0.0400
Media:	50.200	2.7200
D.E.:	12.944	2.2355

n = 20

r = 0.215

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
RESPECTO AL PESO**

Pesos versus Factor Atrial Natriurético antes de la hemodiálisis

	PESO	FAN(A)
Máximo:	90.500	10.5100
Mínimo:	46.500	2.5000
Media:	67.400	6.1115
D.E.:	10.855	2.5070

n = 20

r = 0.026

Peso versus Factor Atrial Natriurético después de la Hemodiálisis

	PESO	FAN(D)
Máximo:	90.500	7.8300
Mínimo:	46.500	0.6400
Media:	67.400	3.3915
D.E.:	10.855	1.8505

n = 20

r = 0.330

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO AL PESO**

**Peso versus variación del Factor Atrial Natriurético durante la
hemodiálisis**

	PESO	FAN(V)
Máximo:	90.500	8.4300
Mínimo:	46.500	0.0400
Media:	67.400	2.7200
D.E.:	10.855	2.2355

n = 20

r = 0.244

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA AFECTACION
DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO**

Antes de la Hemodiálisis

	Afect. Total	Afect. Parcial
Máximo:	10.5100	9.5100
Mínimo:	2.5000	3.0000
Media:	5.9585	6.3957
D.E.:	2.7013	2.2723
	n = 12	n = 8
	p = 0.7205	

Después de la Hemodiálisis

	Afect. Total	Afect. Parcial
Máximo:	7.8300	6.2500
Mínimo:	1.4800	0.6400
Media:	3.1338	3.8700
D.E.:	1.6215	2.2748
	n = 12	n = 8
	p = 0.4108	

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO A LA AFECTACION DEL
SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO.**

	Afect. total	Afect. Parcial
Máximo:	8.4300	4.3700
Mínimo:	0.0400	0.2300
Media:	2.8246	2.5257
D.E.:	2.6377	1.3572

n = 12

n = 8

p = 0.7840

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
PERDIDA DE LIQUIDO DURANTE LA HEMODIALISIS**

**Pérdida de líquido versus Factor Atrial Natriurético antes de la
hemodiálisis**

	PERDIDA DE LIQUIDO	FAN(A)
Máximo:	4.500	10.5000
Mínimo:	1.500	2.5000
Media:	3.000	6.1115
D.E.:	825.26	2.5070

n = 20

r = 0.009

**Pérdida de líquido versus Factor Atrial Natriurético después de la
hemodiálisis.**

	PERDIDA DE LIQUIDO	FAN(D)
Máximo:	4.500	7.8300
Mínimo:	1.500	0.6400
Media:	3.000	3.3915
D.E.:	825.26	1.8505

n = 20

r = 0.170

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO
A LA PERDIDA DE LIQUIDO DURANTE LA HEMODIALISIS**

**Pérdida de líquido versus variación del Factor Atrial Natriurético
durante de la hemodiálisis**

	PERDIDA DE LIQUIDO	FAN(V)
Máximo:	4.500	8.4300
Mínimo:	1.500	0.0400
Media:	3.000	2.7200
D.E.:	825.26	2.2355

n = 20

r = 0.151



**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
TENSION ARTERIAL SISTOLICA**

**Tensión arterial sistólica antes de la Hemodiálisis versus Factor
Atrial Natriurético antes de la Hemodiálisis**

	TAS(A)	FAN(A)
Máximo:	190.000	10.5000
Mínimo:	115.000	2.5000
Media:	149.250	6.1115
D.E.:	23.411	2.5070

n = 20

r = 0.017

**Tensión arterial sistólica después de la Hemodiálisis versus Factor
Atrial Natriurético antes de la Hemodiálisis**

	TAS(D)	FAN(D)
Máximo:	170.000	7.8300
Mínimo:	90.000	0.6400
Media:	118.250	3.3915
D.E.:	18.301	1.8505

n = 20

r = 0.461

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO, RESPECTO
A LAS VARIACIONES DE TENSION ARTERIAL SISTOLICA
DURANTE LA HEMODIALISIS**

**Variación de tensión arterial sistólica durante la Hemodiálisis
versus variación del Factor Atrial Natriurético durante la
Hemodiálisis**

	TAS(V)	FAN(V)
Máximo:	70.000	8.4300
Mínimo:	5.000	0.0400
Media:	31.000	2.7200
D.E.:	19.507	2.2355

n = 20

r = 0.062

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
TENSION ARTERIAL DIASTOLICA**

**Tensión arterial diastólica antes de la Hemodiálisis versus Factor
Atrial Natriurético antes de la Hemodiálisis**

	TAD(A)	FAN(A)
Máximo:	100.00	10.5000
Mínimo:	60.000	2.5000
Media:	81.500	6.1115
D.E.:	9.8809	2.5070

n = 20

r = 0.486

**Tensión arterial diastólica después de la Hemodiálisis versus Factor
Atrial Natriurético después de la Hemodiálisis**

	TAD(D)	FAN(D)
Máximo:	90.000	7.8300
Mínimo:	60.000	0.6400
Media:	70.500	3.3915
D.E.:	8.8704	1.8505

n = 20

r = 0.393

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE LA
HEMODIALISIS RESPECTO A LAS VARIACIONES DE LA TENSION
ARTERIAL DIASTOLICA DURANTE LA HEMODIALISIS.**

**Variación de la tensión arterial diastólica durante la
Hemodiálisis versus variación del Factor Atrial Natriurético
durante la Hemodiálisis**

	TAD(V)	FAN(A)
Máximo:	30.000	8.4300
Mínimo:	0.000	0.0400
Media:	11.000	2.7200
D.E.:	9.6791	2.2355

n = 20

r = 0.042

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
TENSION ARTERIAL MEDIA**

**Tensión arterial media antes de la Hemodiálisis versus Factor
Atrial Natriurético antes de la Hemodiálisis**

	TAM(A)	FAN(A)
Media:	104.08	6.1115
D.E.:	12.779	2.5070

n = 20

r = 0.261

**Tensión arterial media después de la Hemodiálisis versus
Factor Atrial Natriurético antes de la Hemodiálisis**

	TAM(D)	FAN(D)
Media:	86.417	3.3915
D.E.:	10.600	1.8505

n = 20

r = 0.485

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE LA
HEMODIALISIS RESPECTO A LAS VARIACIONES DE LA
TENSION ARTERIAL MEDIA DURANTE LA HEMODIALISIS**

**Variaciones del Factor Atrial Natriuretico durante la
Hemodialisis versus variaciones de la Tensión Arterial Media
durante la Hemodialisis.**

	TAM(V)	FAN(V)
Media:	17.667	2.7200
D.E.:	11.7	2.2355

n = 20

r = 0.057

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
RESPECTO AL PULSO**

**Pulso antes de la Hemodiálisis versus Factor Atrial
Natriurético antes de la Hemodiálisis**

	PULSO(A)	FAN(A)
Máximo:	110.000	10.5000
Mínimo:	48.000	2.5000
Media:	73.600	6.1115
D.E.:	14.905	2.5070

n = 20

r = 0.506

**Pulso después de la Hemodiálisis versus Factor Atrial Natriurético
antes de la Hemodiálisis**

	PULSO(D)	FAN(D)
Máximo:	120.000	7.8300
Mínimo:	50.000	0.6400
Media:	79.650	3.3915
D.E.:	18.675	1.8505

n = 20

r = 0.131

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO A LAS VARIACIONES
DEL PULSO DURANTE LA HEMODIALISIS**

**Variación del pulso durante la Hemodiálisis versus variación del
Factor Atrial Natriurético durante la Hemodiálisis.**

	PULSO(V)	FAN(V)
Máximo:	25.000	8.4300
Mínimo:	0.000	0.0400
Media:	6.0500	2.7200
D.E.:	10.754	2.2355

n = 20

r = 0.231

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
DETERMINADO EN UNA MUESTRA POR SEIS VIAS DIFERENTES**

Ensayo 4

	PLASMA	PLASMA + Std 2	PLASMA + Std 8	PLASMA + Std 32
4 ml. EVAPORADO	4.676	5.708	10.569	10.479
2 ml. EVAPORADO	3.003	1.998	5.017	6.757
4 ml. ELUIDO	9.687	11.494	17.396	9.612
2 ml. ELUIDO	3.557	1.237	3.034	0.307
4 ml. DILUIDO 100/100	6.173	4.116	6.632	4.144
2 ml. DILUIDO 100/100	0.469	0.651	0.655	0.775

4.2. CONTROLES DE SEGURIDAD

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA COLUMNA DE PURIFICACIÓN SEP-PACK C-18

Ensayo 5

MUESTRA	ELUIDO	% DE RECUPERACIÓN
11.902,8	10.209,7	85,78
11.514,5	10.101,7	87,73
11.818,0	10.101,8	85,73
12.007,5	9.217,9	76,77
11.800,0	9.938,0	84,22
11.506,3	8.742,3	75,47
11.532,4	8.408,7	73,54
11.582,5	9.317,9	81,86
11.663,5	9.871,7	84,64
7.763,0	6.518,0	83,96

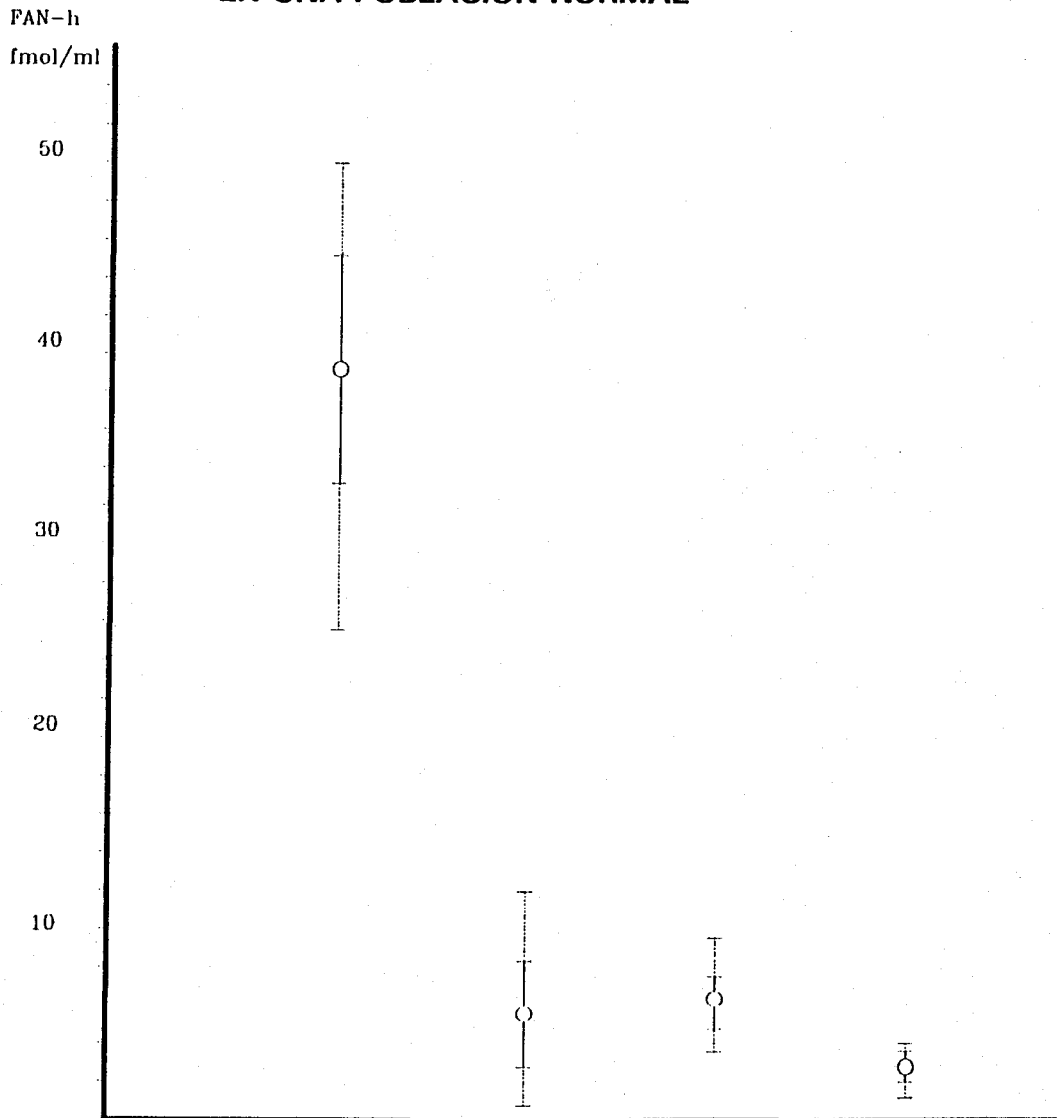
**CURVA DEL STANDARD INTERNO DEL MÉTODO DE DETERMINACION
DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO**

Ensayo 5

MUESTRA	STANDARD 2	STANDARD 4
---	1,60	3,65
1.17	3,01	5,07
1,99	3,70	6,75
2,21	3,11	4,59
2,45	3,95	6,14
1,31	3,78	5,31
0,90	3,46	5,12

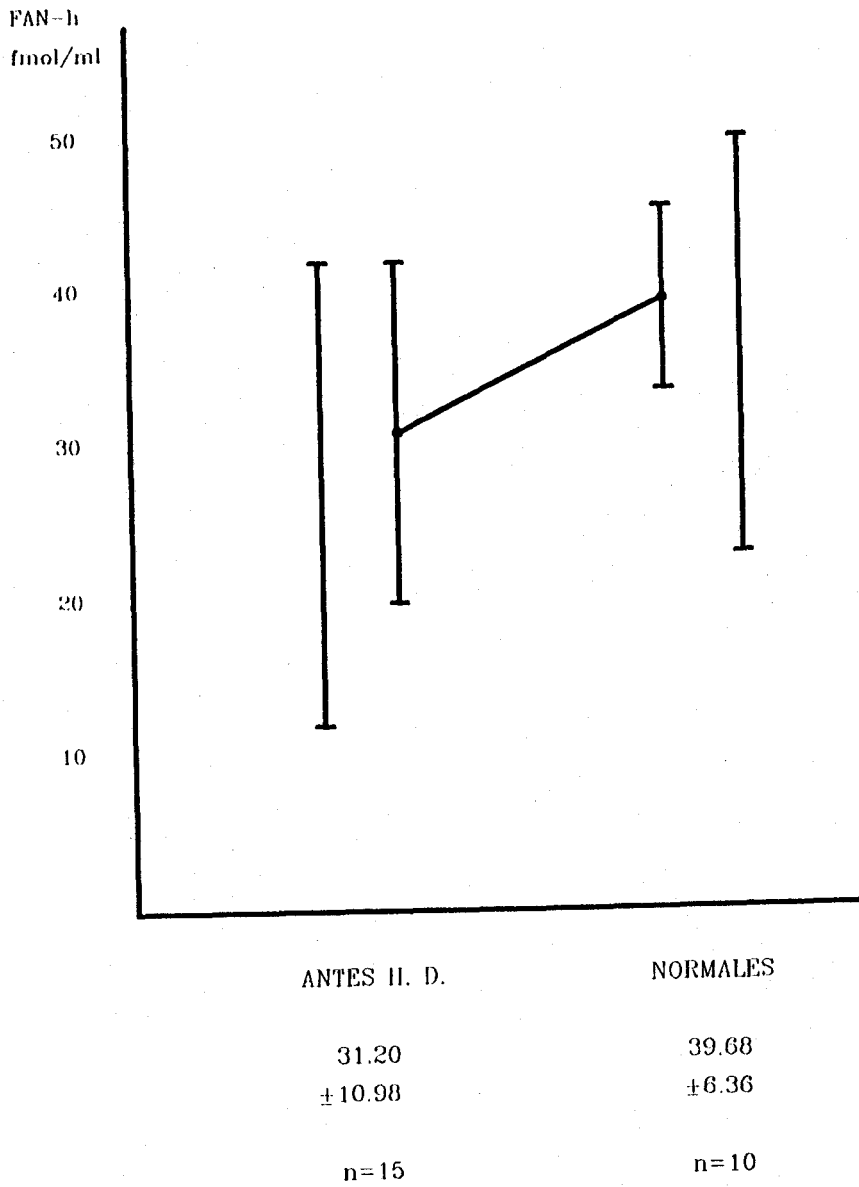
4.3. RESULTADOS GRAFICOS

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO EN UNA POBLACION NORMAL



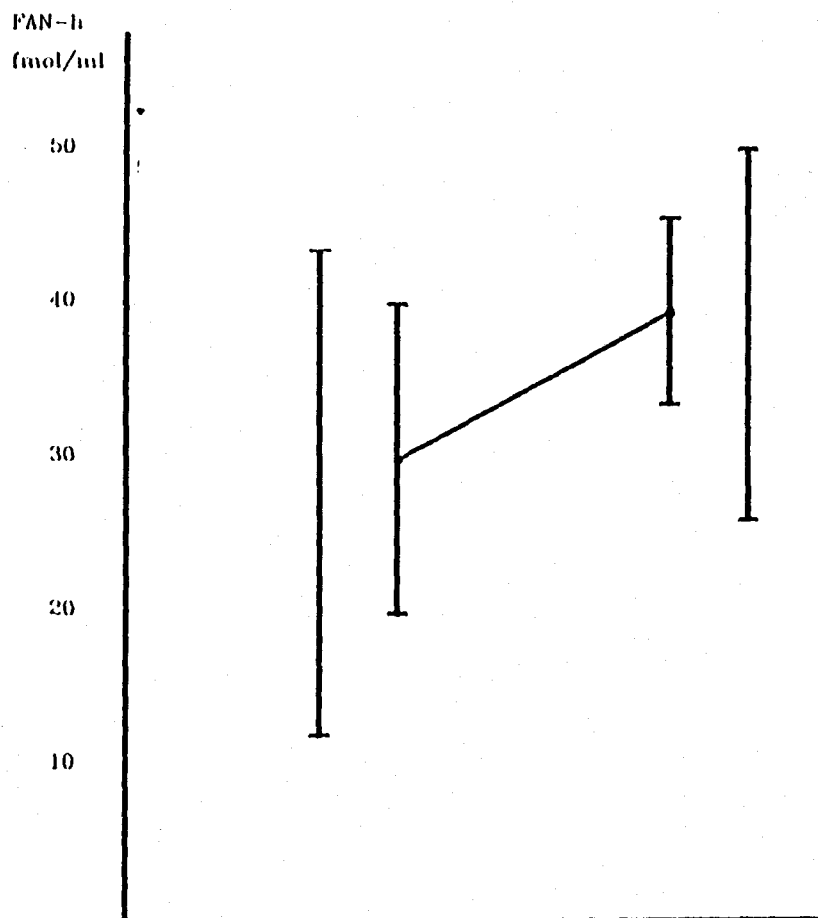
ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	ENSAYO 5
39.36	5.56	6.16	2.48
±6.36	±2.41	±1.51	±0.58
n=10	n=41	n=20	n=20

**COMPARACION DE LOS VALORES DE FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL, ANTES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 1)**



p=N.S.

**COMPARACION DE LOS VALORES DE FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL, DESPUES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 1)**



DESPUES H. D.

NORMALES

30.21

39.60

± 10.30

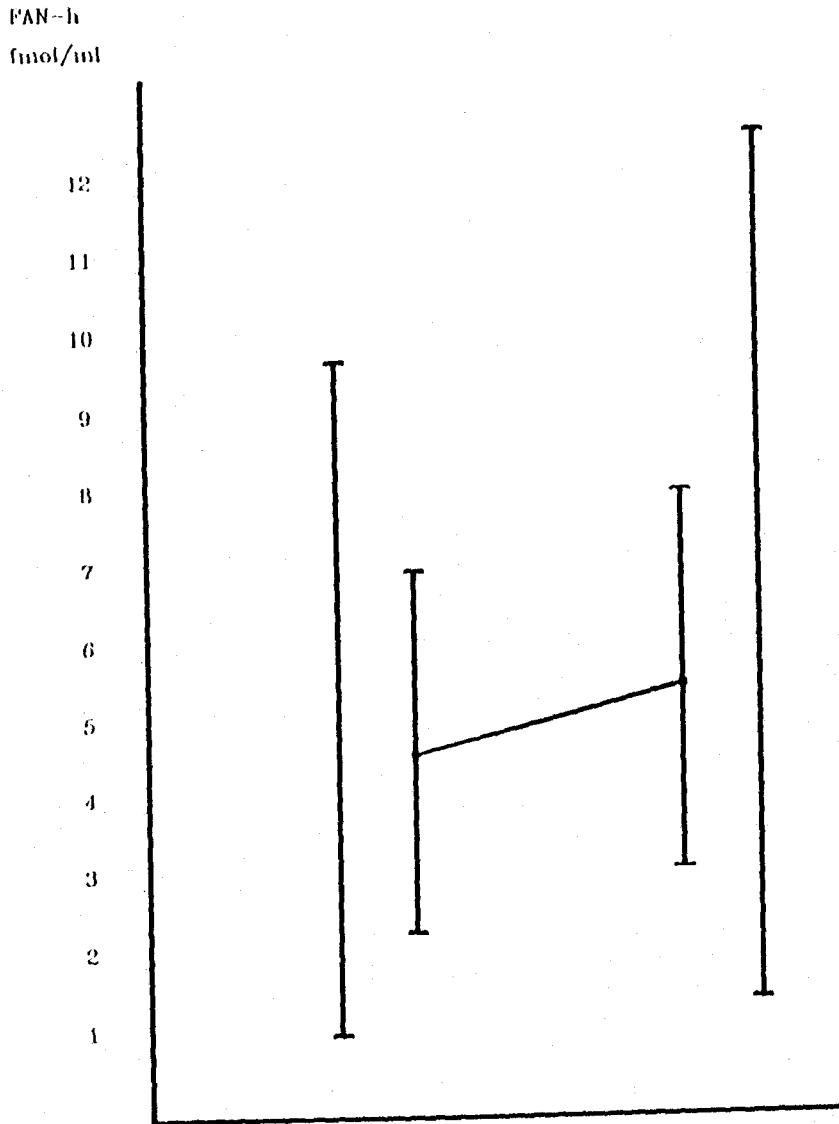
± 6.36

n=15

n=10

p<0.05

COMPARACION DE LOS VALORES DE FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
 ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
 Y LA POBLACION NORMAL, ANTES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 2)



ANTES H. D.

NORMALES

3.71
±2.41

5.57
±2.41

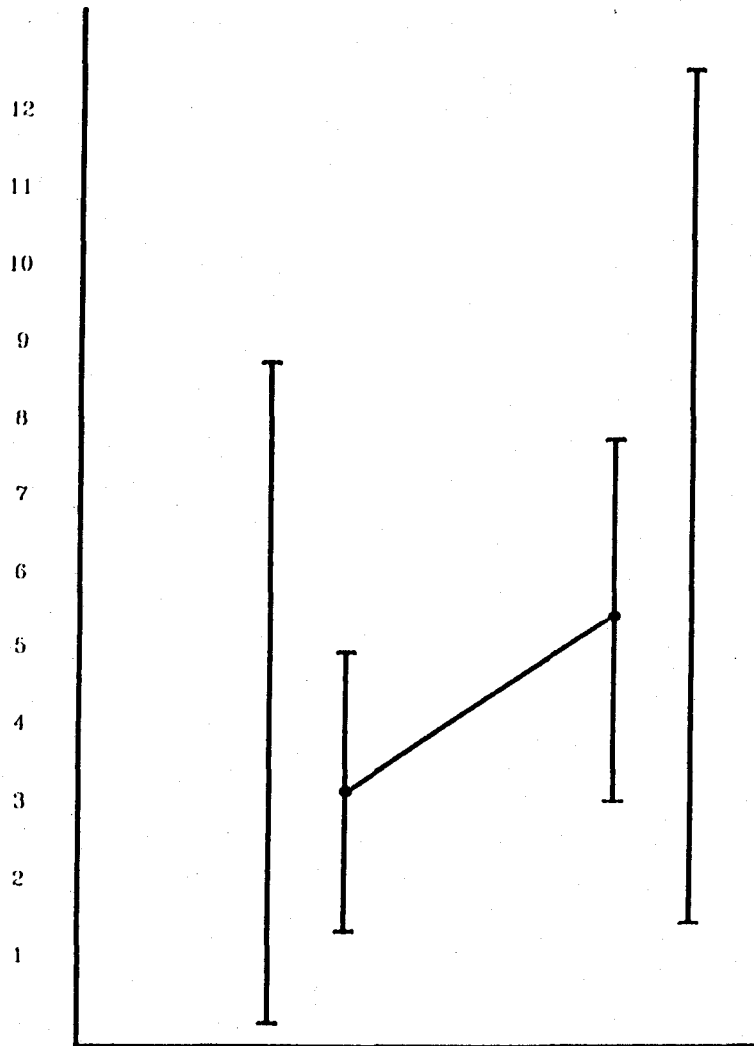
n=44

n=41

p<0.001

**COMPARACION DE LOS VALORES DE FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL, DESPUES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 2)**

FAN-h
fmol/ml



DESPUES H.D.

NORMALES

3.33
±1.87

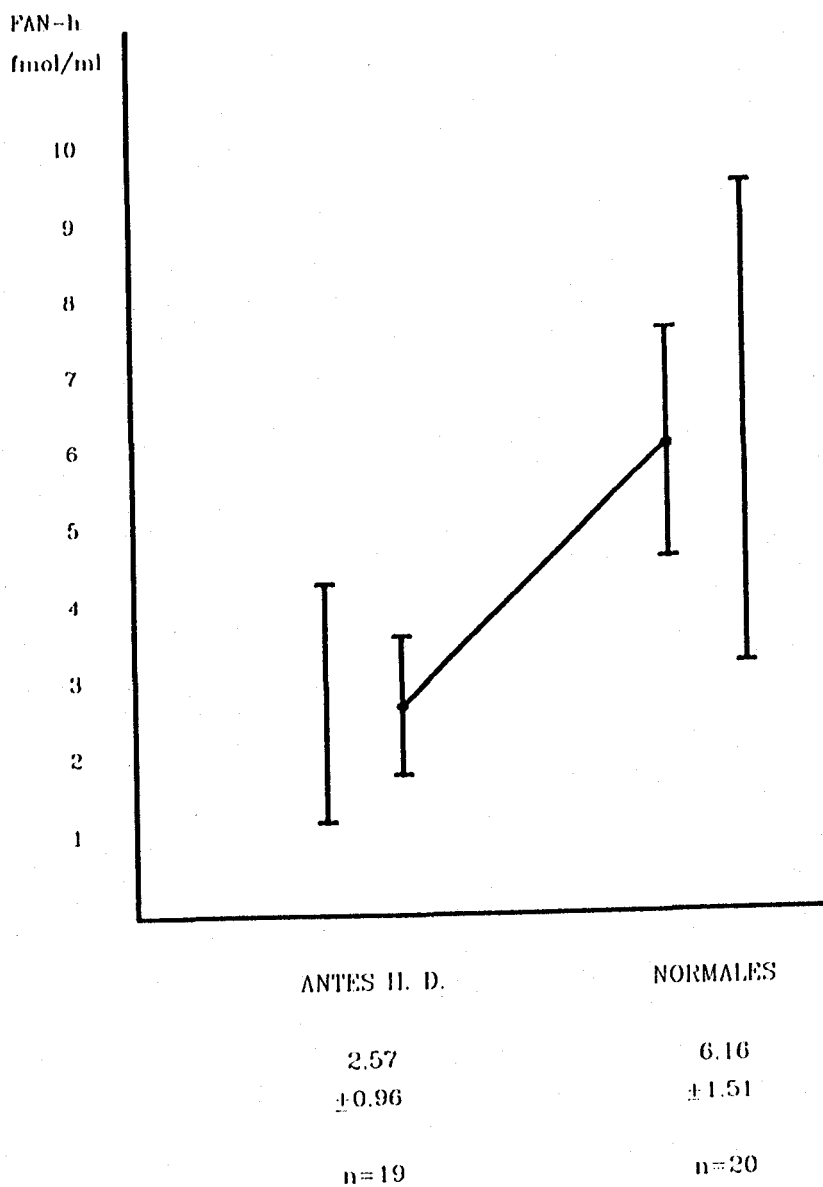
5.57
±2.41

n=40

n=41

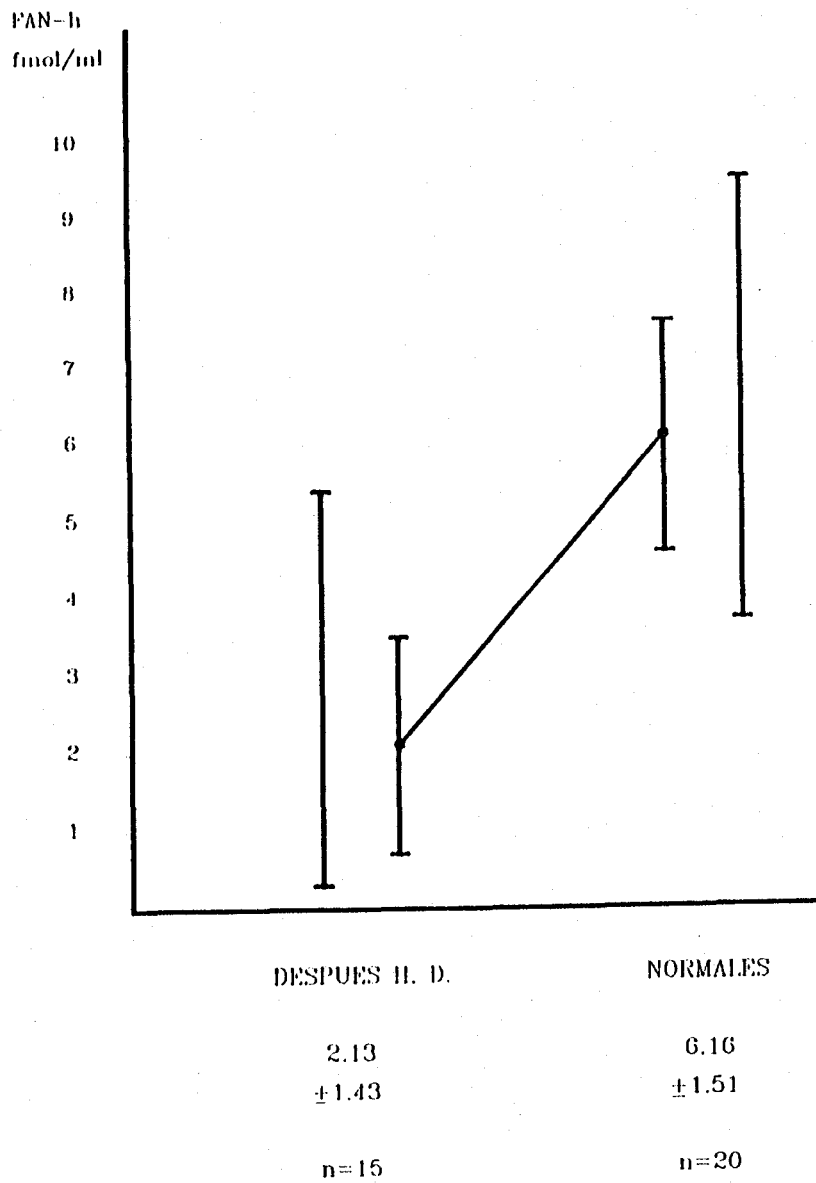
p<0.001

COMPARACION DE LOS VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL, ANTES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 3)



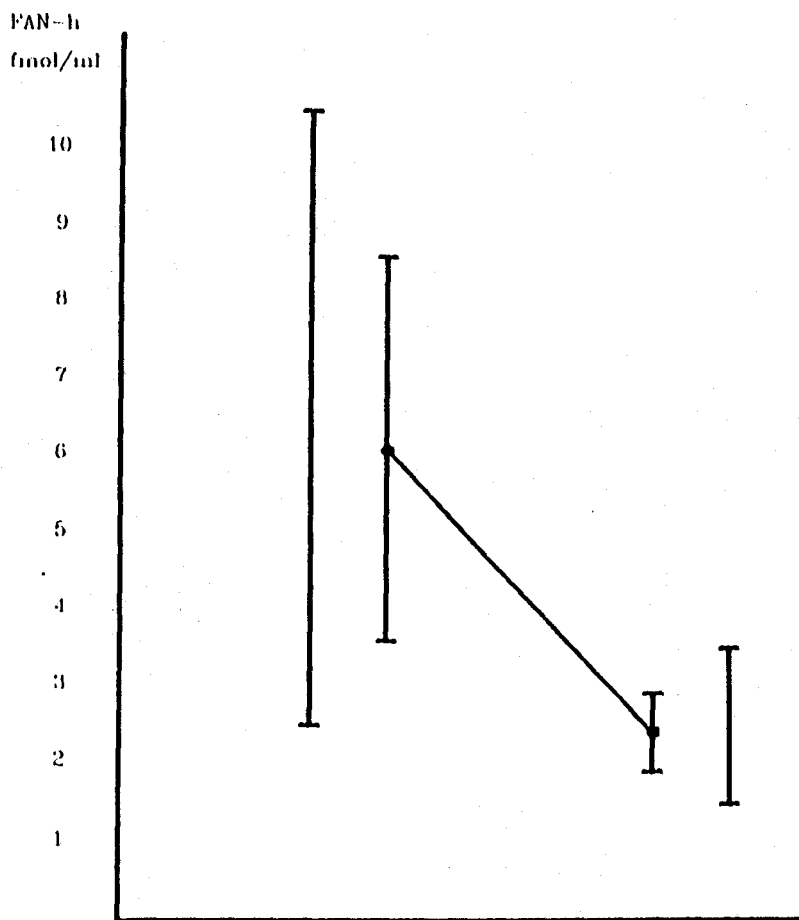
$p < 0.001$

**COMPARACION DE LOS VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL, DESPUES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 3)**



$p < 0.001$

COMPARACION DE LOS VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
 ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
 Y LA POBLACION NORMAL, ANTES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)



ANTES H. D.

NORMALES

6.11
±2.50

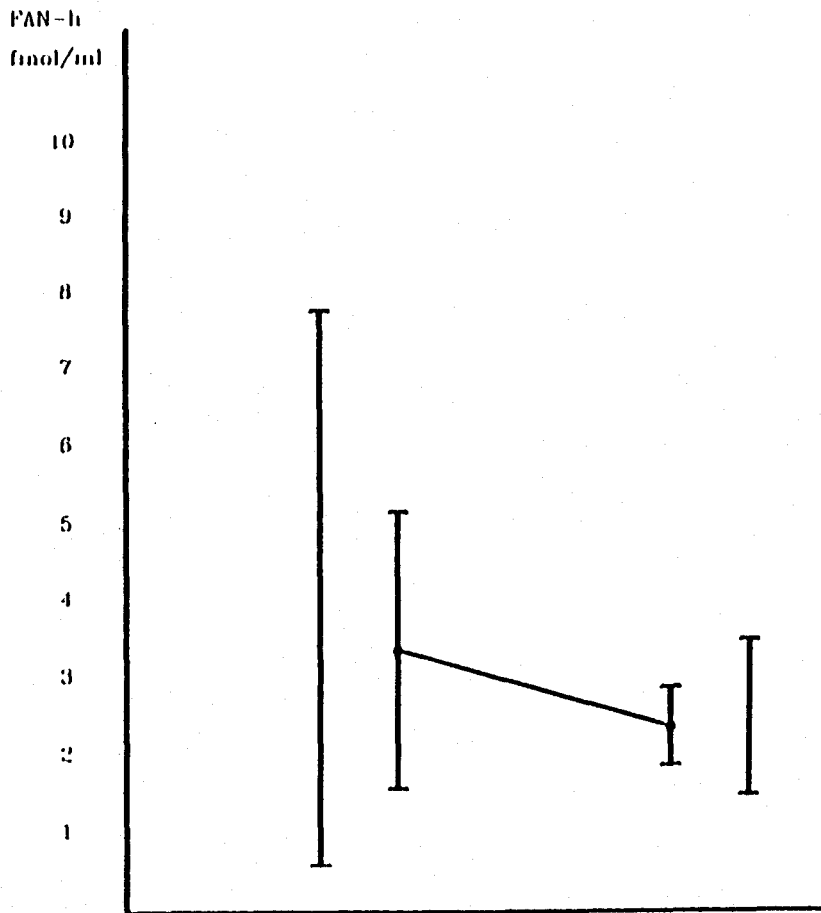
2.48
±0.58

n=20

n=20

p<0.001

**COMPARACION DE LOS VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
ENTRE LOS PACIENTES EN INSUFICIENCIA RENAL
Y LA POBLACION NORMAL, DESPUES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)**



DESPUES H. D.

NORMALES

3.39

2.40

± 1.85

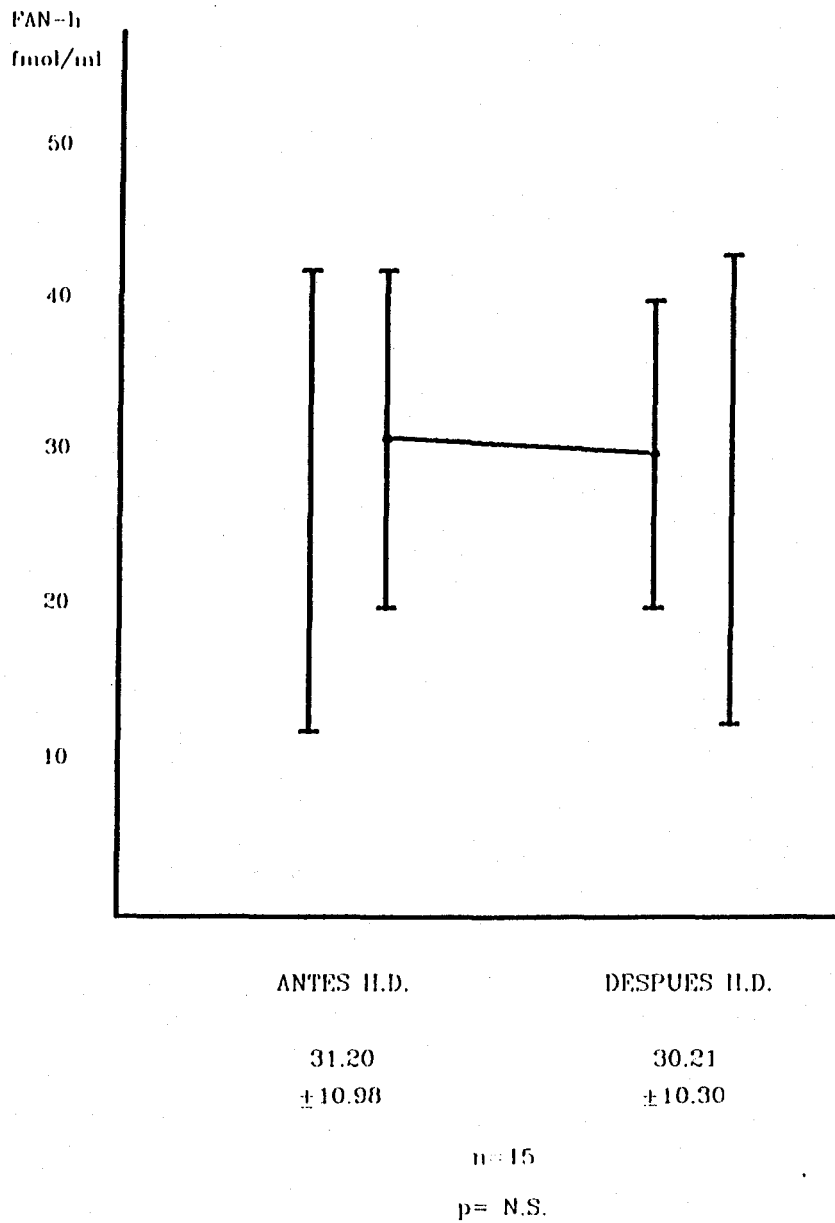
± 0.58

n=20

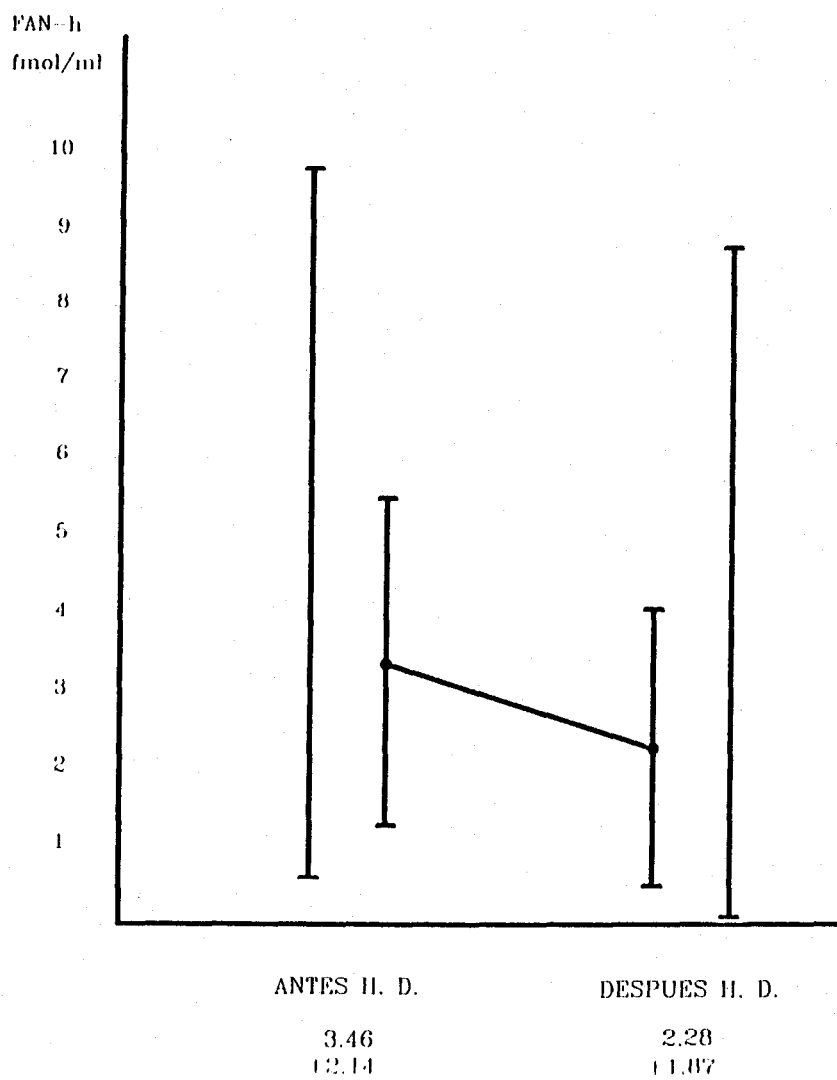
n=20

p<0.05

VARIACION DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO HUMANO DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 1)



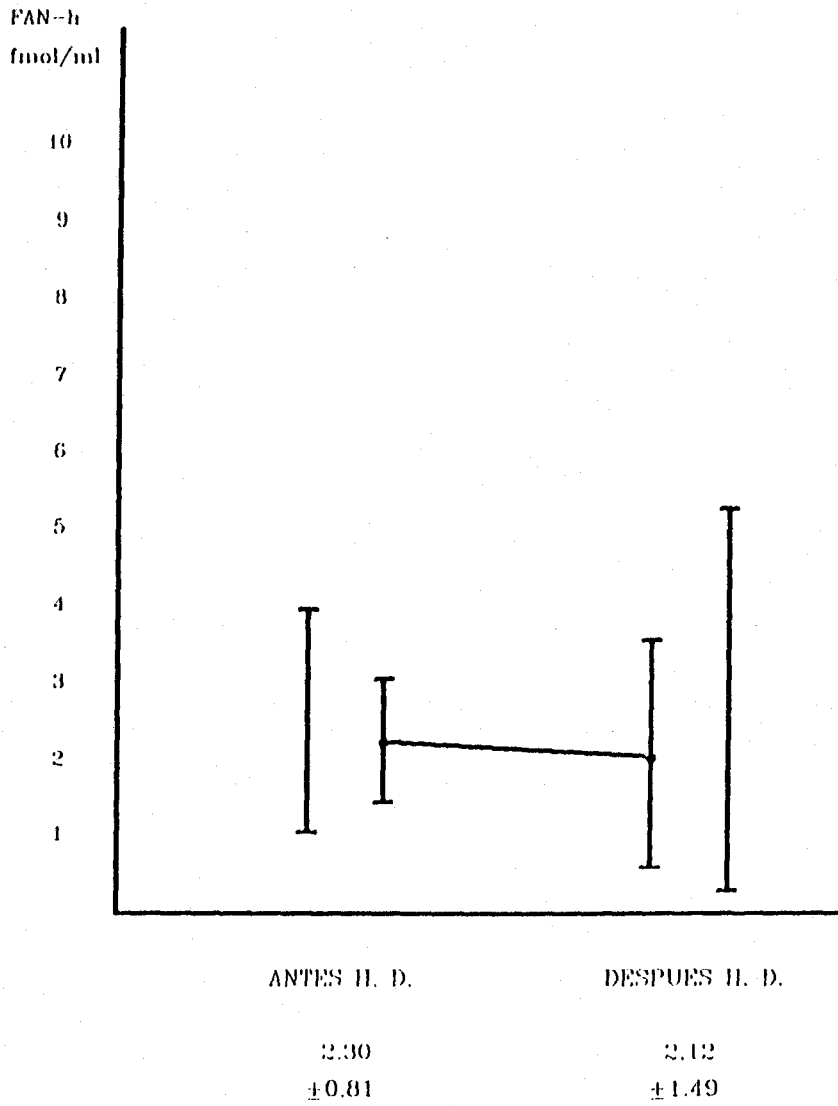
VARIACION DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO HUMANO DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 2)



n=39

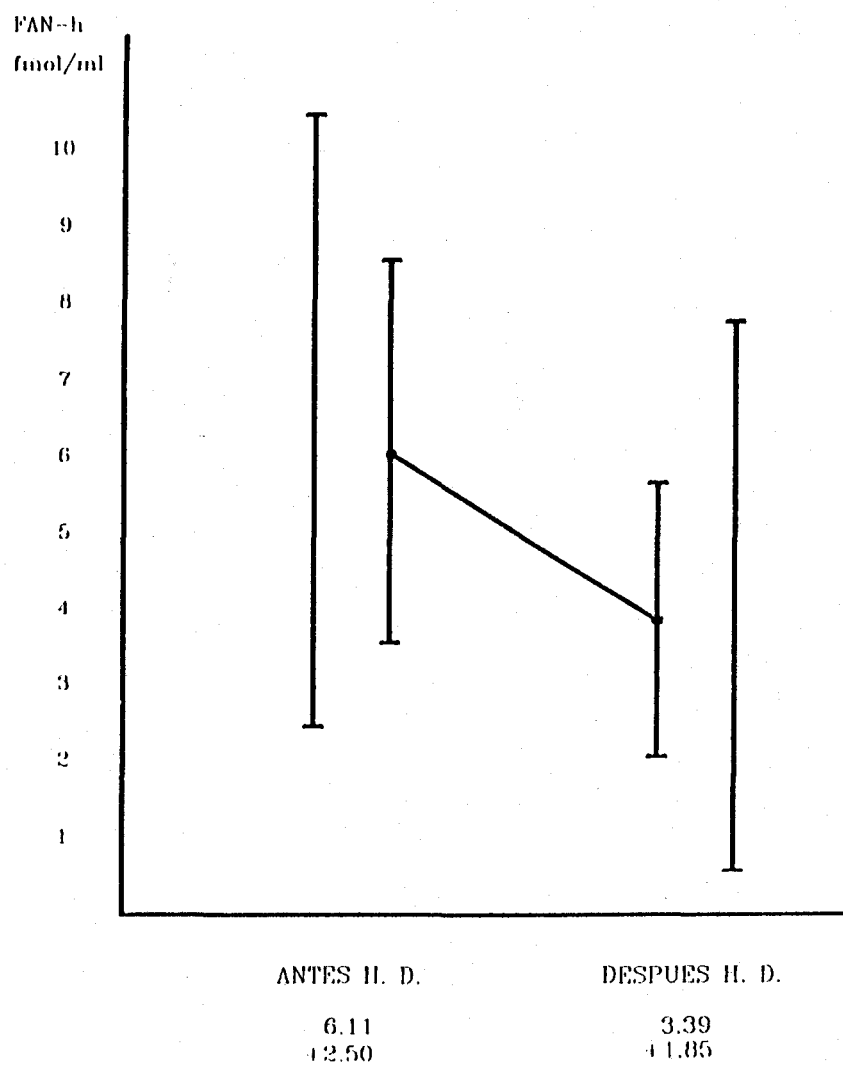
p=N.S.

VARIACION DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO HUMANO
DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 3)



n=14
p=N.S.

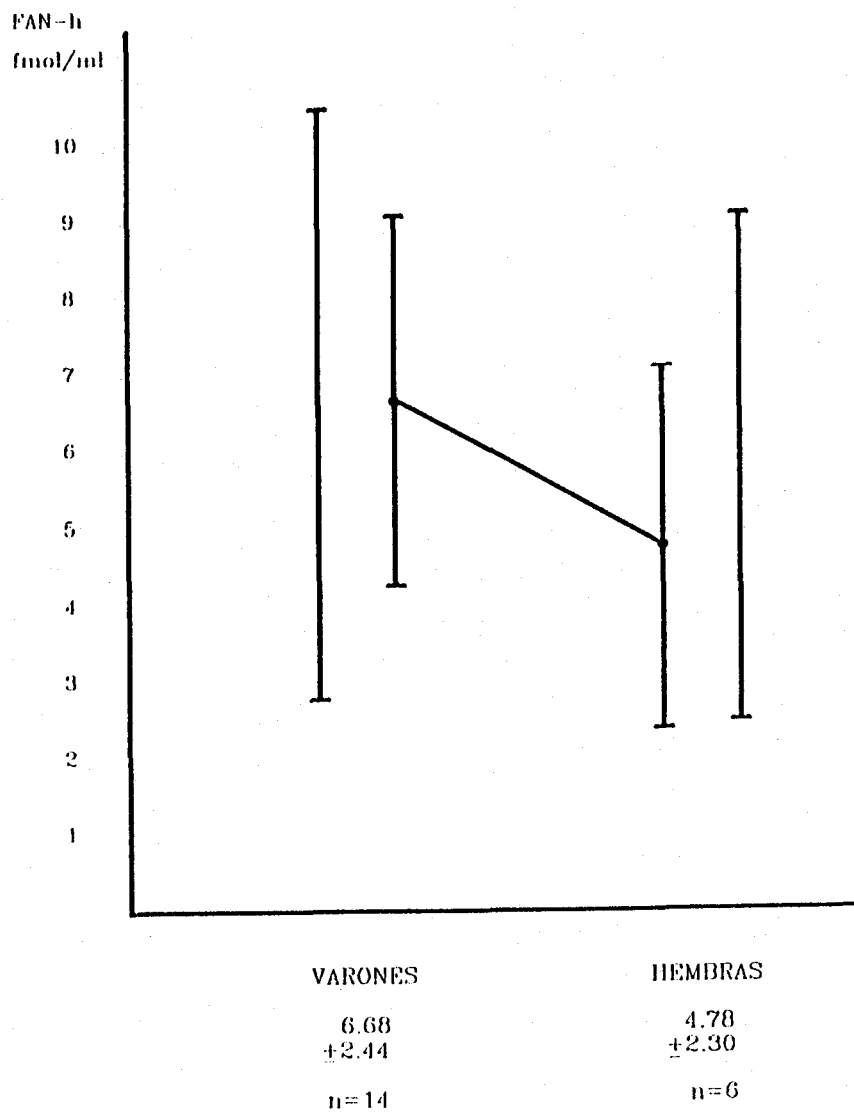
VARIACION DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO HUMANO DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)



n=20

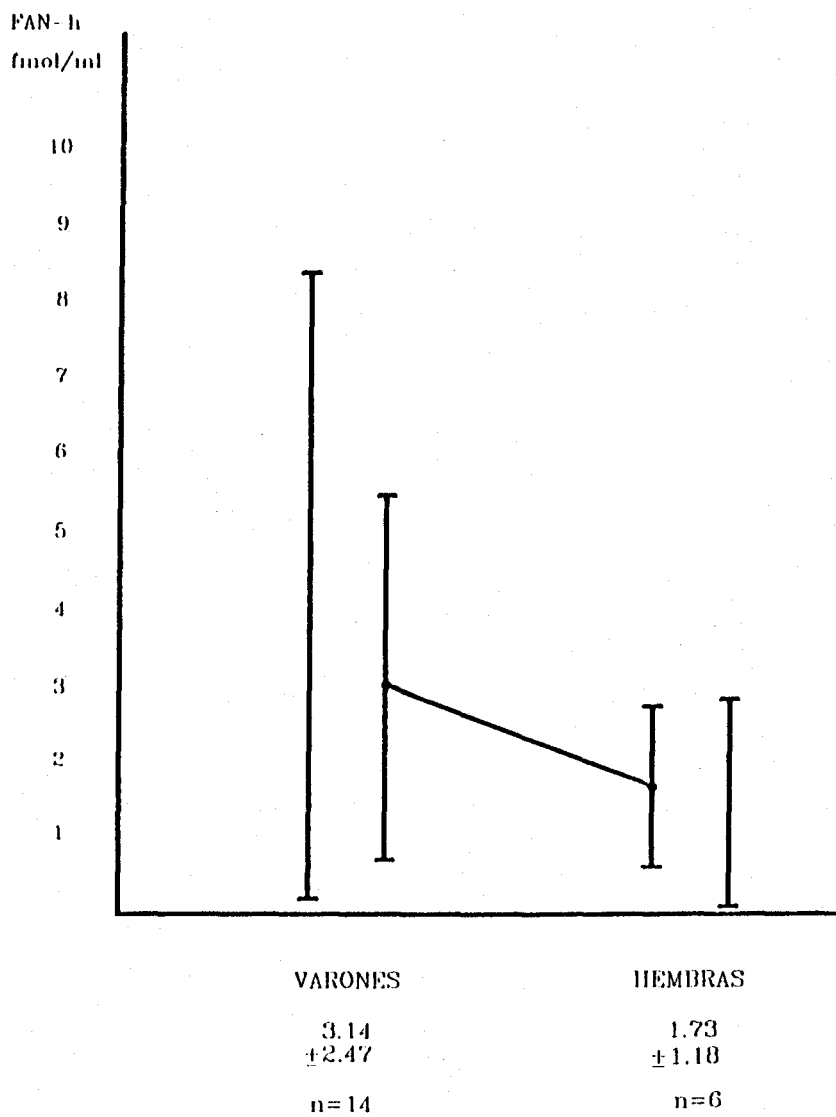
p<0.001

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO EN LOS PACIENTES
EN HEMODIALISIS RESPECTO AL SEXO (ensayo 5)



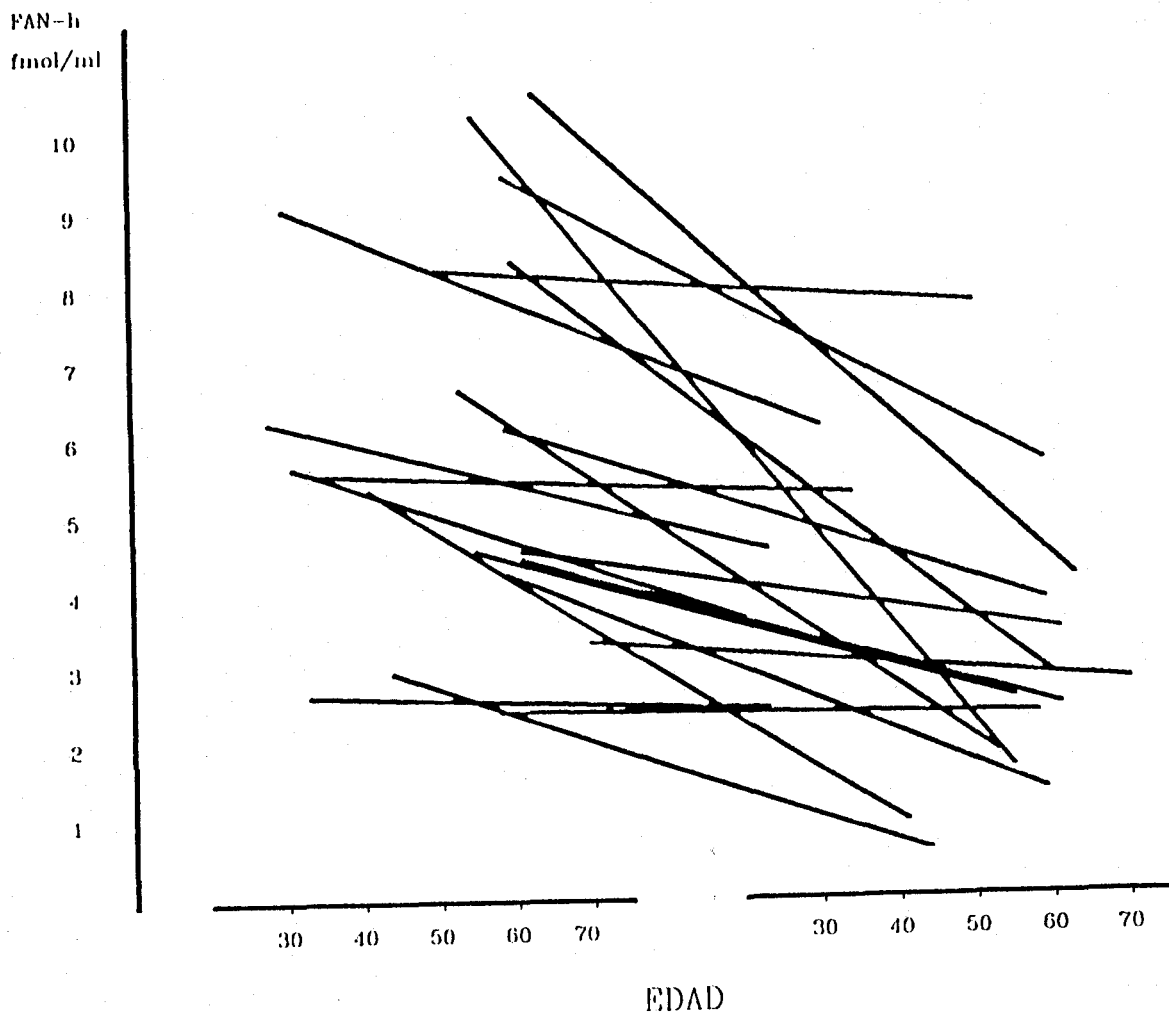
p=N.S.

VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE LA HEMODIALISIS RESPECTO AL SEXO (ensayo 5)



p N.S.

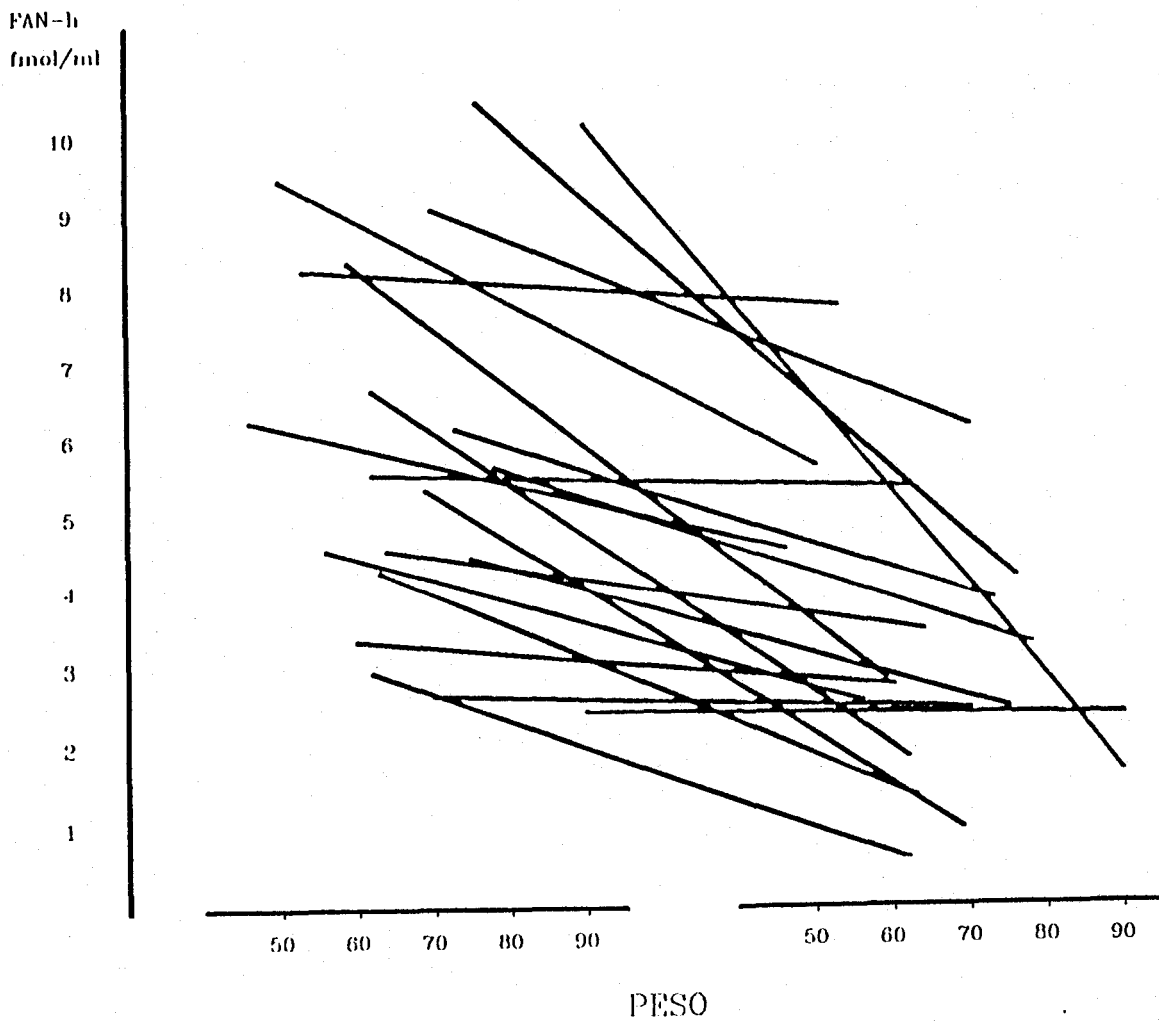
VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA EDAD.
 VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
 LA HEMODIALISIS RESPECTO A LA EDAD (ensayo 5)



Edad: 50.2 ± 12.9	n=20
FAN(A): 6.11 ± 2.51	r=N.S.
FAN(D): 3.39 ± 1.85	r=N.S.
FAN(V): 2.72 ± 2.23	r=N.S.

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
RESPECTO AL PESO.

VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO AL PESO (ensayo 5)



Peso: 67.400 ± 10.855

n=20

FAN(A): 6.11 ± 2.51

r=N.S.

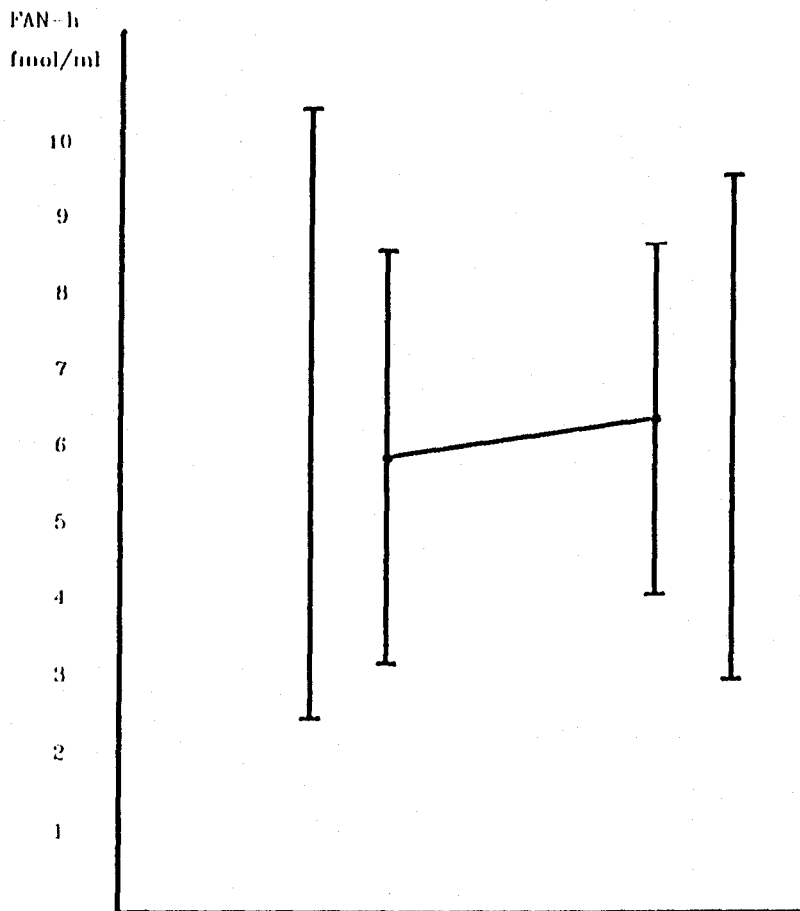
FAN(D): 3.39 ± 1.85

r=N.S.

FAN(V): 2.72 ± 2.23

r=N.S.

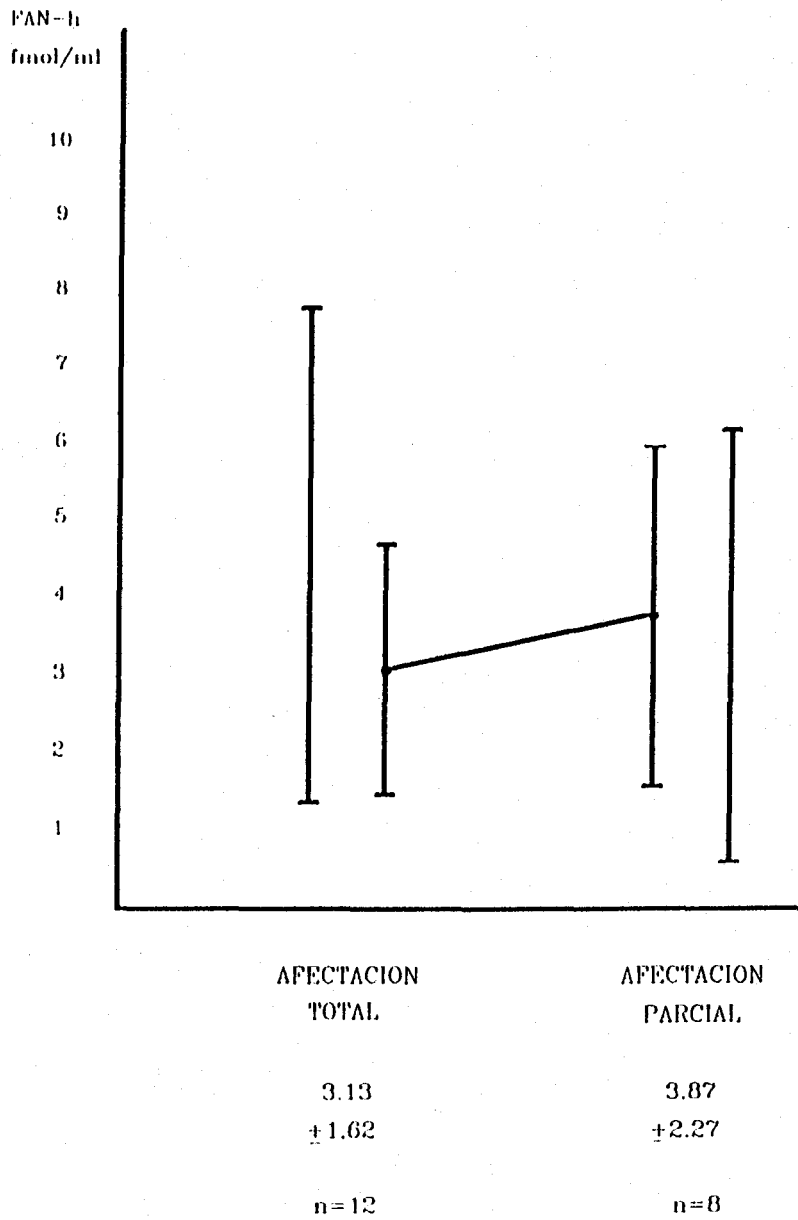
VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA AFECTACION DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO, ANTES DE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)



AFECTACION TOTAL	AFECTACION PARCIAL
5.96	6.39
±2.70	±2.27
n=12	n=8

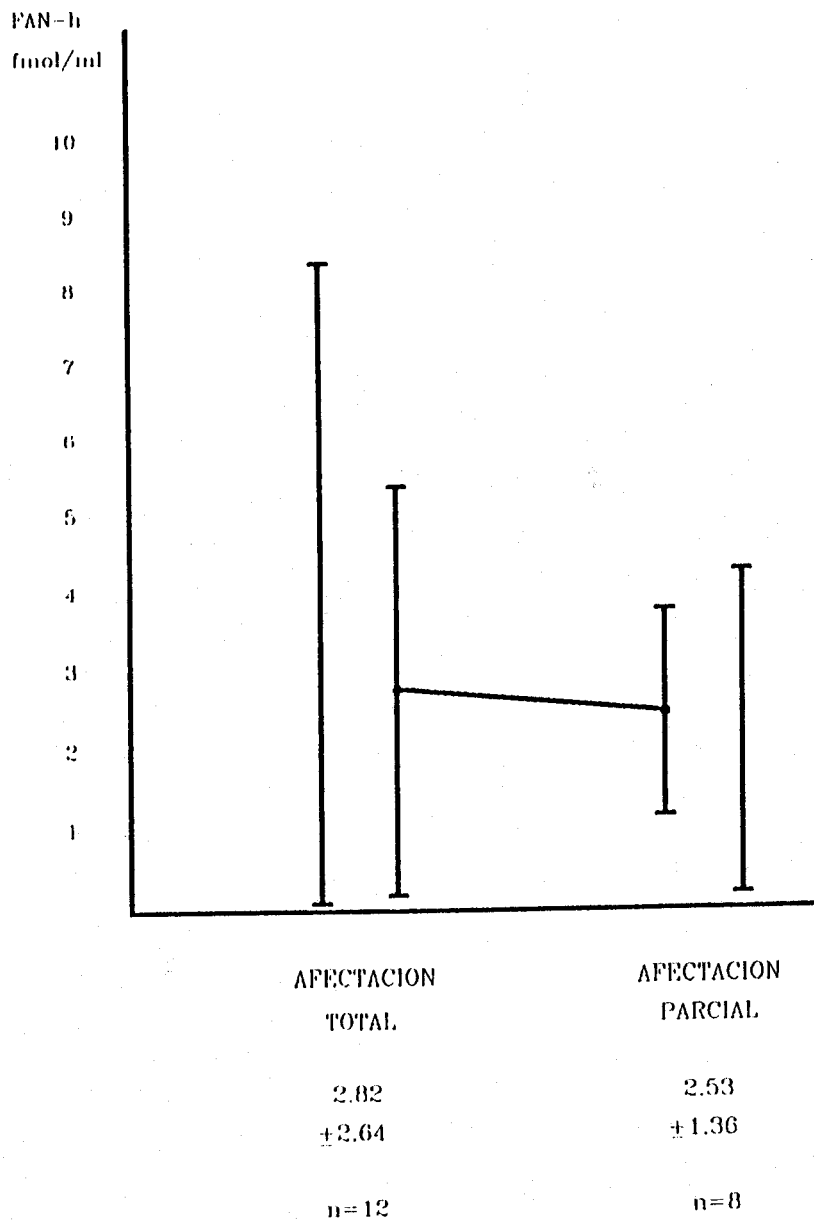
p=N.S.

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA AFECTACION
 DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO, DESPUES DE LA HEMODIALISIS
 (ensayo 5)



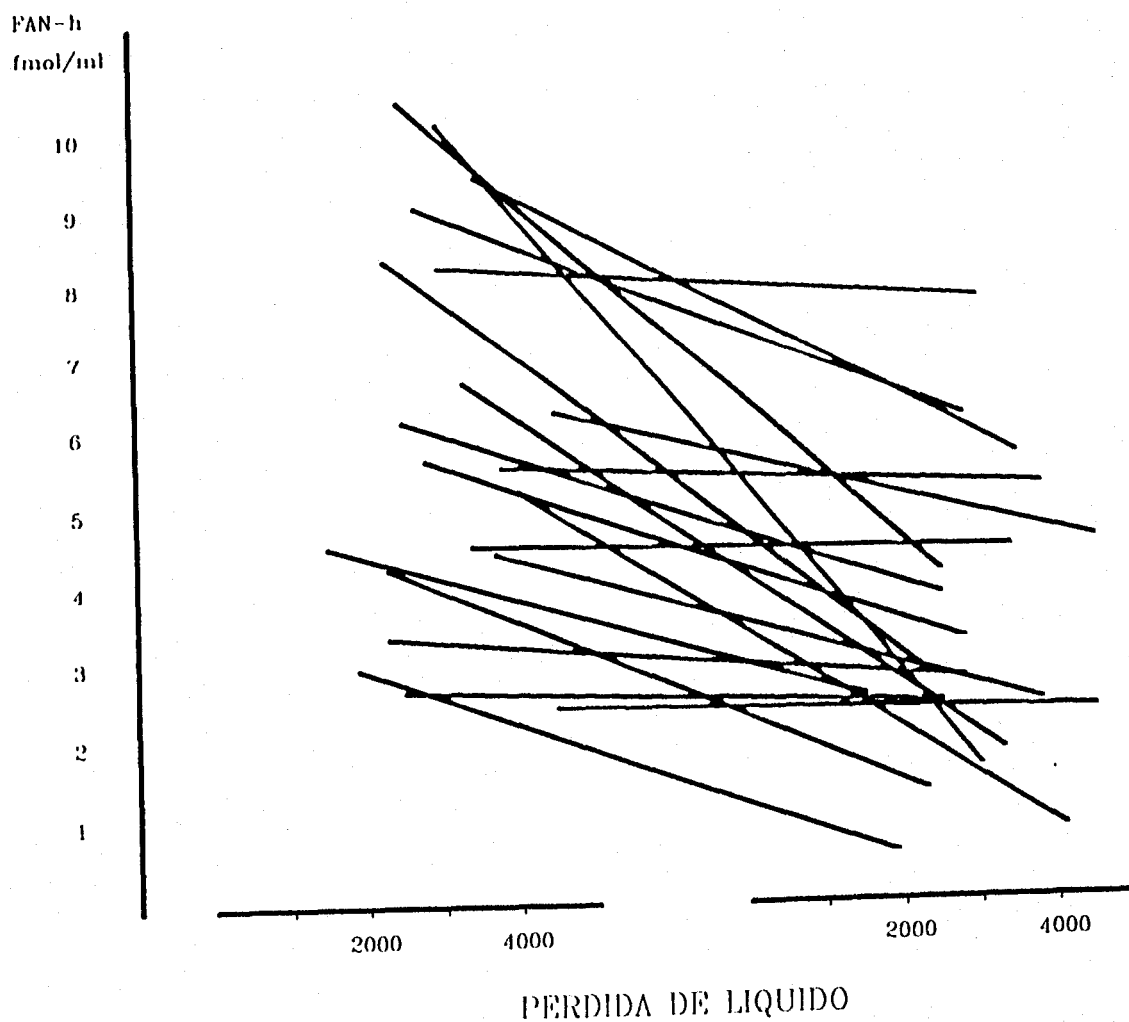
p. N.S.

VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
 LA HEMODIALISIS RESPECTO A LA AFECTACION DEL
 SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (ensayo 5)



p=N.S.

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
 PERDIDA DE LIQUIDO DURANTE LA HEMODIALISIS.
 VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO
 A LA PERDIDA DE LIQUIDO DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)



Perd. liquido : 3000 ± 825.26

n=20

FAN(A): 6.11 ± 2.51

r=N.S.

FAN(D): 3.39 ± 1.85

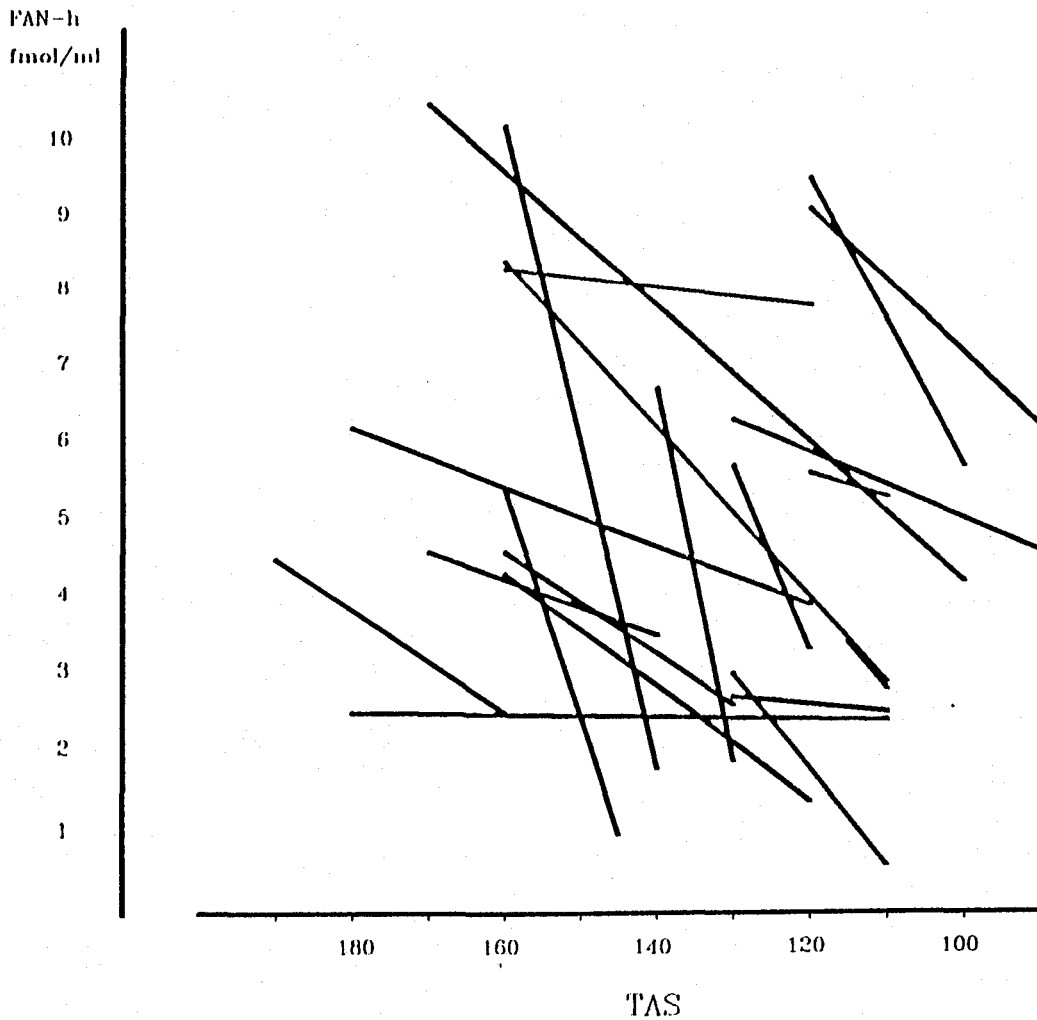
r=N.S.

FAN(V): 2.72 ± 2.23

r=N.S.

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
TENSION ARTERIAL SISTOLICA.

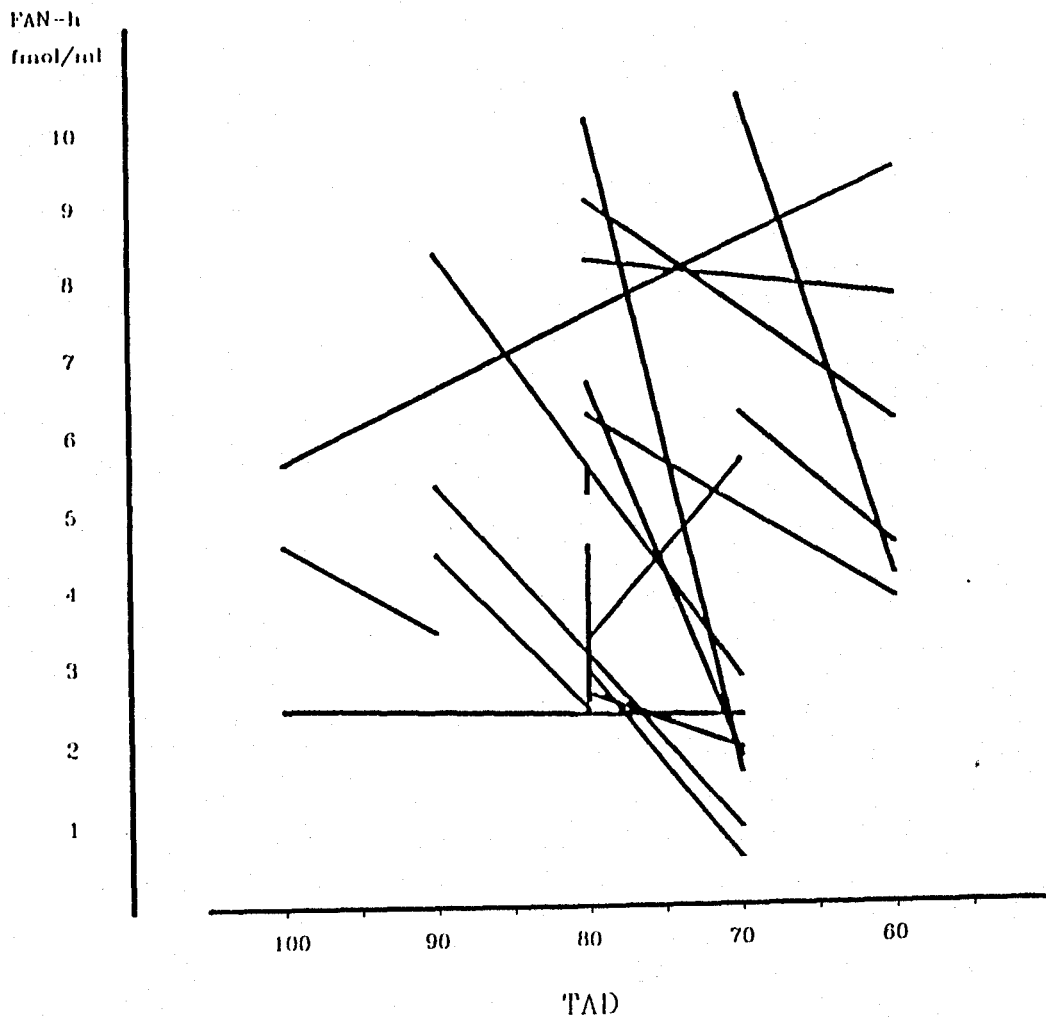
VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO, RESPECTO
A LAS VARIACIONES DE TENSION ARTERIAL SISTOLICA
DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)



TAS(A): 149.250 ± 23.411	n=20	r=N.S.
FAN(A): 6.11 ± 2.51		
TAS(D): 118.250 ± 18.301	n=20	r=N.S.
FAN(D): 3.39 ± 1.85		
TAS(V): 31 ± 19.510	n=20	r=N.S.
FAN(V): 2.72 ± 2.23		

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
TENSION ARTERIAL DIASTOLICA.

VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE LA
HEMODIALISIS RESPECTO A LAS VARIACIONES DE LA TENSION
ARTERIAL DIASTOLICA DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)



TAD(A): 81.500 ± 9.88

n=20 r=N.S.

FAN(A): 6.11 ± 2.51

TAD(D): 70.500 ± 8.87

n=20 r=N.S.

FAN(D): 3.39 ± 1.85

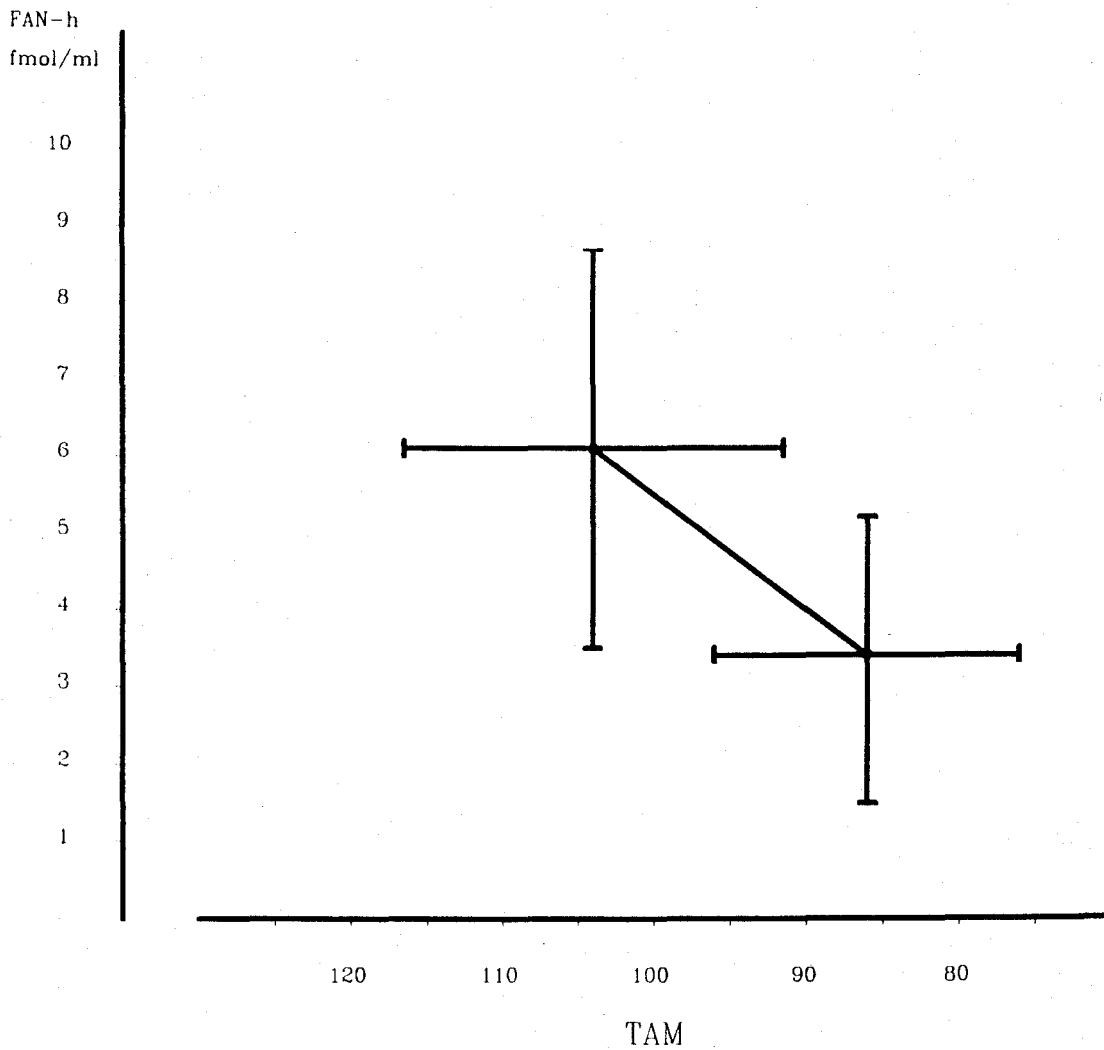
TAD(V): 11 ± 9.68

n=20 r=N.S.

FAN(V): 2.72 ± 2.23

**VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO RESPECTO A LA
TENSION ARTERIAL MEDIA.**

**VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE LA
HEMODIALISIS RESPECTO A LAS VARIACIONES DE LA
TENSION ARTERIAL MEDIA DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)**



TAM(A): 104 ± 12.78

n=20

r=N.S.

FAN(A): 6.11 ± 20.51

TAM(D): 86.42 ± 10.6

n=20

r=N.S.

FAN(D): 3.39 ± 1.85

TAM(V): 17.67 ± 11.71

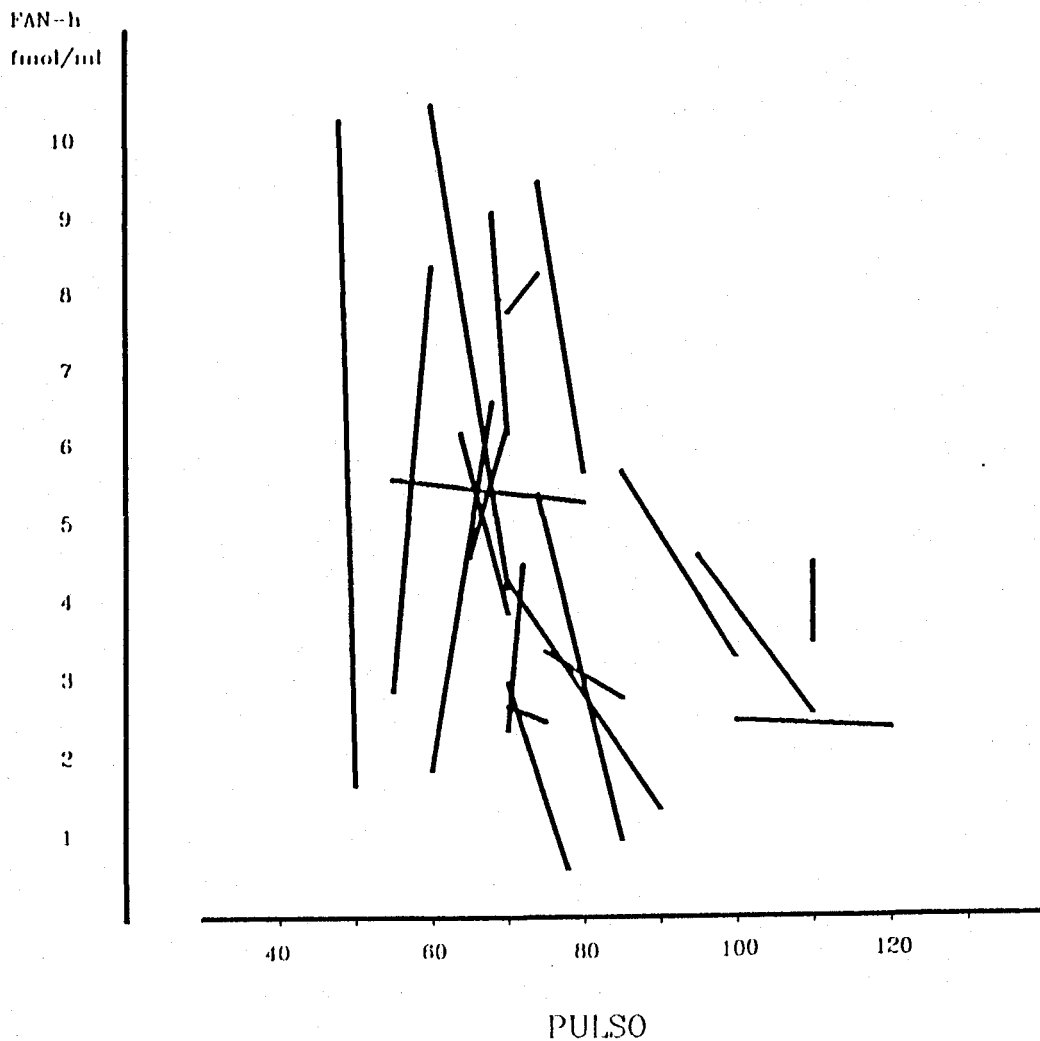
n=20

r=N.S.

FAN(V): 2.72 ± 2.23

VALORES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO
RESPECTO AL PULSO.

VARIACIONES DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO DURANTE
LA HEMODIALISIS RESPECTO A LAS VARIACIONES
DEL PULSO DURANTE LA HEMODIALISIS (ensayo 5)

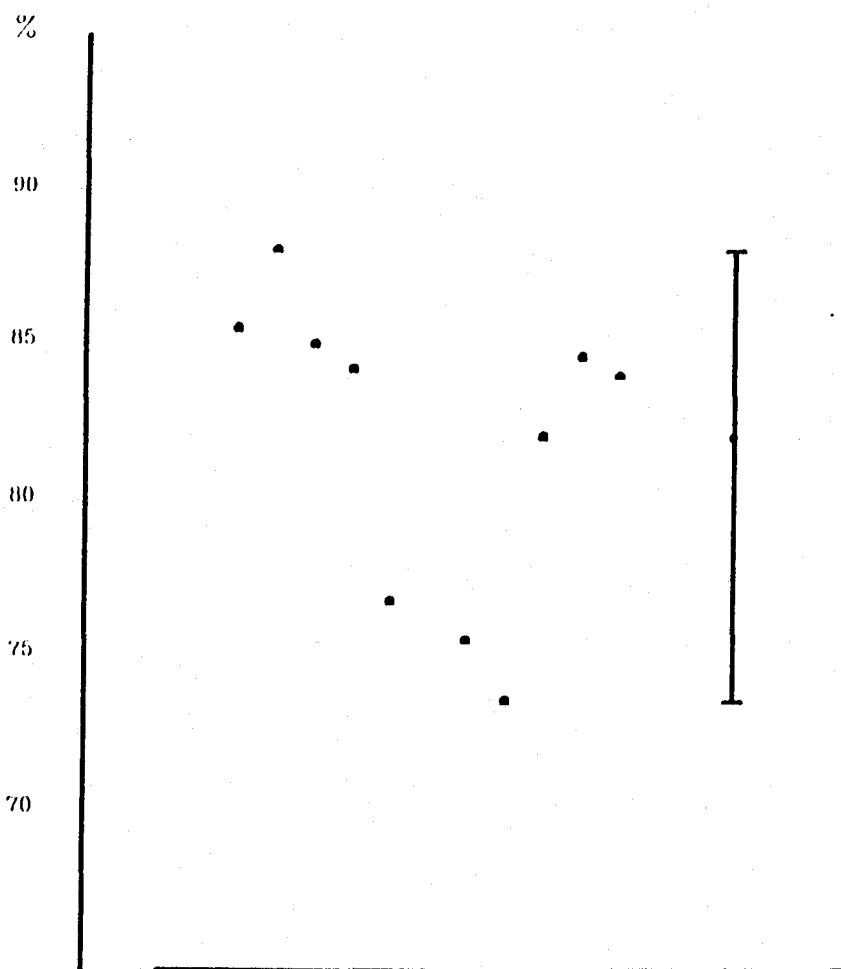


PULSO(A): 73.6 ± 14.9 n=20 r=N.S.
FAN(A): 6.11 ± 20.51

PULSO(D): 79.65 ± 18.67 n=20 r=N.S.
FAN(D): 3.39 ± 1.85

PULSO(V): -6.05 ± 10.17 n=20 r=N.S.
FAN(V): 2.72 ± 2.23

**PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA COLUMNA
DE PURIFICACIÓN SEP-PACK C18**

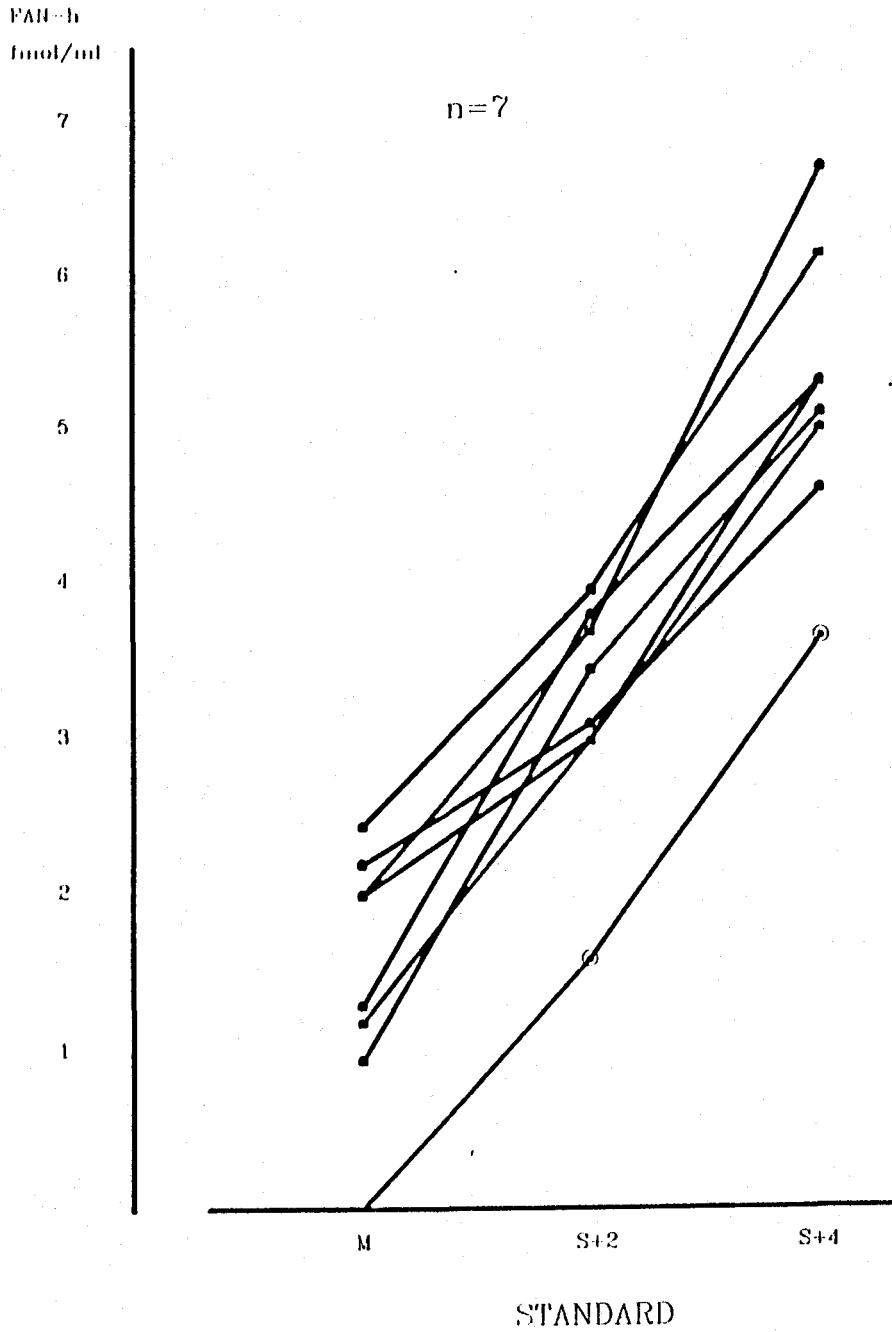


Máximo: 87.73%

Mínimo: 73.74%

Media: 81.90%

**CURVA DEL STANDARD INTERNO DEL MÉTODO DE DETERMINACION
DEL FACTOR ATRIAL NATRIURETICO**



⊙ STANDARD

• MUESTRA + STANDARD

5. DISCUSSION

La revisión de los trabajos publicados sobre la determinación del Factor Atrial Natriurético en diversas situaciones clínicas, muestra una gran disparidad en los **métodos de determinación** de la hormona, tanto en sangre como en tejidos periféricos.

Aunque cada grupo investigador emplea métodos propios de determinación del péptido, encontramos que el empleo de los inhibidores de las proteasas y la conservación a bajas temperaturas, son dos constantes en todos los trabajos presentados, quizás debido a la gran inestabilidad de éste péptido, muy sensible no sólo a la acción de las enzimas proteolíticas, sino también a los cambios de temperatura.

La fase de purificación de las muestras está sujeta a múltiples variaciones dependiendo de cada autor. Así por ejemplo, el uso de una u otra columna de purificación (Sphadex G-75, columnas de purificación de Amersham o Sep-Pack C-18), (55, 121), el empleo de unos u otros reactivos químicos, la evaporación y/o liofilización y el procurar trabajar durante el mayor tiempo posible a bajas temperaturas va a modificar los resultados finales y depende de las circunstancias particulares de los diferentes centros de investigación.

La fase de radioinmunoanálisis depende de cada laboratorio, encontrando en los trabajos publicados desde centros donde purifican y marcan con I radiactivo la hormona para trabajar con ella (122), hasta el empleo de kit comerciales con sus reactivos a pH determinado y la hormona marcada. (155)



En nuestro caso, hemos seguido las indicaciones de los laboratorios Amersham, quienes nos suministraron el kit de determinación por radioinmunoanálisis del Factor Atrial Natriurético, utilizando todos los inhibidores de las proteasas aconsejados y las columnas de purificación Sep-Pack C-18, ya que el empleo de las columnas de purificación de Amersham requieren acidificar la muestra en límites muy estrechos, lo que se escapaba a las posibilidades de nuestros medios.

La liofilización, posterior a la evaporación, fue utilizada por nosotros en el ensayo nº 4 y no encontramos grandes ventajas respecto a las muestras no evaporadas ni liofilizadas, por lo que pensamos, que no es obligado este proceso para conseguir resultados aceptables.

La fase de radioinmunoanálisis que hemos seguido es la aconsejada por el laboratorio Amersham, sin diluir las muestras, ya que en los primeros ensayos con dilución de estas no conseguimos unos resultados tan homogéneos.

No todos los grupos de investigación publican sus controles de seguridad, por lo que a veces, queda la duda sobre la fiabilidad de los resultados presentados y de las conclusiones que de ellos se derivan. Otros autores son menos "rígidos" en los controles, aceptando por ejemplo valores interensayo en la fase RIA superiores al 10 %.

Fruto de nuestros contactos con los Departamentos de Bioquímica de Maternidad de la Paz de Madrid y de Bioquímica de nuestro hospital, hemos establecido tres **controles de seguridad** que afectan tanto a todo

el método, como a los diversos "escalones" en el proceso de determinación del Factor Atrial Natriurético. También hemos determinado el "porcentaje de recuperación" de las columnas de purificación, lo que nos permite saber, aunque los valores numéricos sean los reseñados, que el valor de las muestras es un porcentaje del valor real de las muestras.

La curva estandar del ensayo la hemos realizado con muestras de plasma de sujetos normales, añadiéndoles Factor Atrial Natriurético y siendo sometidas a todos los pasos del proceso de determinación de la hormona.

El margen interensayo que hemos considerado bueno es inferior al 10 % de variación entre los valores de las muestras dobles del mismo sujeto, quedando excluidas las muestras con márgenes interensayo del radioinmunoanálisis superiores al porcentaje indicado.

El tanto por ciento de recuperación de las columnas, determinado con muestras marcadas con I radiactivo, pasadas através de las columnas, ha sido superior al 73 %, los valores obtenidos son alrededor de un 81.9 % de los valores reales.

En el primero de los cinco ensayos realizados, vemos que los valores del Factor Atrial Natriurético obtenido son muy superiores a los otros ensayos, trabajando tanto con pacientes como con población control. Al ser los productos químicos empleados en la fase de purificación diferentes a los demás ensayos, pensamos que ésta sea una

de las causas que influyen en la gran variación de los resultados "absolutos" que encontramos en la literatura.

Creemos que al no tener un método de determinación del Factor Atrial Natriurético igual a todos los grupos de investigación, las cifras presentadas, tanto en enfermos como en normales, no pueden ser coincidentes en valores absolutos, aunque siempre podemos encontrar tendencias y valores relativos coincidentes en muchos trabajos.

En una de las ponencias del Symposium sobre Factor Atrial Natriurético celebrado en Madrid en 1.979, se presentó como valores de normalidad los que oscilan entre 2 y 13 fmol/ml. (123) aunque en otros trabajos publicados nos encontramos con valores de Factor Atrial Natriurético en la **población normal** que oscilan tanto en valores superiores como inferiores a los aceptados y que dependen de cada autor.

Un problema que se nos ha presentado en la revisión de la bibliografía, ha sido el no encontrar una explicación exhaustiva referente a las poblaciones normales escogidas por los investigadores, así como tampoco, referencia expresa a las condiciones de los individuos al ser extraídas las muestras.

La utilización de diversas unidades de medición del Factor Atrial Natriurético en los trabajos publicados: pg/ml, pMol/L, pg/L, fmol/ml, etc., viene a complicar aún más las comparaciones en los resultados finales. y sus equivalencias.

En nuestro trabajo sobre población normal, dependiendo de los diferentes ensayos, los valores expresados en fmol/ml oscilan entre 2.5 ± 0.6 y 39.4 ± 6.4 , siendo el ensayo nº 5 el que muestra una menor dispersión de los resultados, quizás debido al empleo de todos los inhibidores de las proteasas aconsejados, ya que los demás pasos son iguales para los ensayos 2 y 3, y la recogida de muestras en la población normal se hizo en el mismo momento, siendo utilizadas para los diferentes ensayos.

Pensamos, que hasta que se homologue el procedimiento para determinar el Factor Atrial Natriurético y dispongamos de controles incluidos en el Kit de determinación, cada uno de nosotros tendremos que seguir presentando una población control de referencias siendo aconsejable hasta entonces, recabar la mayor información posible sobre dicha población control, utilizada como valor de referencia, ya que aun no conocemos totalmente como incluyen determinadas circunstancias particulares en los diversos sujetos y como consecuencia de esto, alterar los valores de Factor Atrial Natriurético obtenidos.

En la bibliografía revisada por nosotros referente a los pacientes en insuficiencia renal crónica sometidos a hemodialisis, hemos encontrados valores de **Factor Atrial Natriurético antes de la hemodialisis superiores a la población normal (121,124).**

Existen pruebas razonables para pensar que el incremento en los niveles plasmáticos de Factor Atrial Natriurético en los pacientes sometidos a hemodiálisis, es debido al aumento del volumen circulante, que provoca una mayor producción y liberación de la hormona y no a

una disminuida eliminación metabólica, ya que si así fuera, los niveles del péptido deberían aumentar rápidamente después de terminada la sesión de hemodiálisis.

En la diálisis euvolumétrica se ha visto, por los trabajos de Talarschik (125), que los niveles de Factor Atrial Natriurético no se modifican.

Las características de la población en programa de hemodiálisis elegida, no siempre viene bien definida en los trabajos publicados, así como tampoco el margen interdialítico (121,126), lo que nos daría una idea más fiel de la situación crítica de volumen que se encuentran los pacientes.

No podemos afirmar, a la vista de los trabajos consultados y nuestros resultados, que exista un límite en los valores del Factor Atrial Natriurético para ser considerado como valor diagnóstico en el sentido de sobrecarga volumétrica.

En nuestros primeros ensayos, usando algunos de los inhibidores de las proteasas y un margen interdialítico de 48 horas, los resultados obtenidos son inferiores a la población normal, teniendo significación estadística solo los ensayos 2 y 3, por lo que pensamos, que esto sea debido no al margen interdialítico de 48 horas, que aunque es menor que en nuestro último ensayo, los pacientes están sometidos a una cierta sobrecarga volumétrica, sino al hecho de no haber utilizado todos los inhibidores de las proteasas aconsejados.

Las condiciones volumétricas e iónicas fundamentalmente, pueden ser las responsables de unas cifras de Factor Atrial Natriurético, en los pacientes sometidos a hemodialisis, más altas que en los controles.

El ensayo nº 5 muestra valores estadísticamente diferenciables entre los controles y los pacientes en insuficiencia renal antes de la sesión de hemodialisis y en situación crítica de volumen (margen interdialítico de 72 horas), con resultados superiores a la población normal ($p < 0.001$). Siendo el último ensayo concordante con lo publicado por otros autores donde existe valores de Factor Atrial Natriurético estadísticamente superiores en los pacientes que en la población normal (121, 124, 126).

En la mayoría de los pacientes en insuficiencia renal terminal, la **pérdida de líquido** corporal por la hemodialisis, se acompaña de una reducción significativa en los niveles de Factor Atrial Natriurético, hasta llegar a ser equiparables a la población normal, pero no siempre estos resultados son congruentes.

Así Kojima (121) muestra niveles medios posdialíticos normales o discretamente inferiores a la población normal, en cambio Rascher (83) y Anderson (127) han encontrado **niveles posdialíticos del Factor Atrial Natriurético** superiores a los controles.

En nuestro trabajo, dependiendo del método empleado, hemos encontrado la misma disparidad de valores. En los tres primeros ensayos, encontramos niveles posdialíticos de Factor Atrial Natriurético inferiores a la población normal, quizás explicable porque los valores predialíticos

también son inferiores a la normalidad. No ocurre esto en el ensayo nº 5, donde el margen interdialítico es superior (72 horas) y utilizamos todos los inhibidores de las proteasas aconsejados, donde encontramos valores posdialíticos del péptido superiores a la población normal y con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); aunque las cifras obtenidas en la población normal están incluidas en las de los pacientes sometidos a hemodiálisis.

Seguimos pensando que la distensión auricular debida a un aumento de volumen circulante o bien a una mayor sensibilidad de la aurícula a la sobrecarga volumétrica, puede explicar que los niveles hallados de Factor Atrial Natriurético sean superiores en los pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis, que en la población normal, dado el deterioro hemodinámico secundario a su patología de base.

Todos los autores consultados coinciden que durante la hemodiálisis se produce una disminución en los niveles de Factor Atrial Natriurético secundariamente a la disminución de líquido circulante, como consecuencia de la disminución de sobrecarga del sistema vascular y de la presión en la aurícula, principal desencadenante del aumento en los niveles plasmáticos del Factor Atrial Natriurético (83, 121, 126).

En nuestros primeros trabajos encontramos que los niveles de Factor Atrial Natriurético no presentaban una disminución estadísticamente significativa durante la hemodiálisis, aunque los valores predialíticos son superiores a los posdialíticos, como era de esperar en las hemodiálisis con pérdida de volumen, sino que eran similares a las

hemodiálisis euvolumétricas, no congruente con nuestros casos ya que las hemodiálisis son con pérdida de volumen.

Revisamos los resultados en el Servicio de Bioquímica e intentamos conseguir y utilizar todos los inhibidores de las proteasas aconsejados por la firma suministradora del kit, ya que la proteína que estamos determinando es muy inestable y muy sensible a las acciones de las proteasas.

Corregido éste punto pasamos a realizar el 5º ensayo, encontrando, que durante la hemodiálisis, se produce un descenso en los niveles de Factor Atrial Natriurético con diferencias estadísticas muy significativas ($p < 0.001$), resultados coincidentes con los demás autores y grupos de investigación (121, 124, 126, 127).

No tenemos recogido en la bibliografía estudios sobre la influencia del **sexo** en los valores del Factor Atrial Natriurético, pero no parece intervenir en los diferentes resultados, ni en las variaciones del péptido, en los pacientes durante la hemodiálisis.

La población control elegida fue distribuida de forma similar entre varones y hembras, encontrando valores muy similares entre ambos sexos.

Los niveles predialíticos de Factor Atrial Natriurético en los pacientes en insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis, son similares entre los dos sexos, no presentando diferencias estadísticamente significativas.

Las variaciones del Factor Atrial Natriurético con hemodiálisis son también similares en ambos sexos, sin que presenten variaciones estadísticamente significativas.

Si encontramos una "tendencia" a presentar valores del péptido algo menores las mujeres.

En nuestro trabajo, la edad tampoco es un factor determinante en los niveles plasmáticos del Factor Atrial Natriurético, tanto pre como posdiálisis, no habiendo encontrado tampoco diferencias significativas en las modificaciones de los valores del péptido por la diálisis que sean dependientes de la edad.

El rango de edad, en la población normal escogida oscila entre 21 y 48 años y el de los pacientes en hemodiálisis entre 30 y 70 años, quizás debido a lo pequeño de la nuestra, no podemos afirmar que la edad pueda modificar los niveles de Factor Atrial Natriurético, tanto antes como después de la hemodiálisis y tampoco podemos encontrar una tendencia en las modificaciones de los valores del péptido dependiendo de la edad.

El peso ideal de los pacientes en insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis se expresa como "peso seco", es decir, el peso que deberían tener los pacientes si su riñón fuera funcionalmente normal.

No tenemos referencias en la bibliografía respecto al peso seco de los pacientes en insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis y sus influencias sobre el Factor Atrial Natriurético.

En nuestro trabajo no hemos observado que el peso de los pacientes sea un factor determinante en los niveles hormonales prediálisis como posdiálisis, ni en las variaciones sufrida por ésta durante la hemodiálisis.

Insistimos, que el concepto de peso seco no es el peso antes de la hemodiálisis, sino es la situación de peso en que queda un paciente después de la sesión de hemodiálisis, o sea, lo que debe pesar el paciente; la variación durante la hemodiálisis nosotros la expresamos como "pérdida de líquido", que será comentado más adelante.

Ya ha quedado comentado que en las hemodiálisis euvolumétricas, donde no hay pérdida de líquido, los niveles del Factor Atrial Natriurético no se modifican (125). Así, en las hemodiálisis con **pérdida de líquido**, los niveles hormonales descienden, como ya hemos visto más arriba, con una significación estadística.

En nuestro trabajo hemos intentado establecer una relación entre la cantidad de líquido perdido y los niveles y modificaciones del Factor Atrial Natriurético en la hemodiálisis, no encontrando una relación estadísticamente significativa entre los valores hormonales y la pérdida de líquido durante la hemodiálisis.

Así mismo, al estudiar la **ganancia de peso interdialítico**, y establecer una relación con los niveles de la hormona, no hemos encontrado correlación estadísticamente significativa entre éstos y la modificación de peso.

Tampoco hemos encontrado una relación entre la pérdida de líquido durante la hemodiálisis y la variación en los niveles del Factor Atrial Natriurético.

Aunque no encontramos una correlación estadísticamente significativa entre la pérdida de líquido y los niveles de Factor Atrial Natriurético, quizás debido a la pequeña población de nuestro estudio y las altas variaciones individuales, si observamos una tendencia clara a la disminución en los niveles de Factor Atrial Natriurético durante la hemodiálisis con la pérdida de líquido, que además en valores absolutos debe ser significativo, como queda demostrado por las variaciones estadísticamente significativas ($p < 0.001$) del Factor Atrial Natriurético durante la hemodiálisis, lo que no podemos establecer son unos márgenes de niveles determinados para una determinada pérdida de líquido.

Las modificaciones en las cifras de tensión arterial van a provocar respuestas neuro-hormonales inespecíficas que es la activación del **sistema nervioso autónomo**, siendo fundamental en los mecanismos de adaptación del sistema cardiovascular. A nivel vascular, el Factor Atrial Natriurético es un potente vasodilatador, contrarrestando los efectos constrictores de la noradrenalina, como ya quedó explicado antes.

En nuestro trabajo hemos estudiado la población de pacientes en insuficiencia renal con diversa afectación neuropática, comparando los pacientes con afectación total del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático) con los que sufren algún tipo de afectación, simpática o parasimpática o bien sin afectación de su sistema autónomo.

En nuestros resultados no encontramos influencias del estado de afectación neuropática sobre las cifras de Factor Atrial Natriurético en los pacientes sometidos a hemodiálisis, ni sobre las variaciones del mismo durante la hemodiálisis.

Ya quedó comentado más arriba la importancia del Factor Atrial Natriurético en la regulación del agua y la sal por el riñón.

La identificación del Factor Atrial Natriurético como un nuevo sistema hormonal, que puede intervenir en el control de la excreción de agua y sal por riñón, y el descubrimiento de sus potentes efectos vasorrelajantes, sugiere que el Factor Atrial Natriurético podría desempeñar un importante papel en el control de la tensión arterial (128).

Se ha comunicado variaciones en los niveles circulantes del péptido en los trastornos del equilibrio sodio-agua, presentando niveles más elevados del mismo, los pacientes en insuficiencia cardiaca y renal (83, 89, 129).

Queda demostrado que existe un aumento de la presión venosa central en los pacientes hipertensos, aunque su volumen circulante sea

normal o ligeramente inferior a los normotensos (130), quizás debido a una menor distensibilidad del sistema venoso con una desviación de la sangre hacia regiones centrales. Esto puede explicar la estimulación en la excreción hormonal debido a un aumento en la presión intraauricular fundamentalmente derecha.

La población de pacientes incluida en nuestro estudio, muestra cifras altas de **tensión arterial** antes de la hemodiálisis, pudiendo ser considerados como hipertensos, pasando después de la sesión a cifras tensionales normales.

Encontramos, a la luz de nuestros resultados, que el estado de hipertensión predialítica es un factor determinante en la presencia de niveles de Factor Atrial Natriurético superiores en esta fase, como se comprueba al comparar los valores del péptido de los pacientes antes de la hemodiálisis con la población normal.

Así mismo, queda clara la diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.001$) al estudiar la variación del Factor Atrial Natriurético tras la hemodiálisis.

Intentamos encontrar una relación individual entre el descenso de la tensión arterial durante la hemodiálisis y la disminución de los niveles de Factor Atrial Natriurético no hallándola, quizás debido al escaso número de pacientes del estudio.

Al observar las variaciones de la tensión arterial y del Factor Atrial Natriurético durante la hemodiálisis, observamos una tendencia de

"disminución" tanto en las cifras de tensión arterial como del Factor Atrial Natriurético.

Queda claramente demostrado, que antes de la hemodiálisis, tanto las cifras de tensión arterial como de Factor Atrial Natriurético son muy superiores a las presentadas después de la sesión de hemodiálisis, con una disminución importante en los valores expresados.

También hemos estudiado el factor **pulso**, otro de los mecanismos implicados en el control de las modificaciones de la tensión arterial.

Respecto a la relación del pulso con las cifras de Factor Atrial Natriurético no hemos encontrado referencias en la bibliografía consultada.

En nuestro trabajo hemos encontrado que antes de la hemodiálisis los pacientes suelen presentar cifras de pulso inferiores a las recogidas tras la sesión pudiendo estar relacionado con el estado volumétrico en ambas fases. No habiendo encontrado una relación estadísticamente significativa individual entre el pulso y el Factor Atrial Natriurético antes ni después de la hemodiálisis. Tampoco hemos encontrado una tendencia a subir de forma uniforme las cifras de pulso durante la hemodiálisis en relación con las variaciones de la hormona.

6. CONCLUSIONES

1. La puesta a punto en las técnicas de determinación del Factor Atrial Natriurético en nuestro medio ha puesto de manifiesto la gran dificultad existente en su determinación y las grandes diferencias en los resultados obtenidos, dependiendo del proceso seguido. Debido a éstas circunstancias hemos obtenido valores de normalidad que han oscilado entre 2.5 y 39.4 fmol/ml.
2. A la vista de los distintos ensayos realizados podemos concluir que es absolutamente imprescindible utilizar el mayor número de inhibidores de proteasas para impedir que el péptido sea destruido y así obtener resultados fiables.
3. El rango de normalidad final del Factor Atrial Natriurético en la población control de nuestro estudio es de 2.48 ± 0.58 fmol/ml.
4. Los niveles plasmáticos de Factor Atrial Natriurético presentan un incremento estadísticamente significativo en los pacientes con insuficiencia renal terminal en estado predialítico respecto a la población control.
5. Los valores de Factor Atrial Natriurético durante la diálisis presentan un descenso estadísticamente significativo.
6. El descenso del Factor Atrial Natriurético tras la diálisis se aproxima a los controles, pero persiste un incremento estadísticamente significativo respecto a los mismos.

7. El peso seco o ideal del paciente en insuficiencia renal terminal no influye en los niveles de Factor Atrial Natriurético en nuestro estudio.
8. La pérdida de líquido corporal por la hemodiálisis parece ser un factor determinante en el descenso significativo del Factor Atrial Natriurético.
9. No hemos podido establecer sin embargo una relación estadísticamente significativa entre la cantidad de líquido perdido por la diálisis y los niveles de Factor Atrial Natriurético.
10. Tanto los niveles de Factor Atrial Natriurético como las variaciones de éste presentan valores similares, sin diferencias estadísticas en ambos sexos, aunque con una tendencia a ser inferiores en las mujeres.
11. La edad, tanto en la población normal como en los pacientes con insuficiencia renal terminal, no parece influir en los valores plasmáticos de Factor Atrial Natriurético, no existiendo correlación individual entre estas variables.
12. La tensión arterial sistólica, diastólica y media sufre un descenso importante tras la diálisis, paralela al descenso del Factor Atrial Natriurético, pero no hemos podido establecer una relación significativa entre ambos valores.

13. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grado de afectación del sistema nerviosos autónomo y los niveles plasmáticos de Factor Atrial Natriurético.
14. No podemos afirmar que exista un límite en los niveles del Factor Atrial Natriurético para ser considerado como valor diagnóstico en el sentido de sobrecarga volumétrica.

El Factor Atrial Natriurético es uno de los péptidos que en muy pocos años ha generado una gran producción científica, así como el interés de múltiples centros de investigación. El conocimiento de esta hormona que convierte al corazón en una "glándula endocrina" ha justificado nuestro interés. Aunque aún no tenemos datos concluyentes sobre muchas de las incógnitas que se nos presentan, creemos que merece la pena continuar nuestros trabajos por la gran importancia que puede tener como factor regulador de volumen, conocimiento de estados patológicos y utilidad farmacológica.

7. RESUMEN

Aunque desde hace mucho tiempo se ha venido especulando sobre la posible influencia del corazón en la regulación del volumen circulante, no fue hasta que se postuló la existencia de un "tercer factor" u hormona natriurética, capaz de explicar satisfactoriamente la homeostasis hidrosalina.

El descubrimiento de gránulos en los cardiocitos auriculares de rata y las modificaciones en su número dependiendo del grado de sobrecarga hidrosalina convirtió al corazón en un órgano, no sólo capaz de bombear sangre, sino también con capacidad para regular el balance extracelular de líquidos, el balance electrolítico y la presión sanguínea por sus efectos endocrinos.

Dado el gran interés que ha despertado el descubrimiento de esta hormona nos hemos propuesto poner en marcha una técnica de determinación del Factor Atrial Natriurético en nuestro medio, establecer los valores de normalidad en una población normal y estudiar las variaciones del péptido en situación crítica de volumen no inducida por nosotros.

Para nuestro trabajo escogimos una población de 48 pacientes en insuficiencia renal terminal en programa de hemodiálisis con márgenes interdialíticos de 48 y 72 horas y una población control de 50 sujetos sanos.

Hemos realizado cinco ensayos diferentes siguiendo las indicaciones de los laboratorios Amersham, suministradores del kit, practicando diversas modificaciones en la recogida de las muestras,

purificación de éstas, almacenaje y determinación por radioinmunoanálisis.

Concluimos pues, afirmando que es posible la determinación plasmática del Factor Atrial Natriurético en nuestro medio, y que los pacientes en insuficiencia renal terminal muestran niveles predialíticos del péptido muy superiores a la población normal; así mismo encontramos que los valores de Factor Atrial Natriurético son mucho más altos antes que después de la sesión de hemodiálisis.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- AYMAN. D.
Hereditary in Arterioles (Essential) Hypertension: A clinical study of blood pressure of 1524 members of 277 families.
Arch. Intern. Med., 53: 792-799. 1934.

- 2.- STAMLER. J., BERKSOM, D.M., DYER, A., LEPPER, M.H., LINDBERG, H.A., PAUL, O., MCKEAN, H., RHOMBERG, P., SCHOENBERG, J.A., SHEKELLE, R.B., STAMLER, R.
Relationship of multiple variables to blood pressure.
Symp Specialists, Miami. 307-352. 1975.

- 3.- GOMEZ-MARTINO, J.R.
Factores ambientales. Su influencia en la HTA.
En hipertensión arterial (Ruilope L.M. Coord).
Editorial IDEPSA, MADRID. 22-36. 1989.

- 4.- MIRANDA, B., RUILOPE, L.M., RODICIO, J.L.
Fisiopatología de la hipertensión arterial. Últimas aportaciones.
Tiempo Médico. Anuario 88: 191-199. 1988.

- 5.- LUQUE-OTERO, M.
Factores inmunológicos en la hipertensión arterial esencial.
Med. Clin., 84: 570-571. 1985.

- 6.- FALKNER, B., ONESTI, G., HAYES, P.
Hipertension in the young the sud.
En gone and straton (Onesti, G., Kim, K.E. Dirs)
Nueva York., 78-84. 1981.

- 7.- ANONIMO
La hipertensión arterial en España. Compendio de trabajos
epidemiológicos sobre la hipertensión arterial.
Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial.
Madrid. 1984.

- 8.- LAUGTOR, H.G.. WATSON, R.L.
Electrolytes and hypertension. Epidemiology and control of
hypertension.
Hypertension. 119-146. 1975.

- 9.- KAPLAN, N.M.
Clinical complications of oral contraceptives.
Arch. Int. Med. 20: 197-214. 1975.

- 10.- KARINEL, B., BRAND, N., SKINNER, J.J., DAWBER, T.R.,
Mc. NAMARA, P.M.
The relation of adiposity to blood pressure and development
of hypertension.
Ann. Int. Med. 67: 48-59. 1967.

- 11.- Mc MAHON, S.W., MACDONALD, G.J., BERNSTEIN, L., ADREWS. G., BLACKET, R.B.
Comparación entre la reducción de peso y el Metoprotol en el tratamiento de la hipertensión en pacientes jóvenes con sobrepeso.
Lancet (Ed.Esp.) 7: 244-247. 1985.
- 12.- POTTER, J.F., BEERVERA, A.G.
Pressor effect of alcohol in hypertension.
Lancet I: 119. 1984
- 13.- MC CARRON, D.A., MORRIS, C.D. COLE, C.
Dietary calcium in human hypertension.
Science. 267-269. 1982
- 14.- MR. GREGOR., S.A., SAGNELLA, G.A., MARKANDU, N.D., SINGER, D.R.J.
Ensayo a doble ciego de tres niveles de ingesta sódica y efectos a largo plazo de la restricción en la hipertensión esencial.
Lancet, II: 1244 - 1247. 1.989.
- 15.- MAXWELL, M.H. WAKS, A.V.
Cationes e hipertensión: sodio, potasio, calcio, magnesio.
Clínicas médicas de norteamérica. Ed. Interamericana. Mc. Graw-Hill, 5: 899-918. 1987.

- 16.- THIND, G.S., FISHER, G.M.
Plasma cadmium and zinc in human hypertension.
Cli. Sc. Mol. Med. 51: 483-486. 1976.
- 17.- CHEN, W.T., BRACE, R.A., SCOTT, J.B., ANDERSSON,
D.R., HADDY, F.J.
The mechanism of the vasodilatador action of potasium.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140: 820-825. 1972.
- 18.- HADDY, F.J., PANMANI, M., CLOUGH, T., HUBT, S.
Role of the humoral Na-K pump inhibitor in experimental
low hypertension.
Life Sci. 30: 571-576. 1982.
- 19.- DE LA SIERRA, A., COCA, A., AGUILERA, M.T., VIVES,
J.L., INGELMO, M., URBANO-MARQUEZ, A.
Actividad de los sistemas de transporte transmembranoso
de Na (ATPasa Na^+-K^+ . contranporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^+$.
cotranporte Na^+-Li^+ , difusión pasiva) en la hipertensión
arterial esencial.
Med. Clin. 90: 180-189. 1988.
- 20.- COCA, A., DE LA SIERRA, A., URBANO-MARQUEZ, A.
Intercambio iónico transmembranario e hipertensión arterial
esencial.
Tiempos Médicos, marzo, 31-46, 1989.

- 21.- JANSSEN, W.M.T., DE LONG, P.E., VAN DER HEM, G.K.,
DE ZEEUW, D.
Efecto del péptido natriurético auricular humano sobre la
presión sanguínea después de la depresión de sodio en la
hipertensión esencial.
Brit. Med. J. (Ed. Esp.) II: 66-75. 1987.
- 22.- MILNER, M., HEAGERTY, A.M., BING, R.F., THURSTON, H.,
SWALES, J.D.,
Changes in leucocyte sodium transport in normotensive
relatives of hipertensive subjects. Dissociation from blood
pressure.
Hypertension. 6: 369 - 373. 1984
- 23.- KELLY, R.A., O'HARA, D.S., CANESSA, M.L.
Charaterization of digitalis-like factors in human plasma.
J. Biol Chem 260: 11396-11405. 1985.
- 24.- FERNANDEZ-ANDRADE, C.M.
Hipertensión arterial. Aspectos actuales de una vieja
enfermedad.
MTA. Med. Int. 2: 393-480. 1984.
- 25.- MIRANDA B., OLIET, A.
Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial.
En Hipertensión Arterial. (Ruilope L.M. dir.)
Idepsa, Madrid. 14-21. 1989.

- 26.- FOLKOW, B.
El "factor estructural" en la hipertensión.
Hypertension Yearbook 1986. International Society of
Hypertension.
London Gower Academic Journal: 57-78. 1986.
- 27.- GUTHRIE, G.P. JR., KOTCHEN, TH.A.
Neuroanatomía funcional de las vías centrales que controlan
la circulación.
En Hipertensión y cerebro. Ed. Espaxs. Barcelona. 1981.
- 28.- GABRIEL, R., FERNANDEZ-CRUZ, A.
Conceptos actuales en la fisiopatología de la hipertensión
arterial.
Tiempos Médicos. Anuario 87. 253-258. 1987.
- 29.- WIELD, D., KLOET, R.
Propiomelanocortina y homeostasis de la conducta.
Hospital Practice (Ed. Esp.). 4: 59-66. 1989.
- 30.- GAULEN, D., HERMAN, K., BAYER, E., UNGER, T.H.,
LANG, R.E.
Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in
hypertensive rats.
Science 221: 869-871. 1983.

- 31.- GAUTED, D., UNGER, T.H., LANG, R.E.
Fisiopatología de la hipertensión y el papel del cerebro.
Hypertension Yearbook. International Society of
Hypertension. London, 60. Academic Journal. 79-92. 1987.
- 32.- REGOLI Y BARABE, J.
Pharmacology of bradykinin and related kinins.
Pharmacol. Rev. 32: 1-46. 1980.
- 33.- WONG,P., TALAMO, R.C., WILIAMS, G.H., COLEMAN.
R.W.
Response of the kallikrein-kinin and renin-angiotensin system
to saline infusions and upright posture.
J. Clin. Invest. 55: 691-698.1975.
- 34.- TINGERSTEDT, R., BERGMAN, P.G.
Niese und kreislan
Skan. Arch. Physiol. 8: 223-271. 1988.
- 35.- SKEGGS,L.T., KAHN, J.R., LENTZ, K.E., SHUMWAY, N.P.
The preparation, purification and aminoacid sequence of a
polypeptide renin substrate.
J. Exp. Med. 106: 439-453. 1957.

- 36.- RITTEL, W., ISELIN, B., KAPPELER, H., RINIKER, B.,
SCHWYZER, R.
Synthesis eines hoch wirksamen Hypertensin II-amids (1-
asparagynyl-1-arginyl-a-valyl-a-tyrosyl-a-isolencil-1-histidyl-
a-prolyl-1-phenylalanin).
Helv. Chim. Act. 40: 614-624. 1957.
- 37.- PETERS, J.P.
Body Water.
Charles C. Thomas. Springfield. 1935.
- 38.- GAUER, D.H., HENRY, J.P.
Circulations basis of fluid volumen control.
Pyhs. Rev. 43: 423-481. 1963.
- 39.- HENRY, J.R., GAVER, O.H., REEVES, J.L.
Evidence of the atrial localization of receptors influencing
urine flow.
Circ. Res. 4: 91-94. 1956.
- 40.- DE WARDENER, H.E., HILLS, I.H., CLAPHAM, W.F.,
HAYTAS, C.J.
Studies on the effluent mechanism of the sodium diuresis
which follows the administration of intravenous saline in the
dog.
Clin. Sci. 21: 249-253. 1961.

- 41.- JAMIESON, J.D., PALADE, G.E.
Specific granules in atrial muscle cells.
J. Cell. Biol. 23: 151-172. 1964.
- 42.- HUET, M., CANTIN, M.
Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells.
II. Characterization of the protein content of specific granules.
Lab. Invest. 30: 154-159. 1974.
- 43.- MARIE, J.P., GUILLEMOT, H., HATT, P.Y.
Le degré de granulations des cardiocytes auriculaires. Etude planimétrique au cours de différents apports d'eau sodium chez le rat.
Pathol. Biol. 24: 549-554. 1976.
- 44.- DE BOLD A.J.
Heart atrial granularity. Effect of changes in water and electrolyte balance.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161: 508-512. 1979.
- 45.- THIBAUT, G., GARCIA, R., CANTIN, M., GENEST, J.
ANF. Characterization and partial purification.
Hypertension, 5: 75-79. 1983.

- 46.- SOUNENBERG H., VERESS A.T., BORENSTEIN H.B., DE BOLD A.J.
Rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial extract in rats.
Physiologist. 23: 3 1980.
- 47.- DE BOLD A.J.
Tissue fraction studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 60: 324-330. 1982.
- 48.- GARCIA R., CANTIN M., THIBAUT G., ONG H., GENEST J.
Relationship of specific granules to the natriuretic and diuretic activity of rat atrial.
Experientia 38: 1071-1073. 1982.
- 49.- CURIE M.G., GELLER D.M., COLE B.R., BOYLAN J.G., YUSHENG W., HOLMBERG S.W., NEEDLEMAN P.
Bioactive cardiac substances: Potent vasorelaxant activity in mammalian atrial.
Science 221: 71-73. 1983.
- 50.- GARCIA R., THIBAUT G., CANTIN M., GENEST J.
Effect of purified atrial natriuretic factor on rat and rabbit vascular strips and vascular beds.
Am. J. Physiol. 347: 234-239. 1984.

- 51.- MAAK T., MARION D.N., CAMARGO M.J.F.
Effects of auriculin (atrial natiuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs.
Am. J. Med. 77: 1069-1075. 1984.
- 52.- CURIE M.G., GELLER D.M., COLE B.R.
Purification and sequence analysis of bioactive atrial pepetides (atriopeptins).
Science 223: 67-69. 1984.
- 53.- DE BOLD A.J., FLYNN T.G.,
Cardionatrin I. A novel heart peptide with potent diuretic and natiuretic properties.
Life Sci. 33: 297-302. 1983.
- 54.- NAPIER M.A., DEWEY R.S., ALBERSCHOMBERG G., BENNET G.D., RODKEY J.A., MARSH E.A., WHINNEREY M., SEYMOUR A.A., BLAINE E.H.
Isolation and sequence determination of pepetide components of atrial natiuretic factor.
Biochem. Biophys Res. Comm. 120: 981-988. 1984.
- 55.- THIBAUT G., GARCIA R., SEIDAH N.G., JAZURE C., CANTIN M., CHRETIEN M., GENEST J.
Purification of three atrial natiuretic factors and their aminoacid composition.
FEBS Lett. 164: 286-290. 1983.

- 56.- THIBAUT G., GARCIA R., CANTIN M., GENEST J., JAZURE C., SEIDAN N.G., CHEETIEN M.
Primary structure of high form of rat atrial natriuretic factor.
FEBS Lett. 167: 352-356. 1984.
- 57.- BALLERMANN B.J., BRENNER B.M.
Biologically active atrial peptides. Perspectives.
J. Clin Invest. 76: 2041-2056. 1985.
- 58.- FLYNN T.G., DE BOLD M.L., DE BOLD A.J.
The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 117: 859-865. 1983.
- 59.- SHEIDA, N.G., LAZURE C., CHRETIEN M., THIBAUT G., GRACIA R., CANTIN M., GENEST J., NUTT R.F., BRADY S.F., LYLE T.A., PALEVEDA W.J., COLTON C.D., CICCARONE T.M., VEBER D.F.
Amino acid sequence of homologous rat atrial peptides: natriuretic activity of nature and synthetic form.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2640-2644. 1984.
- 60.- ATLAS S.A., KLEINERT H.D., CAMARGO M.J.F., JANUSZEWICZ A., SEALY J.E., LARAGH J.H., SCHILING J.W., LEWICKI J.A., JOHNSON L.K., MAACK T.
Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide.
Nature. 309: 717-719. 1984.

- 61.- THIBAUT G., CARRIER F., GARCIA R., GUTKOWSWA J., SHEIDAH N.G., CHRETIEN M., CANTIN M., GENEST J.
The human atrial natriuretic factor (hANF): Purification and primary structure.
Clin. Invest. Med. 7 (suppl. 2): 59. 1984.
- 62.- KANAWA K., MATSUO H.
Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha h-ANF).
Biochem. Biophys. Res. Comm. 118: 131-139. 1984.
- 63.- WEI Y., GELLER D., SIEGEL N.R., NEEDLEMAN P.
Identification of the cardiac and circulating form of atriopeptin in rabbit.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 138: 1263-1268. 1986.
- 64.- SHEIDAM C.E.
The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by a complementary DNA clone.
Science. 225: 324-326. 1984.
- 65.- DE LEAN A., THIBAUT G., SHEIDAH N.G.
Structure-activity relationships of ANF III. Correlation of receptor affinity with relative potency on aldosterone production in zona glomerulosa cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 132: 360-367. 1985.

- 66.- SCHILLER P.W., NAZIAK L., NGUYEN T.
Synthesis and psicological activity of a linear fragment of
the ANF.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31: 1056. 1985.
- 67.- NAPIER M.A., ARCURI K.E., VANDLEN R.L.
Binding and interanalization of Atrial Natiuretic Factor by
high affinity receptor in A-10 smooth muscle cells.
Arch. Biochem. Biophys. 248: 516-522. 1986.
- 68.- KANGAWA K., TAWARAGI H., OIKAWA S.
Identification of rat gamma ANP and characterization of the
cDNA enconding its precursor.
Nature: 312: 152. 1984.
- 69.- TRIPPODO N.C., JANUSZEWICZ A., PEGRAM B.J., COLE
F.E., KOHASHI N., KARDON M.B., MAC-PHEE A.A.,
FROHLICH E.D.
Rat platelets activate high molecular weight atrial natiuretic
peptide in vitro.
Hypertension 7: 905-912. 1985.
- 70.- GUTKOWSKA J.
Radioinmunoassay for atrial natiuretic factor.
Ncl. Med. Biol. 14: 323-331. 1987.

- 71.- THEISS G., MORICH A.J.F., NEUSER D., SCHORER W.,
STACH J.P., WOHLFEIL S.
H-ANP is the only form of circulating ANP in humans.
FEBS Lett. 218: 159-162.
- 72.- LAROSE P., MELOCHE S., DE SONICH P., DE LEAN A.,
ONG H.
Radioimmunoassay of atrial natriuretic factor: human plasma
levels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 130: 553-558. 1985.
- 73.- KENNETH G.L.
Physiology and pathophysiology of atrial peptides.
Am. J. Physiol. 254: E1-E15. 1988.
- 74.- BIANCHI C., GUTWOSKA J., GARCIA R., THIBAUT G.,
GENEST J., CANTIN M.
Radioautographic localization of ¹²⁵I-atrial natriuretic factor
(ANF) in rat tissues.
Histochemistry. 82: 441-452. 1985.
- 75.- MURTHY K.K., THIBAUT G., SCHIFFRIN E.L., GARCIA R.,
CHARTIER L., GUTKOWSKA J., GENEST J., CANTIN M.
Disappearance of atrial natriuretic factor from circulation in
the rat.
Peptides. 7: 241-246. 1986.

- 76.- MURTHY K.K., THIBAUT G., GARCIA R., GUTKOWSKA J.,
GENEST J., CANTON M.
Degradation of atrial natriuretic factor in the rat.
Biochem. J. 240: 461-469. 1987.
- 77.- YANDLE T.G., RICHARDS A.M., NICHOLLS N.G., CUNEO
R., ESPINER E.A., LIVISEG J.H.
Metabolic clearance rate and plasma half-life of alpha human
atrial natriuretic peptide in man.
Life Sci. 38: 1827-1833. 1986.
- 78.- JUPPNER H., BRABANT G., KUPLEINA U., KIRSDUER M.,
KLEIN H., HESCH R.D.
Direct radioimmunoassay for human atrial natriuretic peptide
(h ANP) and its clinical evaluation.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 139: 1215-1223. 1986.
- 79.- FERNANDEZ-CRUZ A., MARCO J., CUADRADO L.M.
Plasma levels of ANP in cirrhotic patients.
Lancet. II: 1439. 1985.
- 80.- OLIVERA A., GUTKOWSKA J., RODRIGUEZ-PUYOL A.
Atrial natriuretic peptide in rats with experimental cirrhosis
of the liver without ascitis.
Endocrinology. 122: 840-860. 1988.

- 81.- TUNNY T.J., HIGGINS B.A., GORDON R.D.
Plasma levels of atrial natriuretic peptide in man in primary aldosteronism in Gordons syndrome and in Bartter's syndrome.
Cli. Exp. Pharmarol. Physiol. 13: 341-345. 1986.
- 82.- CUSSON J.R., GUTKOWSKA J., REY E.
Plasma concentration of atrial natriuretic factor in normal pregnancy.
N. Engl. J. Med. 313: 1230-1231. 1985.
- 83.- RASCHER W., TULASSAY T., LANG R.E.
Atrial natriuretic peptide in plasma of volume-overloaded children with chronic renal failure.
Lancet. II: 303-305. 1985.
- 84.- ZACHARIAN P.K., BURNETT J.C., RITTER S.G., STRONG C.G.
Atrial natriuretic peptide in human essential hypertension.
Mayo Clinic Proc. 62: 782-786. 1987.
- 85.- COGAN E., DEBIEVE M., PHILIPART I.
High plasma levels of atrial natriuretic factor in SIADH.
N. Engl. Med. 314: 1258-1259. 1986.
- 86.- GENEST J.
The atrial natriuretic factor in hypertension.
Mayo Clinic Proc. 63: 514-516. 1988.

- 87.- SCHIFFRING E.L., GUTKOWSKA J., KUCHEL O.
Plasma concentration of atrial natriuretic factor in patient
with paroxysmal atrial tachycardia.
N. Eng. J. Med. 312: 1196. 1985.
- 88.- ESPINER E.A., CROZIER I.G., NICHOLLS M.G., CUNEO R.,
YANDLE T.G., IKRAM H.
Cardiac secretin of atrial natriuretic peptide.
Lancet. II: 398-399. 1985.
- 89.- TIKKANEN J., FYHRQUIST F., METSARIUNE K., LEIDENINS
R.
Plasma atrial natriuretic peptide in cardiac disease and during
infusion in healthy volunteers.
Lancet II: 66-69. 1985.
- 90.- WINQUIST R.J., FAISON E.O., WALDMAN S.A.,
SCHWARTHZ K., MURAD F., RAPOPORT R.M.
ANF elicits and endothelium independent relaxation and
activates particulate guanilate cyclase in vascular smooth
muscle.
Proc. Natl. Acad. Sc. 81: 7661. 1984.
- 91.- HIRATA Y., TOMITA M., TAIXADA S., YOSHIMI H.
Vascular receptro binding activities and cyclic GMP
responses by syntetic human and rat ANP and receptor
down regulation by ANP.
Biochem Biophys. Res. Comm. 128: 538-546. 1985.



- 92.- WINQUIST R.J.
Possible mechanisms underlying the vasorelaxant response
to ANP.
Fed Proc. 45: 2371-2375. 1986.
- 93.- HEALY D.P., FANESTIL D.D.
Location of ANP binding sites within the rat kidney.
Am. J. Physiol. 250: F 573. 1986.
- 94.- VANDLER R.L., ARCURI K.E., HUPE L., KEEGAN R.E.,
NAPIER M.D.
Molecular characteristics of receptors for ANF.
Fed. Proc. 45: 2366-2370. 1986.
- 95.- NAPIER M.A., VANDLER R.L., SCHOMBERG G.A.
Specific membrane receptors for ANF in renal and vascular
tissues.
Proc. Nat. Ad. Sci. 81: 5946. 1984.
- 96.- HIRATA Y., TOMITA M., YOSHIMI H., IKEDA M.
Specific receptor for ANF in cultured vascular smooth
muscle cells of rat aorta.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 125: 562. 1984.
- 97.- HANSELL L., ULFENDAL, H.R.
Atriopeptins and renal cortical papillary blood flow.
Acta Physiol. Scan. 727: 349-357. 1986.

- 98.- HERNANDO N., CAMELO C., TEJEDOR A., FERNANDEZ-CRUZ A., LOPEZ-NOVOA J.L.
Jack of effect of synthetic ANF on rubidium uptake by human erythrocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 130: 1066-1071. 1985.
- 99.- RODRIGUEZ-PUYOL D., ARRIBA G., BLANCHART A.
Jack of a direct regulatory effect of ANF on prostaglandins, and renin release by isolated rat glomeruli.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 138: 496-501. 1986.
- 100.- CAMELO C., FERNANDEZ-CRUZ A., VILLAMEDIANA L.M.
Systemic and regional hemodynamic effects of a syntetic atrial natiuretic factor in consciuns rats.
Cli. Sci. 71: 323-325. 1986.
- 101.- SASAKI A., KIDA O., KANGAWA K., MATSUO M., TANAKA K.
Haemodinamic effects of alpha human atrial natiuretic polypeptide in rats.
Eur. J. Pharmacol. 109: 405-407. 1985.
- 102.- TRIPPODO N.C., COLE F.E., FROCHLIK E.D., MAC PHEE A.A.
ANP decreases circulatory capacitance in arreflexic rats.
Cir. Res. 59: 291-296. 1986.

- 103.- KUCHEL O., DEBINSKI W., RAZZ K.
An emergin relationship between peripheral sympatetic nervous activity and atrial natiuretic factor.
Life. Sci. 40: 1545-1551. 1987.
- 104.- DERAY G., MAISTRE G., LE HOANG P., EURIN J., BAUMELOUB., MASSON F., BETELEM C., LEGRAND J.C., JACOBS C.
Effect of cyclosporine on atrial natiuretic factor in patiens with uveitis.
N. Eng. J. Med. 322-336. 1990.
- 105.- ZPUIN R.A., CONDRA J.H., DIXON R.A.F., SEIDAN N.G., CHRETIEN M., NEMER M., CHAMBERLAND M., DRONIN J.
Molecular cloning and characterization of DNA sequences encodng rat and human atrial natiuretic factors.
Pro. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6325-6329. 1984.
- 106.- CANTIN M., DING J., THIBAUT G., GUTKOWSKA J., SALMI L., GARCIA R., GENEST J.
Immunoreactive atrial natiuretic factor is present in both atrial and ventricles.
Mol. Cell. Endocrinol. 52: 105-113. 1987.
- 107.- TANAKA J., MISOKO K.S., INAGAMI T.
Atrial natiuretic factor in rat hypothalamus, atrial and plasma: determination by specific radioinmunoassay.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 124: 663-668. 1984.

- 108.- STANDAERT D.G., SAPER C.B., RYE D.B., WAINER B.H.
Localization of atrio peptin-like immunoreactivity with choline acetyltransferase and substance P-like immunoreactivity in the pedunculo-pontine and latero-dorsal segmental nuclei in the rat.
Brain. Res. 382: 163-168. 1986.
- 109.- SHIONO S., NAKAO K., MORII N., YAMADA T., ITOH H., SAWAMOTO M., SUGAWARA A., SAITO Y., KATSURA G., IMURA H.
Nature of atrial natriuretic polypeptide in rat brain.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 135: 728-734. 1986.
- 110.- HARTLE D.K., BRODY M.J.
The angiotensin II pressor system of the rat forebrain.
Cir. Res. 54: 355-356. 1984.
- 111.- SAKAMOTO M., NAKAO K., MORII N., SUGAWARA A., YAMADA T., ITOH H., SHIONO S., SAITO Y., IMURA H.
The lung as possible target organ for atrial natriuretic polypeptide secreted from the heart.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 135: 515-520. 1986.
- 112.- GUTWOWSKA J., CANTIN M., GENEST J., SIROIS P.
Release of immunoreactive atrial natriuretic factor from the isolated perfused rat lung.
F.B. 214: 17-20. 1987.

- 113.- MC KENZIE J.C., TAMAKA J., INAGAMI T., MISONO K.S.,
KLEIN R.M.
Alterations in atrial and plasma atrial natriuretic factor (ANF)
development of hypoxia-induced pulmonary hypertension in
the rat.
Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 181: 459-463. 1986.
- 114.- SAMSON V.K.
Dehydration-induced alteration in rat brain vasopressin and
atrial natriuretic factor immunoreactivity.
Endocrinology. 117: 1279-1281. 1985.
- 115.- MC KENZIE J.C., TANAKA I., MISONO K.S., INAGAMI T.
Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in
the kidney adrenal medulla pituitary and atrium of rat.
J. Histochem. Cytochem 33: 828-832. 1985.
- 116.- GUTWOWSKA J., RAEZ K., DEBINSKI W., THIBAUT G.,
GARCIA R., KUCHEL O., CANTIN M., GENEST J.
An atrial natriuretic factor-like activity in rat hypophisys.
Peptides 8: 461-465. 1987.

- 117.- ABOU-SAMURA A.B., CATT K.J., AGUILERA G.
Syntetic atrial natiuretic factors (ANFs) stimulate 3', 5'-
monophosphate production but not hormone release in rat
pituitary cells: peptide contamination with a gonadotropin-
releasing hormone agonist explains luteinizing hormone-
releasing activity of certains ANFs.
Endocrinology. 120: 12-24. 1987.
- 118.- SUGRUE M.F., VIADER M.P.
Syntetic atrial natiuretic factor lowers rabbit intraocular
pressure.
Eur. J. Pharmacol. 130: 349-350. 1986.
- 119.- STEARDO J., NETHANSON J.A.
Brain barrier tissues: end organ for atrioptin.
Science. 235: 470-473. 1987.
- 120.- ONG H., LAZURE C., NGUYEN T.T., MC NICOLL N.,
SEIDAH N., CHRETIEN M., DE JEAN A.
Bovine adrenal chromaffin granules are a size of syntesis of
atrial natiuretic factor.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 147: 957-963. 1987.
- 121.- KOJIMA S., INOUE I., KIMURA., SALTO F., KAWANO Y.,
SATANI M., ITO., TERUO O.
Plasma concentrations of immunorreactive-Atrial Natriuretic
Polypeptide in patiens on hemodialysis.
Nephron. 46: 45-48. 1987

- 122.- BURNETT J., OPGENORTH T., GRANGER J.
The renal action of atrial natriuretic peptide during control
of glomerular filtration.
Kidney Internat 30: 16-19. 1986.
- 123.- GUTKOWSKA J.
Descubrimiento, purificación y caracterización del ANF.
II Symposium Internacional. Peptido Atrial Natriurético.
Madrid. Nov. 1987.
- 124.- ZOCALI, C., CICCARELLI M., MALLAMACI F., DELFINO D.,
PARLONGO S., MAGGIORE Q.
Human atrial natriuretic peptide in chronic renal failure:
relationship with body fluid volume status.
Nephron Dial. Transplant 1: 128-131. 1986.
- 125.- TALARTSCHIK J., EISENHAUER T., HANSING M.,
SHELER F.
Decrease of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP during
ultrafiltration in chronic hemodialysis hemofiltration patients:
Simple elimination or caused by fluid removal?.
Nephro. Dial. Transplant 2: 392-396. 1987.
- 126.- ANDERSON J.V., RAINE A.E.G., PROUDLER A., BLOOM
S.R.
Effects of haemodialysis on plasma concentrations of atrial
natriuretic peptide in adult patients with chronic renal failure.
J. Endocrinol 110: 193-196. 1986

- 127.- CANNELLA G., RODELLA A., BRUNORI G., GAGGIOTTI M., SANDRINI M., MAIORCA R.
Plasma concentrations of atrial natriuretic peptide in relation to body fluid status in chronic uraemia.
Nefron Dial Transplant 2: 158-160. 1.987
- 128.- SAGNELLA G.A., MARKANDU N.D., SHORE A.S, MAC GREGOR G.A.
Aumento de los niveles de peptidos natriuréticos auriculares en la hipertensión esencial.
Lancet (ed. Esp.) 8: 830-381. 1.986
- 129.- TIKKANEN I., FRYRQUIST F., METSARINE K., LEIDENIUS R.
Plasma atrial natriuretic peptide in cardiac disease and during infusion in healthy volunteers.
Lancet. II: 66-69. 1.985
- 130.- De WARDENER H.E., Mc GREGOR G.A.
The relation of a circulating sodium transport inhibitor (the natriuretic hormone?) to hypertension.
Medicine 62: 310-326. 1983.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los señores firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. JUAN MANUEL TRUJEROS DE LA TORRE
titulada *Factos atípicos atributivos en la Insuficiencia
Académica*

se acordó otorgar a la mencionada Tesis el título de *Doctor en Ciencias de la Educación*

Sevilla, a los *15* días del mes de *Febrero* de *1994*

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

[Handwritten signature]
El Secretario

[Handwritten signature]

El Secretario,

[Handwritten signature]
El Encargado

[Handwritten signature]