

CALICREINA GLANDULAR EN PLASMA
ESTUDIOS DE LOS NIVELES CIRCULANTES Y SU RELACION CON LA FUNCION RENAL

Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con mención en
Fisiología
Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

INES PINTO CEQUIEL



Director de Tesis:

Prof. Renato Albertini B.
Laboratorio de Fisiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Fernando Zambrano B.
Laboratorio de Fisiología
Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Julio - 1984

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N

T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

INES PINTO CEQUIEL

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología

Director de Tesis

Prof. Renato Albertini B.

Patrocinante de Tesis

Prof. Fernando Zambrano B.

Comisión Informante de Tesis

Dr. Jorge Belmar C.

Dra. Elisa Marusic

Dr. Daniel Wolff F.



Albertini

F. Zambrano

Belmar
Elisa Marusic
Daniel Wolff

A mi gajo



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profunda gratitud a todas las personas que me ayudaron y brindaron su apoyo durante el desarrollo de esta tesis:

A mis amigos del Laboratorio de Fisiología, personal administrativo y docente, quienes con su afecto y colaboración hicieron grato cada día de trabajo.

Al Profesor Renato Albertini, por haberme acogido en su Laboratorio, apoyado e incentivado en el transcurso de este trabajo y por su ayuda y certera crítica en la redacción y revisión del manuscrito.

A Jaime Masferrer, le agradezco sus enseñanzas en el trabajo de laboratorio, sus consejos y críticas y en especial su franca amistad.

A mi entrañable amiga María del Pilar García, sólo puedo darle las gracias por todo, por compartir mis horas de trabajo cuando se alargaban más allá de lo usual, por darme ánimo en los momentos de desaliento, y por estar conmigo cada vez que la necesité.

A Jaime y Pilar les agradezco haberme "soportado" con resignación durante estos dos años, por compartir tantas horas de trabajo en esos mismos m², tantos cafés y tantas vivencias que siempre recordaré con cariño.

A María Eugenia Cifuentes y a todos mis amigos del Laboratorio de Inmunología, por su amena compañía y ayuda material y técnica en tantas ocasiones.

Al Dr. Fernando Zambrano, gracias por su apoyo, amistad y valiosos consejos.

Y finalmente a mi madre, por su comprensión, paciencia y amor.



INDICE

	pág.
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
SUMMARY	x
INTRODUCCION	1
MATERIALES	7
Animales	7
Reactivos	7
Equipos	8
METODOS	9
Preparación de Sefarosa-Aprotinina	9
Preparación de Cininógeno	10
PURIFICACION DE CALICREINA GLANDULAR DEL PLASMA DE RATA	11
1.- Obtención del plasma	11
2.- Precipitación de proteínas con sulfato de amonio (30-70%)	11
3.- Cromatografía de afinidad	12
4.- Determinación de proteínas	12
5.- Estudios de recuperación de la enzima	13



6.- Medición de actividad enzimática en geles de poliacrilamida	14
7.- Electroforéris en SDS	16
8.- Titulación de la enzima	16
a) Medición de la actividad amidásica	16
b) Medición de la actividad cininogénásica	17
9.- Estudio de la acción de inhibidores	18
ESTUDIO DE LOS VALORES DE CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA DE RATA	19
1.- Protocólos	19
a) Nefrectomía bilateral	19
b) Ligadura bilateral de uréteres	20
c) Dieta Hiposódica	20
d) Hipertensión Goldblatt 1 riñón-1 pinza	21
2.- Titulación de calicreína glandular en plasma y orina	22
a) Radioinmunoanálisis para cininas	23
b) Bioensayo	24
RESULTADOS	26
PURIFICACION DE CALICREINA GLANDULAR DEL PLASMA DE RATA	26
1.- Etapas de purificación	26
2.- Estudios de recuperación de la enzima	28
3.- Medición de actividad enzimática en geles de poliacrilamida	31
4.- Estudio de la acción de inhibidores	31
ESTUDIO DE LOS VALORES DE CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA DE RATA	35
1.- Nefrectomía bilateral	35

2.- Ligadura bilateral de uréteres	35
3.- Dieta Hiposódica	38
4.- Hipertensión Goldblatt 1 riñón- 1 pinza (G1)	45
DISCUSION	49
REFERENCIAS	57

ABREVIATURAS

BK	: Bradicinina.
Bis-acrilamida	: N-N'-metilen-Bis-acrilamida.
BSA	: Seroalbúmina de bovino.
KIU	: Unidades de inhibición de calicreína.
RIA	: Radioinmunoanálisis.
S-2266	: H-D-Val-Leu-Arg-pNA.
SDS	: Dodecilsulfato de sodio.
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PAGE-SDS	: Electroforesis en geles de poliacrilamida Bis-acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio.
TEMED	: N,N,N',N', tetrametiletildiamina.
TRIS	: Tris-(hidroximetil)-aminometano.
cpm	: Cuentas por minuto.
p.c.	: Peso corporal.
p/v	: Peso/volumen.
pNA	: para-nitroanilina
CnBr	: Bromuro de cianógeno.
mA	: mili Amperes.

RESUMEN

Con el propósito de clarificar el papel que pueda tener el sistema calicreína-cininas de origen glandular en la regulación de la presión arterial es necesario establecer la presencia de calicreína activa en la sangre y medir sus variaciones frente a estímulos fisiológicos. Con este objetivo desarrollamos un método que nos permitió separar y medir específicamente la enzima a partir del plasma de rata.

La sangre obtenida de la arteria carótida en tubos plásticos citratados, fue centrifugada a 1.500 g x 15 min a 4° C y el plasma tratado con Polybrene (5 ugr/ml) a fin de evitar la activación de la calicreína plasmática. El plasma fue sometido a fraccionamiento con sulfato de amonio (30 - 70%) para eliminar proteínas de alto peso molecular. El precipitado fue resuspendido y cromatografiado en una columna de afinidad Sefarosa - Aprotinina. El material adsorbido fue lavado con tampón TRIS-HCl 0,1 M, 0,2 M NaCl pH = 8,1. La enzima se eluyó con un inhibidor competitivo p-aminobenzamina 50 mM. El análisis electroforético de este material purificado en gel de poliacrilamida alcalina mostró microheterogeneidad, apareciendo dos bandas muy

cercanas con un sólo pico de actividad, al igual de lo observado para la calicreína urinaria usada como estandar. El material plasmático obtenido se comporta como calicreína glandular porque posee actividad enzimática sobre el cininógeno de bajo peso molecular obtenido de plasma de rata; hidroliza el sustrato sintético específico S - 2266 y porque ambas actividades enzimáticas son inhibidas por aprotinina, benzamidina y por anticuerpos anticalicreína urinaria de rata.

Con el fin de validar nuestro método para separar calicreína glandular del plasma y de estudiar la participación del riñón en la entrega de esta enzima al plasma, cuantificamos sus variaciones frente a estímulos agudos y crónicos que comprometen la función renal. Cuatro grupos de ratas fueron sometidas a las siguientes manipulaciones experimentales: nefrectomía bilateral 24 horas antes de ser sangradas; ligadura bilateral de uréteres 24 horas antes de ser sangradas; alimentación con dieta hiposódica por 1 y 2 semanas antes de ser sangradas; hipertensión experimental Goldblatt 1 pinza - 1 riñón. Los animales fueron sangrados 7 semanas después del pinzamiento de la arteria renal. Los valores de la actividad cininogénica de la calicreína glandular contenida en el plasma y de la calicreína urinaria de los grupos experimentales fueron comparados con aquellos de los controles con operación ficticia o con dieta normosódica. La actividad enzimática fue medida

mediante RIA y/o bioensayo para cininas. En los animales con 24 horas de nefrectomía total los valores de calicreína activa en el plasma se duplicaron ($p < 0,001$), mientras que en los animales con ligadura de uréteres y riñones "in situ" disminuyeron significativamente ($p < 0,001$). La dieta hiposódica produjo un aumento significativo tanto en los valores de calicreína urinaria como de calicreína glandular en el plasma, con una correlación significativa entre ambos. En la fase crónica de la hipertensión experimental Goldblatt 1 pinza 1 riñón hubo disminución significativa de la calicreína urinaria, confirmándose hallazgos anteriores; no se observó sin embargo, cambio alguno en el contenido de calicreína glandular en el plasma de estos mismos animales.

Podemos concluir:

- 1.- El método que hemos desarrollado permite cuantificar calicreína glandular biológicamente activa en el plasma y cuantificar sus variaciones.
- 2.- La presencia de calicreína glandular en el plasma permite postular que el Sistema Calicreína-Cininas además de su papel fisiológico local puede desempeñar funciones de regulación sistémica.
- 3.- Los resultados obtenidos al modificar parámetros de función renal indican que el riñón participa en la entrega de calicreína a la circulación, pero que no es la única y tal vez tampoco la principal fuente de ella.

SUMMARY

To clarify the role of glandular kallikrein-kinin system in arterial pressure regulation we have developed a method to measure active glandular kallikrein in blood and its variations in response to physiological changes.

Blood was collected in plastic tubes with sodium citrate, and centrifuged at 1.500 x g for 15 min at 4° C. The plasma was treated with Polybrene (5 ug/ml) and fractionated with ammonium sulfate (30 - 70 %) to eliminate high molecular weight proteins. The second precipitate was resuspended and applied to a column of Sepharose-Aprotinin. The adsorbed material was washed with buffer TRIS-HCl 0,1 M, NaCl, pH = 8,1 and eluted with p-aminobenzamidine 50 mM, a competitive inhibitor of kallikrein.

The eluted material showed microheterogeneity, exhibiting two protein bands with only one peak of activity which corresponds to purified standard urinary kallikrein. This material behaves as glandular kallikrein. In fact, it shows enzymatic activity against the low molecular weight kininogen and hydrolyzes the S-2266 synthetic substrate which is also suitable for glandular kallikrein. Both enzymatic activities are inhibited by aprotinin, benzamidine and by rat

urinary kallikrein antibodies.

In order to evaluate the method and to study the kidney involvement in plasma glandular kallikrein variations, the enzyme in blood before and after acute chronic changes in renal function was measured. Four groups of rats were submitted to different experimental maneuvers: bilateral nephrectomy or bilateral ureteral obstruction 24 hours before bleeding, low sodium diet for 1 or 2 weeks before bleeding, and rats with Goldblatt 1 clip - 1 kidney experimental hypertension. Hypertensive animals were bled 7 weeks after renal artery clipping. The kininogenase activity of glandular kallikrein purified from plasma of experimental and control rats was measured by RIA and/or bioassay for kinins.

In nephrectomized rats the amount of active glandular kallikrein in plasma was two fold ($P < 0,001$) while in rats with ureteral obstruction it was significantly lower ($p < 0,001$) than in control rats. The low sodium diet induced a significant increase in both, urinary and plasma glandular kallikrein, with a significant correlation between these values. In chronic Goldblatt 1 clip - 1 kidney experimental hypertension, as previously described, a significant decrease in urinary kallikrein was found, however, no changes were observed in plasma glandular kallikrein.

In conclusion:

- 1.- We have developed a method that allow us to measure ac tive glandular kallikrein in blood.
- 2.- The occurrence of glandular kallikrein in blood lead us to postulate that kallikrein-kinin system could have a systemic function in blood pressure regulation.
- 3.- The observed data in response to changes in renal function suggest that although the kidney may contribute with kallikrein to the circulation, glandular kallikrein in plasma derives also from kallikrein sources other than the kidney.

INTRODUCCION

Se llaman calicreínas un conjunto de enzimas (serina-proteasas) que actúan sobre cininógenos, alfa globulinas presentes en el plasma y linfa, liberando péptidos biológicamente activos conocidos como cininas. (1).

Se distinguen dos tipos de calicreínas, la calicreína plasmática y las calicreínas de origen glandular. También hay dos formas de sustrato natural para calicreínas, el cininógeno de alto peso molecular (80.000 - 220.000 D) y el cininógeno de bajo peso molecular (50.000 - 80.000 D). (1). La calicreína plasmática circula en la sangre como precursor inactivo (precalicreína), siendo activada por el factor Hageman. La forma plasmática activa participa en el mecanismo de la coagulación sanguínea a través de la activación del factor XI, y en otros variados procesos como la conversión de plasminógeno en plasmina y procesos de inflamación (2). Esta calicreína actúa sobre cininógeno de alto peso molecular liberando el nonapéptido bradicinina, reacción que es inhibida por los inhibidores de tripsina.

La primera calicreína de origen glandular se encontró en la orina como sustancia hipotensora no dializable (3). Posteriormente se han descrito otras en el tejido de glándulas exocrinas (páncreas, glándulas salivales, glándulas

sudoríparas) y en sus secreciones, y en el tejido de algunos órganos como intestino y riñón. Las calicreínas de origen glandular están relacionadas entre sí química e inmunológicamente; actúan preferencialmente sobre cininógeno de bajo peso molecular, pero también sobre el de alto peso molecular, liberando el decapeptido lisil-bradiginina que es convertido rápidamente en bradiginina por aminopeptidasas presentes en el plasma y orina. A diferencia de la calicreína plasmática, las calicreínas de origen glandular no son inhibidas por algunos inhibidores de la tripsina (1). Por lo tanto, salvo su capacidad para liberar cininas, ambos tipos de calicreínas no tienen elementos en común, pues se distinguen en sus propiedades fisicoquímicas, enzimáticas e inmunológicas.

En los últimos años se ha observado un creciente interés en el estudio del sistema calicreína-cininas, especialmente de origen renal, debido a la participación que se le atribuye en la homeostasis circulatoria (4-9). Las cininas poseen una intensa acción vasodilatadora y favorecen la excreción de agua y sodio a nivel renal (10). Estos péptidos actúan de modo opuesto a la angiotensina II, siendo esta última un potente agente vasoconstrictor formado por la acción de la renina sobre el angiotensinógeno plasmático. De este modo, el sistema calicreína-cininas renal aparece como antagonista al sistema renina-angiotensina, también de origen

renal. Ambos tipos de péptidos, cininas y angiotensina, por su acción sobre la musculatura vascular, la excreción de agua y electrolitos y por ende de la regulación del volumen circulante, pueden estar involucrados en la regulación de la presión sanguínea. Mientras el papel del sistema renina-angiotensina se ha estudiado en forma bastante exhaustiva, poco se conoce acerca de la función que le corresponde al sistema calicreína-cininas en este mecanismo de regulación, tanto en condiciones normales como patológicas.

Se sabe que, al igual que la renina, la calicreína de origen renal es una glicoproteína, pero aún no se ha descrito su secuencia aminoacídica. Casi todo lo que se conoce de esta enzima se debe a estudios hechos con calicreína contenida en la orina. Esta es producida y secretada al túbulo renal por las células del epitelio del túbulo distal, en la zona cercana a la mácula densa (11-13). Desde el punto de vista enzimático e inmunológico la calicreína urinaria no es diferente de la enzima extraída del tejido renal y por lo tanto, se considera que hay identidad molecular entre ambas (14).

Estudiando los niveles de calicreína urinaria en diversos tipos de hipertensión arterial, se ha encontrado en algunos de ellos variaciones que sugieren la participación de esta enzima en los mecanismos de mantención de la presión arterial. El primer indicio fue descrito por Elliot

y Nuzum en 1934 (3) quienes encontraron que en la orina de pacientes hipertensos existía menor cantidad de un principio depresor respecto a los pacientes normotensos, el que fue identificado posteriormente como calicreína. Estos hallazgos indujeron a investigar acerca de las posibles relaciones entre niveles de calicreína urinaria e hipertensión arterial, encontrándose un significativo descenso de la calicreína urinaria en diversos tipos de hipertensión renovascular experimental (15, 16), en la hipertensión esencial en el hombre (17) y en la hipertensión genética espontánea en ratas (18). En concomitancia con la observación de la disminución del contenido de calicreína urinaria se ha encontrado también disminución en el contenido de calicreína del tejido renal en ciertos modelos de hipertensión experimental (4, 9, 19). Además se ha descrito que el cininógeno del plasma está aumentado en ratas hipertensas, variación atribuible a menor producción o entrega de calicreína (4, 20, 21). Sin embargo, no está claro todavía cuales son las señales precisas que determinan la entrega de calicreína por parte del riñón y su acción a nivel local. Se sabe que las cininas, péptidos liberados por la acción de la calicreína sobre el cininógeno, son el principal agente activador de las prostaglandinas en el riñón (22). Estas, por sus efectos sinérgicos, vasodilatadores y natriuréticos, amplifican y prolongan la acción directa de las cininas. Por otra parte, la similitud en la cadena de fenómenos que

originan angiotensina II y bradiginina, antagónicos en su acción, y el hecho que ambos sistemas enzimáticos (renina-angiotensina y calicreína-cininas) esten relacionados por una enzima común, la enzima convertidora de angiotensina I a angiotensina II, que es también una cininasa (cininasa II), ha permitido postular que la calicreína puede tener un papel sistémico produciendo cininas en el torrente circulatorio, las que actuarían en la pared vascular de un modo opuesto a la angiotensina II. La calicreína podría ser, por lo tanto, un factor hipotensivo circulante (5). Esta hipótesis está apoyada por experimentos en riñón aislado y perfundido con un líquido libre de calicreína y de precursores de la enzima, que muestran liberación de calicreína tanto al perfusado como a la orina (23), y por estudios que indican que la calicreína puede pasar la barrera pulmonar y llegar al territorio vascular arteriolar actuando así sobre la resistencia vascular periférica a través de las cininas que puede liberar a ese nivel del lecho vascular (24).

La importancia del sistema calicreína-cininas como un sistema vasodilatador o hipotensor, depende de la posibilidad que la enzima interactúe con su sustrato. El cininógeno se encuentra predominantemente en el compartimento vascular (37). Recientemente diversos autores han demostrado la existencia de calicreína glandular en la sangre arterial, donde se encontraría unida a inhibidores (25-29). El méto-

do empleado, radioinmunoanálisis directo, reconoce un material inmunoreactivo que reacciona con el anticuerpo anticálicreína urinaria de rata. Sin embargo, el RIA no discrimina entre distintas formas en que se puede encontrar la enzima en la sangre: procalicreína, complejo calicreína-inhibidor, calicreína activa. La presencia de calicreína glandular activa se ha medido hasta ahora en saliva (30) y linfa (31) pero no en sangre. Por consiguiente, es relevante conocer si la calicreína glandular se encuentra en el plasma en forma activa y estudiar las posibles variaciones que ella experimenta frente a estímulos fisiológicos, con el propósito de clarificar la función que pueda tener en los procesos de regulación sistémica.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1.- Desarrollar un método que permita identificar la presencia de calicreína glandular en su forma activa en el plasma.
- 2.- Revelar cambios en sus niveles circulantes, frente a estímulos experimentales.
- 3.- Estudiar la participación del riñón en estos cambios y así contribuir a dilucidar su función como órgano protector en la mantención de los valores de presión arterial.

MATERIALES

Animales:

Ratas machos Sprague-Dawley, de 120 - 300 grs.

Reactivos:

- Sefarosa 4B activada con CnBr de Pharmacia.
 - Aprotinina, Acrilamida, Bis-acrilamida, Temed, Seroalbúmina de bovino, Ovomucoide, Coomassie brilliant blu R, de Sigma Ch. Co.
 - Bradicinina de Sandoz.
 - S - 2266 de Kabi Ab.
- Todos los otros reactivos de grado analítico fueron provistos por Merck y por Sigma Ch. Co.
- Calicreína urinaria de rata; anticuerpos antibradicinina, facilitados por el Laboratorio de Fisiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
 - Anticuerpos antiseroalbúmina de bovino, facilitado por el Laboratorio de Inmunología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
 - Calicreína urinaria de rata - I¹²⁵ y anticuerpos anticalicreína urinaria de rata facilitados por María del Pilar García del Laboratorio de Fisiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Equipos:

- Colector de fracciones automático LKB con registrador de transmitancia a 280 nm., modelo Uvicord 8301 A.
- Bomba peristáltica de 8 canales Gilson HP-8.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV - 150 - 02, para la determinación de densidad óptica.
- Fuente de poder CANALCO de corriente o tensión regulada, para las electroforesis analíticas y preparativas.
- Espectrofotómetro de llama Eppendorf, para las determinaciones de sodio y potasio.
- Cámara para electroforesis vertical en slab.
- Polígrafo Grass, modelo 79 D., con transductor de tensión Grass FT 10, para las mediciones en el ensayo biológico.
- Polígrafo Grass, modelo 5 D, con transductor de presión, para la medición de presión arterial.
- Contador Gamma, Rack gamma II LKB 1270, conectado a un microprocesador modelo 700 de Texas Instruments.
- Centrífuga Sorvall superspeed RC2-B.
- pHmetro Cole-Parmer Instrument Company, digital.

METODOS

Preparación de Sefarosa - Aprotinina.

El procedimiento fue similar al descrito por Cuatrecasas y col (32). Se incubaron 15 grs de Sefarosa 4B activada con CnBr durante 15 min en 100 ml de HCl 1,0 mM que luego fueron lavados con tres litros de la misma solución ácida, para eliminar el dextrano y la lactosa presentes en el gel.

La unión del ligando (Aprotinina) se realizó en tampón bicarbonato (NaHCO_3 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH = 8,0). Para ello 150 mg de Aprotinina (0,15 mg equivalentes a 1,0 KIU) fueron disueltos en 50 ml de tampón bicarbonato y mezclados con 37,6 gr de gel húmedo. La mezcla se agitó lentamente por 24 hrs a 4° C. Las uniones no covalentes del ligando fueron eliminadas lavando la mezcla con las siguientes soluciones amortiguadoras en cuatro ciclos de 100 ml cada uno:

- 1.- Tampón bicarbonato pH=8,0.
- 2.- Tampón TRIS - HCl 0,2 M; pH = 7,5.
- 3.- Tampón acetato de sodio 0,1 M; 1,0 M NaCl; pH = 4,0.

Al término del proceso de lavado la mezcla se incubó con 300 ml de etanolamina 1,0 M pH = 8,0 durante dos horas a temperatura ambiente para hacer reaccionar los grupos

activos remanentes de la Sefarosa - 4B. Finalmente el gel fue reequilibrado en tampón bicarbonato pH = 8,0 y guardado a 4° C en presencia de azida de sodio al 0,1%.

Preparación de Cininógeno.

El cininógeno se obtuvo de plasma de perro mediante precipitación con sulfato de amonio sobresaturado. El plasma se precipitó primero con sulfato de amonio a una concentración final del 30%. Luego de una hora de agitación se centrifugó a 5.000 x g por 30 min. El sobrenadante fue llevado a una concentración final del 50% con la solución sobresaturada de sulfato de amonio. El precipitado obtenido por centrifugación se resuspendió en agua destilada y se dializó contra una solución 0,15 M de NaCl, durante 24 hrs a 4° C. El cininógeno así obtenido fue liofilizado y guardado a temperatura ambiente.

PURIFICACION DE CALICREINA GLANDULAR DEL PLASMA DE RATA.

1.- Obtención del plasma.

Doce ratas machos, bajo anestesia etérea, fueron sangradas aproximadamente durante 60 seg a través de una cánula PE-90 colocada en la arteria carótida. La sangre fue recogida en tubos plásticos en presencia de citrato de sodio 3,5% (p/v). La sangre se centrifugó a 1.500 x g durante 15 min a 4°C. Al plasma obtenido se agregó Polybrene (5 ugr/ml) para evitar la activación de la procalicreína plasmática y se guardó a 4°C en tubos plásticos. Todo el material empleado para el procesamiento del plasma fue previamente saturado con BSA al 1% para evitar la unión de proteínas al plástico.

2.- Precipitación de proteínas con sulfato de amonio (corte 30-70%).

25 ml de plasma fresco fueron precipitados con sulfato de amonio sobresaturado a una concentración final del 30% bajo agitación y a 4°C. Luego de 60 min de reposo la mezcla se centrifugó a 5.000 x g durante 30 min. El sobrenadante fue llevado a una concentración final del 70% de sulfato de amonio agregando 47 ml de la solución sobresaturada del mismo modo anterior. El precipitado obtenido por centrifugación fue resuspendido en agua destilada y dializado contra dos cambios de agua destilada y un tercer cambio contra tampón TRIS-HCl 0,1 M, pH = 8,1 durante 24 hrs a 4°C.

3.- Cromatografía de afinidad.

La muestra dializada fue pasada por una columna de afinidad Sefarosa - Aprotinina de 10 x 2 cm; equilibrada en una solución amortiguadora TRIS-HCl 0,1 M; pH = 8,1. Empleando la misma solución amortiguadora más 0,2 M. NaCl se procedió a lavar las columnas hasta que la absorbancia a 280 nm fue igual a 0. La calicreína se eluyó con una solución de p-aminobenzamidina 50 mM, disuelta en tampón TRIS-HCl 0,1 M; pH = 8,1.

La columna se mantuvo con un flujo constante de 10 ml/h colectándose fracciones de 3 ml. La muestra eluída fue dializada exhaustivamente contra agua destilada y posteriormente liofilizada.

4.- Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas de las muestras para PAGE y de las diversas etapas de purificación fue determinada de acuerdo al método de Lowry et al, usando BSA como estandar (33). La concentración de proteínas en los eluídos de las columnas fue monitoreada a 280 nm con un monitor de Absorbancia (LKB modelo UVICORD 8301 A). Un coeficiente de extinción $E_{280} = 1,51$ fue usado para 1,0 mg/ml de calicreína (34).

5.- Estudios de recuperación de la enzima.

A una muestra de 25 ml de plasma se agregaron 600 pg de calicreína-I¹²⁵ marcada según el método de Hunter (38). La distribución de la calicreína-I¹²⁵ durante el proceso de purificación descrito se midió tomando alícuotas en las diferentes etapas. Para medir la presencia de la enzima se midió la radioactividad mediante un contador Gamma LKB 1270 y la cantidad de enzima marcada en las muestras se expresó en cpm totales.

En un segundo protocolo, se agregaron 600 pg de calicreína-I¹²⁵ a cuatro alícuotas de 3 ml de plasma cada una. La primera alícuota fue precipitada con sulfato de amonio, según el método descrito, inmediatamente después de añadir la calicreína-I¹²⁵. Las otras tres alícuotas fueron precitadas 10, 120 y 240 min después de añadir la calicreína-I¹²⁵ y de incubar la mezcla a 37°C. Las cuatro muestras fueron sometidas al procedimiento de purificación descrito, usando columnas de Sefarosa-Aprotinina de 2 ml de gel. Las cuentas que aparecieron en el eluído coincidiendo con el pico de actividad se expresaron como porcentaje de las cuentas totales añadidas.

6.- Medición de actividad enzimática en geles de poliacrilamida.

Para separar la enzima se utilizó el método de Laemli y Favre (35) para electroforesis discontinua en medio desnaturalizante (SDS), con modificaciones para el análisis de proteínas en estado nativo.

Se utilizaron placas de vidrio siliconizadas de 16,5 x 16,5 cm, con un espacio interno entre las placas de 1 mm. El interior de las placas se llenó con: 15 ml de gel separador conteniendo una concentración final de 11 % acrilamida, 0,79 % de Bis-acrilamida respectivamente, en una solución amortiguadora TRIS-HCl 0,375 M, pH = 8,8; con persulfato de amonio 0,05 % y Temed 0,05 % como agentes polimerizantes. Sobre esta solución se agregaron unas gotas de isobutanol para excluir el aire y formar una interfase plana. El gel polimerizó a temperatura ambiente en aproximadamente 30 min. Después de sacar el isobutanol y enjuagar con agua destilada, se agregaron 4 ml de gel empacador.

La mezcla polimerizante del gel empacador contenía 3,0 % de acrilamida, 0,08 % de Bis-acrilamida, TRIS-HCl 0,125 M, pH = 6,8; persulfato de amonio 0,25 % y Temed 0,0625 %. Se introdujo en el gel empacador una peinetta con trece dientes de 0,6 cm de ancho por 1,5 cm de alto. Una vez polimerizado el gel empacador, se retiró la peinetta quedando los espacios correspondientes para colocar las

muestras. Las muestras a analizar se trataron con una solución que contenía glicerol 15% y trazas de azul de bromofenol, en TRIS-HCl 0,0625 M, pH = 6,8. La solución amortiguadora de corrida fue TRIS 0.025 M, Glicina 0,192 M, pH = 8,6 en ambos electrodos. Entre 10 y 50 μ l (10 - 20 μ g de proteínas) de las muestras previamente tratadas se colocaron en los espacios del gel empacador, en el compartimiento del electrodo negativo. Todo el proceso electroforético se realizó con una corriente constante de 20 mA. La corriente se cortó cuando el azul indicador estaba a unos 0,5 cm del final del gel, usualmente 15 horas después de haber iniciado el proceso. La cámara electroforética se mantuvo a temperatura ambiente. El gel se retiró de la placa y se tiñó con Coomassie-Blue (1,25 gr en 500 ml de metanol 50 %, ácido acético 10 %), bajo agitación continua durante una hora. El gel se destiñó en una mezcla de metanol 25 %, ácido acético 10 %, por 3 horas.

Dos de las columnas en el gel, conteniendo la muestra de eluido y una muestra de calicreína estandar respectivamente, se dejaron sin teñir y se seccionaron en segmentos de 0,4 cm. Los trozos de gel fueron homogeneizados en solución tampón fosfato 0,01 M; pH 7,0' y el sobrenadante fue utilizado para medir actividad amidásica y cininogenásica.

7.- Electroforesis en SDS.

Se utilizó el método de Laemmli y Favre (35) anteriormente descrito. Todas las soluciones empleadas contenían SDS al 0,1 %. Las muestras se prepararon mezclando las soluciones a analizar con una solución desnaturalizante, de modo que contuviera TRIS-HCl 0,0625 M; pH = 6,8; 15 % glicerol; 5 % 2-mercaptoetanol; 3 % SDS, como concentraciones finales. Esta mezcla se calentó a 100° C por 2 min y luego se procedió a realizar la electroforesis de la misma forma que para los geles sin SDS.

8.- Titulación de la enzima.

La presencia de calicreína en el eluido obtenido de la columna de afinidad Sefarosa - Aprotinina fue determinada mediante los siguientes procedimientos:

a) Medición de la actividad amidásica:

La actividad de las muestras eluidas fue determinada de acuerdo al método de Amundsend et al (36). 50 ul de la solución que contenía la enzima se incubaron con 100 ul del sustrato cromogénico D-Val-Leu-Arg-pNA (S - 2266). Se llevó a un volumen final de 1,0 ml con solución tampón TRIS - HCl 0,1 M; pH = 8,2. La mezcla se incubó 2 horas a 37° C y la reacción se detuvo adicionando 100 ul de ácido acético 50 %. La absorbancia de las muestras se leyó en un espectro fotómetro a 405 nm y la actividad fue expresada en

nmoles de pNa liberados por minuto.

b) Medición de la actividad cininogenásica:

La actividad cininogenásica de las muestras eluídas fue medida usando como sustrato cininógeno de bajo peso molecular obtenido de plasma de rata, mediante el método de Jacobsen (37) y las cininas liberadas fueron medidas en útero aislado de rata, utilizando como estandar bradycinina sintética.

Muestras de 50 - 100 ul de la solución que contenía la enzima se incubaron por 10 min a 37°C con 0,2 ml (0,5 mgr) del cininógeno de rata de bajo peso molecular en presencia de inhibidores de cininasas (1,0 mM de fenantrolina y 1,0 mM EDTA) y llevadas a un volumen final de 0,5 ml con solución Tyrode *. La mezcla fue agregada a un baño de 20 ml de capacidad a 37° C, conteniendo el cuerno de un útero de rata virgen en período de estro sumergido en solución Tyrode. El efecto contráctil de esta mezcla sobre el cuerno del útero, fue comparado con el efecto de las cininas producidas por muestras de calicreína estandar obtenida de

* Composición Tyrode:

149 mM Na⁺; 2,68 mM K⁺; 0,41 mM Ca⁺⁺; 59 mM Mg⁺⁺; 258 mM Cl⁻; 0,36 mM PO₄⁼; 11,9 mM HCO₃⁻; 5,55 mM glucosa, en agua destilada.

orina de rata y se expresó como ng BK/ml plasma.

9.- Estudio de la acción de inhibidores.

Muestras de eluido que contenían el equivalente a 10 ng de calicreína glandular, medida por su actividad cininogénica, fueron incubadas durante 10 min a 37° C con:

- Aprotinina (1 KIU)
- Benzamidina-HCl (25 mM).
- Ovomucoide (40 ugr)
- Anticuerpos anticalicreína urinaria de rata (5 ul)
- Anticuerpos inespecíficos (5 ul).

Posteriormente se agregó a cada tubo 0,5 mgr de cininógeno de rata de bajo peso molecular, en un volumen de 0,2 ml. El volumen final se completó a 0,5 ml con solución Tyrode. Luego de incubar 2 min a 37° C se midió la actividad cininogénica remanente de las muestras mediante el bioensayo en útero de rata ya descrito.

ESTUDIO DE LOS VALORES DE CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA DE RATA

1.- Protocolos

Para estudiar las posibles variaciones de los valores de calicreína glandular en el plasma de la rata, se efectuaron cuatro protocolos experimentales. En todos ellos los animales fueron sangrados por canulación de la arteria carótida, bajo anestesia etérea y el plasma fue tratado según el método de purificación de la enzima descrito. Se emplearon 8 columnas de Sefarosa - Aprotinina de 2 ml de gel cada una, de modo que se pudo cromatografiar por separado el plasma de 8 animales en forma simultánea. Las muestras de plasma se agregaron a la columna gota a gota con pipeta Pasteur. El flujo se mantuvo constante a 4 ml/h para adsorción y elución y a 10 ml/h para el lavado, mediante el uso de una bomba peristáltica Gilson de 8 canales. Cada columna se eluyó con 6 ml de p-aminobenzamidina 50 mM en solución tampón TRIS-HCl 0,1 M; pH = 8,1.

a) Primer protocolo: Nefrectomía bilateral.

12 ratas machos de 200 gr de peso fueron separadas en dos grupos de 6 ratas cada uno. A los animales del grupo experimental se les practicó, bajo anestesia etérea, una incisión dorsal bilateral de aproximadamente 3 cm en la

región lumbar, a través de la cual se extrajeron los riñones. Las ratas del grupo control fueron sometidas al mismo tratamiento quirúrgico sin extraerse los riñones. 24 horas después de la intervención quirúrgica las 12 ratas fueron sangradas por canulación de la arteria carótida y el plasma de cada rata fue tratado por separado para purificar la calicreína glandular según el método descrito en este trabajo.

b) Segundo protocolo: Ligadura bilateral de uréteres.

A dos grupos de 6 ratas machos de 200 gr cada uno, se les practicó una incisión abdominal de aproximadamente 3 cm bajo anestesia etérea. En las ratas del grupo experimental, ambos uréteres fueron ligados con hilo de sutura en la porción más cercana a los riñones. En las ratas del grupo control, los uréteres sufrieron el mismo grado de manipulación sin ser ligados. Los animales se mantuvieron con comida y agua "ad libitum" y 24 horas después fueron sangrados por canulación de la arteria carótida.

c) Tercer protocolo: Dieta hiposódica.

24 ratas fueron divididas en dos grupos de 12 ratas cada uno. El grupo experimental fue alimentado con una dieta hiposódica que consistió en carne magra (corazón de vacuno), zanahorias, pan sin sal y agua desionizada "ad libitum". El grupo control se alimentó con la dieta

regular del vivero y agua de la llave "ad libitum". Al término de la primera semana 6 ratas de cada grupo fueron san gradadas. El día anterior al sangramiento se recolectó orina durante 8 horas para medir excreción de calicreína, de Na^+ y K^+ ; para ello las ratas fueron ubicadas en jaulas me tabólicas sin alimento pero con libre acceso al agua. Al término del período de recolección se midió el volumen uri nario excretado por cada rata y las orinas se guardaron a -20°C hasta realizar las mediciones indicadas. El contenido urinario de Na^+ y K^+ fue medido en un fotómetro de llama Eppendorf. Al término de la segunda semana las 6 ratas restantes de cada grupo fueron sometidas al mismo procedimiento.

d) Cuarto protocolo: Hipertensión Goldblatt 1 riñón-
1 pinza.

A un grupo de 8 ratas machos, de aproximadamente 100 a 120 gr de peso, bajo anestesia etérea, se implantó retro peritonealmente una pinza de plata de 0,23 mm de abertura interior, alrededor de la arteria renal izquierda, y se ex tirpó el riñón contralateral. Al grupo control (8 ratas) se manipuló la arteria renal izquierda y se extirpó el riñón contralateral.

La presión arterial fue medida en la cola con detector de pulso y registro en un polígrafo Grass dos veces por semana a partir de la semana anterior a la intervención

quirúrgica. Siete semanas después de la intervención las ratas fueron colocadas individualmente en jaulas metabólicas sin comida pero con libre acceso al agua, para recolectar orina durante 8 horas. Las orinas fueron medidas y guardadas a -20°C , hasta el momento en que se efectuaron las mediciones del contenido de calicreína, Na^{+} y K^{+} . Al término de la séptima semana las ratas fueron sangradas para titular la calicreína en el plasma.

2.- Titulación de calicreína glandular en plasma y orina.

La calicreína glandular en el plasma y en la orina se tituló midiendo la cantidad de cinina liberada mediante una reacción cininogénica.

Esta reacción consistió en incubar la muestra (orina o eluido de la columna Sefarosa - Aprotinina) con cininógeno de perro en presencia de inhibidores de cininasas. La orina se diluyó 1:50 y de esta dilución se tomaron 50 μl . Para medir calicreína glandular del plasma se tomaron 50 μl de la muestra liofilizada y resuspendida en 200 μl de tampón fosfato 0,05 M, $\text{pH} = 7,4$. Las muestras se llevaron a un volumen final de 450 μl con tampón fosfato 0,05 M, $\text{pH} = 7,4$ que contenía 0,15 M NaCl, 1 mM Fenantrolina y 1 mM EDTA y se preincubaron a 37°C por 5 minutos. A continuación se adicionaron 50 μl de cininógeno (35 mg/ml) disuelto

en el mismo tampón para iniciar la reacción y la mezcla se incubó a 37° C por 60 minutos. La reacción enzimática se interrumpió adicionando 2 ml de etanol 96%. Obtenida una adecuada decantación durante 5 minutos a temperatura ambiente la muestra fue centrifugada a 5000 x g x 10 minutos a 4° C. El sobrenadante que contiene las cininas liberadas en la reacción enzimática se separó del precipitado el que fue lavado con 1 ml de etanol 80%, antes de ser nuevamente centrifugado. Ambos sobrenadantes se juntaron y evaporaron a sequedad.

Las cininas liberadas mediante la reacción cininogénica fueron tituladas empleando radioinmunoanálisis y/o bioensayo para cininas.

a) Radioinmunoanálisis para cininas (RIA)

A los tubos con las muestras evaporadas a sequedad, se adicionó 1 ml del tampón de ensayo RIA (TRIS-HCl 0,1 M, pH = 7,4 con 0,2 % de gelatina). Luego se efectuó una dilución 1:100 y se tomaron alícuotas de 50 y 100 ul para el RIA. Los tubos se completaron a 600 ul con: 100 ul del anticuerpo (dil 1/20.000), 100 ul de BK-I¹²⁵ (14.000 cpm) y el resto con solución tampón RIA. La curva estandar se obtuvo con diferentes alícuotas de una solución de BK 1 ng/ml completadas a 600 ul con 100 ul del anticuerpo, 100 ul de BK-I¹²⁵ y el resto con solución tampón RIA.

Con cada ensayo se analizaron además los siguientes tubos:

Unión no específica : 100 ul BK-I¹²⁵ y 500 ul de la solución tampón RIA. Sin anticuerpos.

Unión máxima (Bo) : 100 ul del anticuerpo, 100 ul BK-I¹²⁵ y 400 ul del tampón RIA.

Cuentas totales : 100 ul de BK-I¹²⁵.

Todos los tubos se prepararon en duplicado. Se agitaron suavemente en vortex y se incubaron durante 20 a 24 horas a 4° C. Las cininas libres se separaron de las cininas unidas al anticuerpo mediante una solución de carbón activado (0,3 % p/v) y Dextrano T-70 (0,06 % p/v) disuelto en tampón Barbital pH = 7,4. A cada tubo, excepto al de cuentas totales, se le agregó 1 ml de la mezcla carbón Dextrano, se agitaron en vortex y se centrifugaron de inmediato a 5.000 x g x 20 minutos a 4° C. La radioactividad asociada al sobrenadante se midió en el contador Gamma durante 120 seg.

b) Bioensayo.

La actividad cininogénica de la calicreína glandular en el plasma o de la calicreína urinaria se midió también mediante el ensayo biológico sobre útero aislado de rata, comparando la intensidad de la contracción producida

por las cininas generadas al incubar la enzima con cininógeno de perro, con la respuesta del útero a diferentes dosis de Bradicinina estandar. Se usaron úteros de ratas vírgenes en períodos de estro. Los úteros se mantuvieron en solución Tyrode, en un baño oxigenado de aproximadamente 20 ml de capacidad y a 37° C. A dicho baño se agregaron alícuotas de una solución de BK (100 ng/ml en ácido oxálico 0,01 M) o alícuotas de las muestras que contenían las cininas liberadas y resuspendidas en 1 ml de solución tampón RIA. La respuesta contráctil de tipo isométrico del útero se registró en un polígrafo mediante un transductor de tensiones. La intensidad de la respuesta contráctil se relacionó con la cantidad de BK estandar necesaria para producirla y se expresó en ng de BK/ml/h.

Todos los resultados obtenidos se expresan como promedios con sus errores estandar. Las diferencias entre los promedios fueron calculadas empleando el test de Student, considerándose significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

El cálculo de correlación entre variables se expresó por el valor del coeficiente de correlación (r) y su significancia fue calculada en la tabla de t .

RESULTADOS

PURIFICACION DE CALICREINA GLANDULAR DEL PLASMA DE RATA.

1.- Etapas de purificación.

Los resultados del proceso de purificación se muestran en la tabla 1. El fraccionamiento del plasma con sulfato de amonio (30 - 70 % de saturación) precipitó aproximadamente la mitad de las proteínas iniciales, obteniéndose 660 mg de proteínas.

En la etapa de cromatografía de afinidad Sefarosa - Aprotinina (Figura 1) la mayor parte de las proteínas eluyeron al lavar la columna con solución tampón TRIS-HCl 0,1 M, 0,2 M NaCl, pH = 8,1 (fracciones 6 a 17). No se observó actividad amidásica ni cininogénica en estas fracciones. La calicreína retenida en la columna se eluyó específicamente con p-aminobenzamidina 50 mM disuelta en tampón TRIS-HCl 0,1 M; pH = 8,1, obteniéndose 3,6 mg de proteínas (fracciones 20 a 22). La actividad amidásica específica de la muestra purificada fue 1,23 nmoles pNA/min x mg de proteína y la actividad cininogénica específica fue de 140 ng BK/min x mg de proteína. La muestra eluida de la columna Sefarosa - Aprotinina mostró en electroforesis PAGE - SDS al 11 % (Figura 2) dos bandas tenues de proteínas

TABLA 1. PURIFICACION DE CALICREINA GLANDULAR DEL PLASMA DE RATA.

Etapa	Volumen ml	Proteínas totales mgr	Unidades totales cpm	Actividad especifica cpm/mg	Factor de purificación	Rendimiento %
Plasma	25	1256	21271	17	1	100
Fracc. sulfato de amonio (30-70%)	19	660	17785	27	2	85
Sefarosa- Aprotinina	6	3,57	15162	4247	250	71

* Los datos presentados son el promedio de tres preparaciones.

Estos valores fueron calculados usando calicreína -I¹²⁵ como trazador.

que migraron de igual forma que la calicreína urinaria purificada de rata, usada como estandar.

2.- Estudios de recuperación de la enzima.

Cuando se agregó calicreína-I¹²⁵ (21271 cpm) a 25 ml de plasma se midieron la actividad específica, el factor de purificación y el rendimiento (Tabla 1).

El fraccionamiento del plasma con sulfato de amonio (30 % de saturación) precipitó el 10 - 12 % (2250 cpm) de la radioactividad agregada. El 85 % de la calicreína-I¹²⁵ (17785 cpm) fue precipitada con sulfato de amonio al 70 % de saturación obteniéndose un factor de purificación de 2 veces y un 85 % de recuperación. La actividad específica para esta etapa fue 27 cpm/mg de proteína. En la etapa de cromatografía de afinidad Sefarosa - Aprotinina se observó que sólo una pequeña fracción de la enzima radioactiva (2000 cpm) eluyó junto a las proteínas del lavado (fracciones 8 a 10) (Figura 1). Usando p-aminobenzamidina 50 mM disuelta en tampón TRIS-HCl 0,1 M; pH = 8,1 para eluir la calicreína, se obtuvo una recuperación del 71 % (15162 cpm), una actividad específica de 4247 cpm/mg de proteína y un factor de purificación para calicreína de 250 veces (Tabla 1).

Los porcentajes de recuperación de calicreína-I¹²⁵ incubada a 37°C con 4 muestras de plasma durante 0, 10, 120

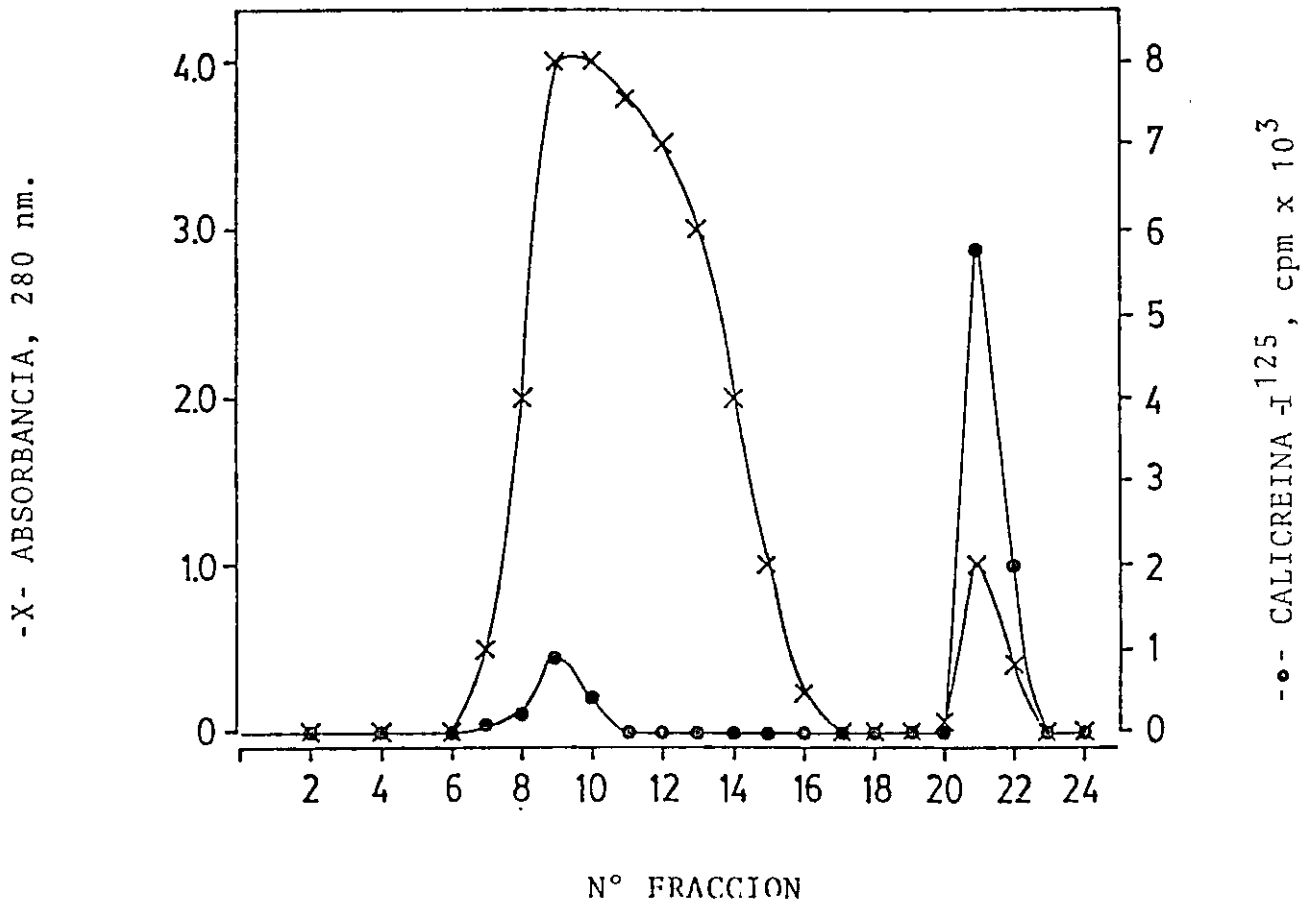


Figura 1.- Cromatograma de una columna de 10 x 2 cm de Sefarosa-Aprotinina, equilibrada en tampón TRIS-HCl 0,1M; pH = 8,1. 25 ml de plasma con 600 pg de calicreína -I¹²⁵ fueron fraccionados con sulfato de amonio (30 - 70 %) y aplicados a esta columna. Se lavó con tampón TRIS-HCl 0,1 M; pH = 8,1; 0,2 M NaCl y luego se eluyó con p-amino-benzamidina 50 mM en fracciones de 3 ml. La columna se mantuvo con un flujo constante de 10 ml/h. (x-x-x) absor**u** bancia a 280 nm, (●-●-●) cpm de calicreína -I¹²⁵.

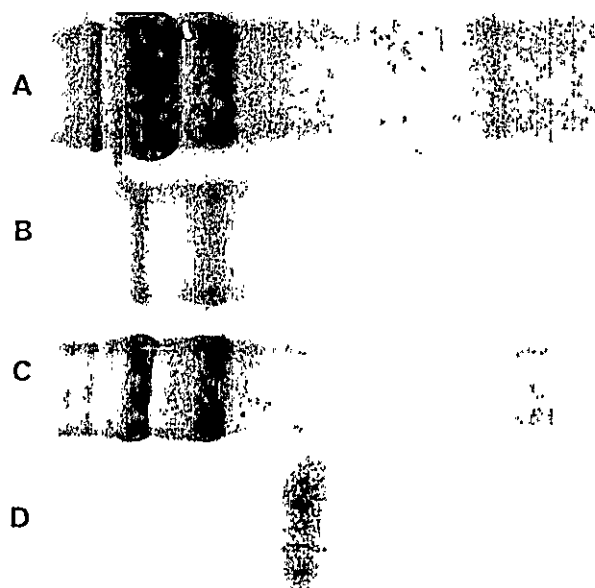


Figura 2.- Gel de PAGE-SDS al 11 %, en el que se realizó electroforesis de las muestras de las distintas fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad Sefarosa - Aprotinina.

- A: Muestra de plasma fraccionado con sulfato de amonio (30 - 70 %), 30 ugr de proteínas.
- B: Muestra de lavado de la columna con tampón TRIS-salino, 20 ugr de proteínas.
- C: Muestra del eluido con p-aminobenzamidina (50 mM) , 20 ugr de proteínas.
- D: Calicreína urinaria estandar, 10 ugr de proteínas.

y 240 minutos y tratadas según el método de purificación descrito, en columnas de 2 ml de gel, fueron 88, 87, 88 y 82% respectivamente. No hubo diferencias significativas en los valores de recuperación observados a diferentes tiempos de incubación.

3.- Medición de actividad enzimática en geles de poliacrilamida.

La calicreína glandular purificada del plasma mostró en electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 11 % alrededor de doce bandas de proteínas (Figura 3). La actividad amidásica y cininogénica se encontró solamente en dos bandas tenues de proteínas (a) y (b) asociadas a las rebanadas de gel entre los 5 y 6,2 cm. Ambas actividades enzimáticas coincidieron con la actividad cininogénica de la banda de proteína (c) que corresponde a una muestra de 1 ug de calicreína urinaria purificada de rata, usada como estandar.

4.- Estudio de la acción de inhibidores.

El efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad cininogénica de la muestra purificada de calicreína glandular del plasma se muestra en la Tabla 2. Se observó inhibición con aprotinina (90 %), benzamidina HCl (60 %) y con anticuerpo anticalicreína urinaria de rata (100 %). No

- 0 -

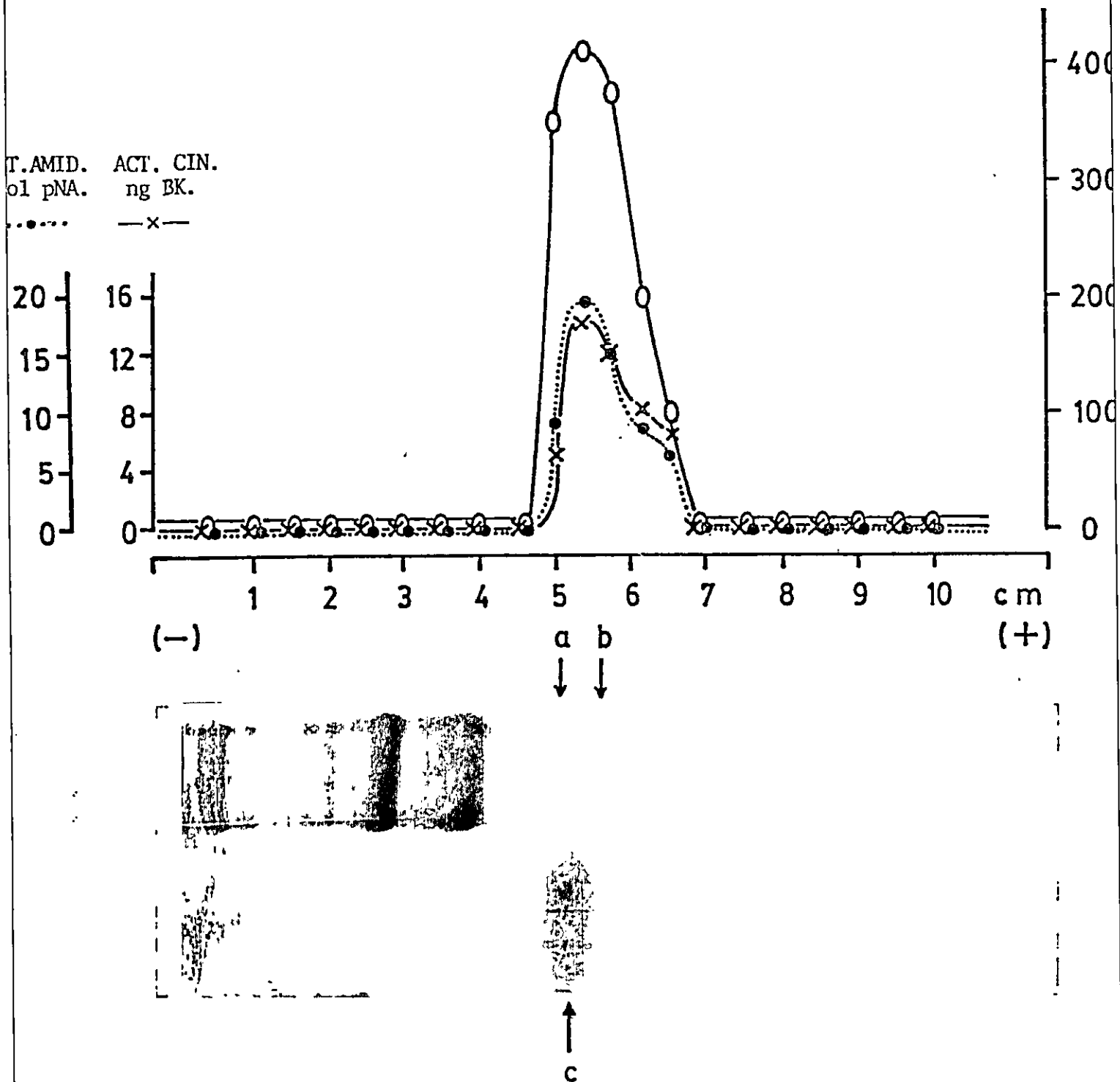


Figura 3.- PAGE al 11% de calicreína glandular del plasma y calicreína urinaria estandar. El gel fue trozado en secciones de 0,4 cm de ancho a las que se midió actividad enzimática. Las actividades cininogenásica (-x-) y amidásica (-●-) de la muestra coincidieron con la actividad encontrada para la calicreína estandar (-o-). Ambas actividades corresponden a las 2 bandas de proteína (a) y (b) localizadas frente a la banda (c), que corresponde a 1 ug de calicreína estandar.

TABLA 2. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD
CININOGENASICA DE 10 ng DE CALICREINA
GLANDULAR DEL PLASMA.

Inhibidor	Actividad cininogénica ng. bradicinina	% Inhibición
. . . .	100
Aprotinina (1 KIU)	10	90
Benzamidina (2,5 nM)	40	60
Ovomucoide (5 ug)	100	0
Anticuerpos anticalicreína (5 ul)	0	100
Anticuerpos inespecíficos (5 ul)	100	0

se encontró inhibición de la actividad al incubar la muestra con ovomucoide o anticuerpos inespecíficos.

ESTUDIO DE LOS VALORES DE CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA
DE RATA.

1.- Nefrectomía bilateral.

Los valores de calicreína glandular en plasma medidos por su actividad cininogénica (RIA) se muestran en la Figura 4. El grupo de ratas nefrectomizadas aumentó al doble los valores de calicreína glandular a las 24 horas de la intervención quirúrgica, siendo este aumento significativo respecto al grupo control ($p < 0,001$). Los valores encontrados fueron $27,2 \pm 1,9$ ng BK/ml/h para el grupo control y $51,8 \pm 6,5$ ng BK/ml/h para el grupo sometido a nefrectomía bilateral. Los valores obtenidos para las mismas muestras midiendo la actividad cininogénica mediante el bioensayo fueron $33,8 \pm 2,3$ ng BK/ml/h para el grupo control contra $56,3 \pm 9,7$ ng BK/ml/h para el grupo nefrectomizado. Se encontró una correlación significativa entre ambos métodos (RIA y bioensayo) para medir la actividad cininogénica de la enzima, con un $r = 0,954$ ($p < 0,001$) (Figura 5).

2.- Ligadura bilateral de uréteres.

El grupo de ratas sometidas a la ligadura bilateral de sus uréteres mostró una disminución significativa ($p < 0,02$) de los valores de calicreína glandular en el

CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA

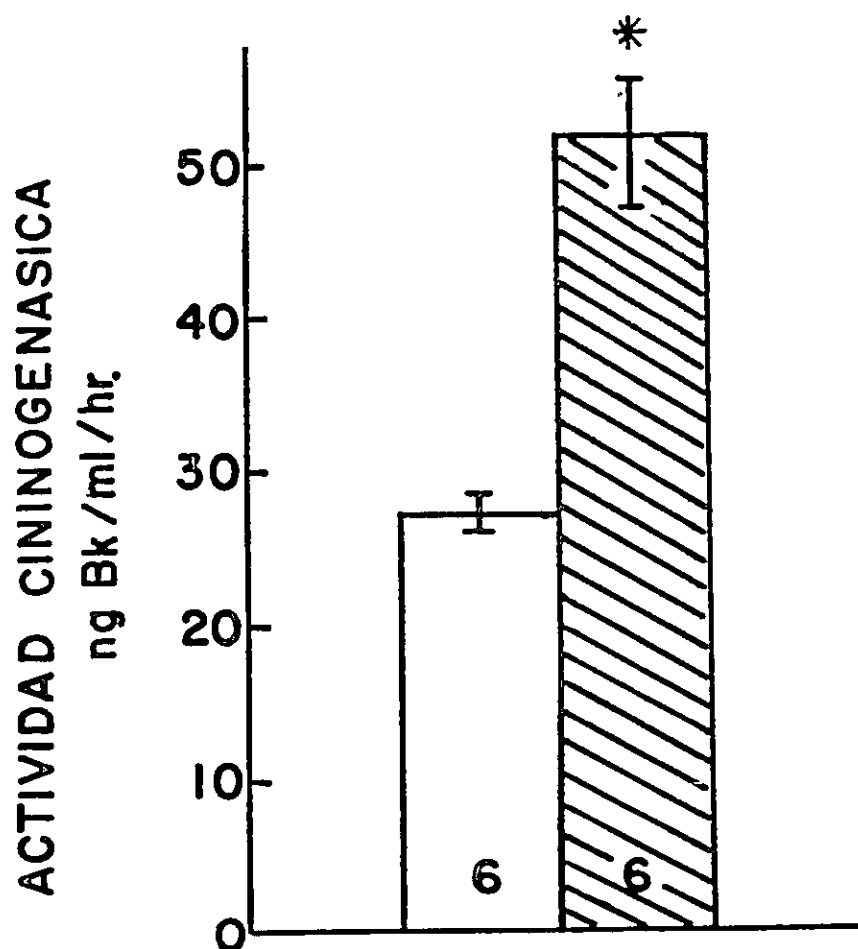


Figura 4.- La columna blanca indica la actividad cininogénica de la calicreína glandular del plasma en ratas control con operación ficticia y la columna achurada, la de ratas nefrectomizadas 24 horas antes de la sangría. El número en las columnas indica los animales en cada grupo.

* Indica diferencia significativa con $p < 0,001$ entre el grupo control y el grupo experimental.

ACTIVIDAD CININOGENASICA DE CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA

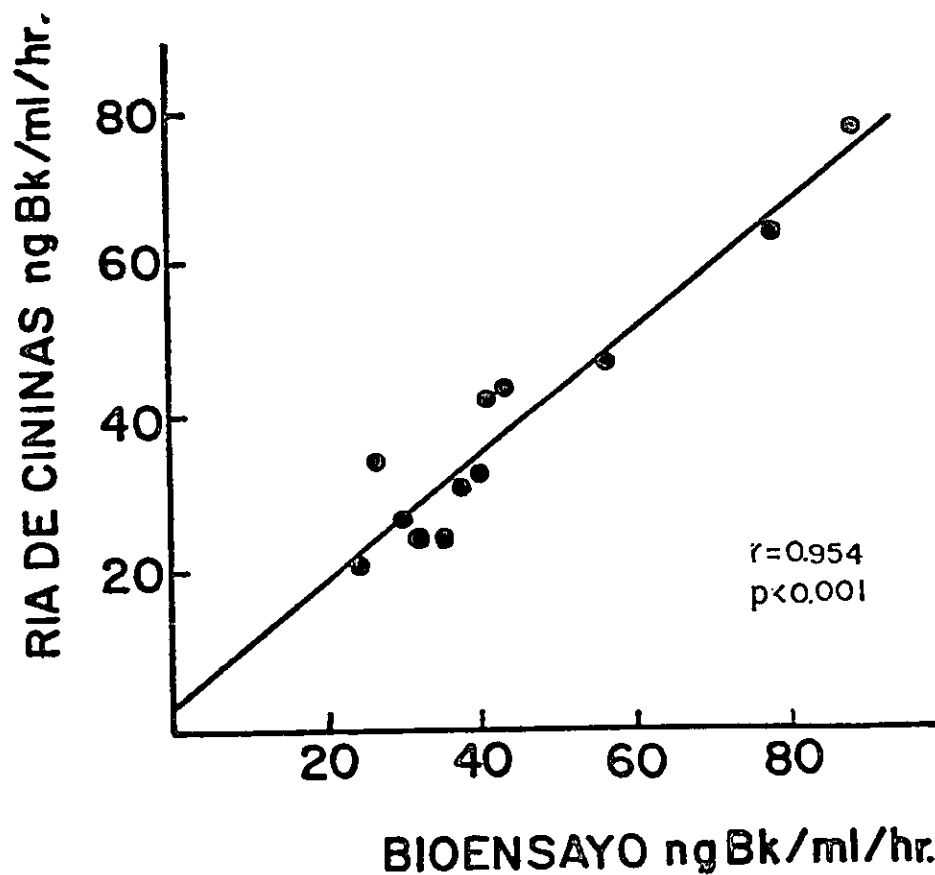


Figura 5.- Comparación entre RIA y bioensayo para cininas. Ambos métodos fueron utilizados para medir la actividad cininogénica de calicreína glandular del plasma de ratas sometidas a nefrectomía bilateral y sus controles.

plasma a las 24 horas de la intervención quirúrgica respecto al grupo control (Figura 6). Los valores encontrados fueron $29,5 \pm 2,6$ ng BK/ml/h para el grupo control contra $17,9 \pm 3,4$ ng BK/ml/h para el grupo sometido a ligadura bilateral de uréteres. Estos valores fueron medidos por RIA.

3.- Dieta hiposódica.

Los resultados obtenidos para calicreína glandular en plasma y calicreína urinaria se muestran en la Figura 7. Los valores de calicreína urinaria aumentaron significativamente al final de la primera y segunda semana en animales con dieta hiposódica respecto al grupo control ($p < 0,05$ y $p < 0,025$ respectivamente). La actividad cininogénásica (RIA) fue $151,3 \pm 18,1$ ug BK/ 8 h/100 gr p.c. contra $231,8 \pm 34,3$ ug BK/8 h/100 gr p.c. la primera semana y $182,7 \pm 16,7$ ug BK/8h/100 gr p.c. contra $259,3 \pm 31,5$ ug BK/8 h/100 gr p.c. la segunda semana para el grupo sometido a dieta normal e hiposódica respectivamente. Los valores de calicreína urinaria obtenidos mediante titulación con bioensayo fueron $175,5 \pm 27,8$ ug BK/8 h/100 gr p.c. para el grupo control y $246,8 \pm 44,1$ ug BK/8 h/100 gr p.c. para el grupo con dieta hiposódica en la segunda semana de tratamiento, encontrándose una correlación significativa entre ambos métodos con $r = 0,82$ y $p < 0,001$ (Figura 8).

CALICREINA GLANDULAR EN EL PLASMA

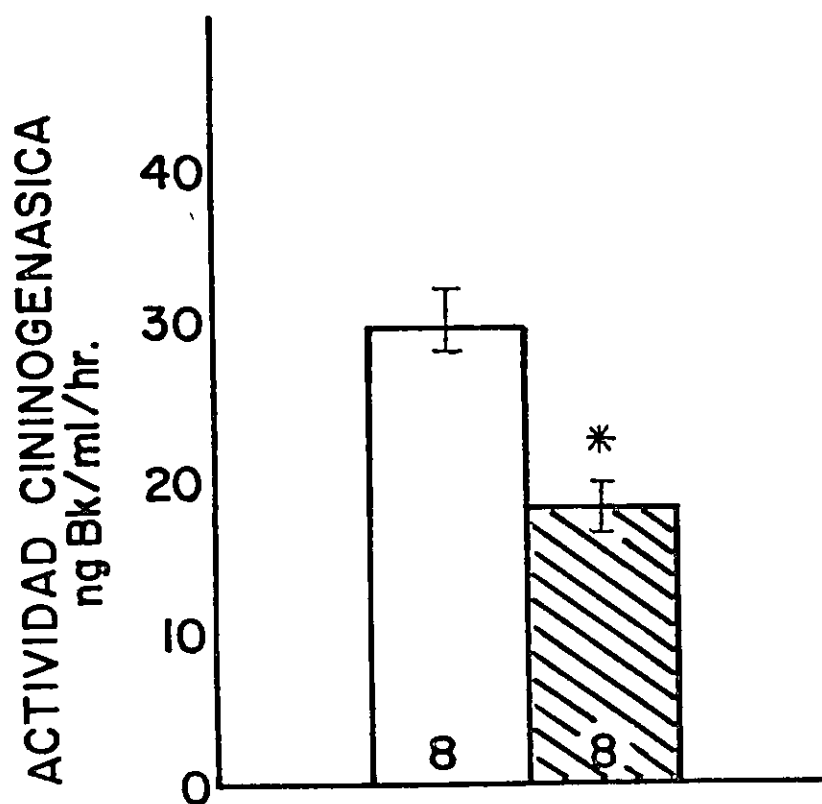


Figura 6.- La columna blanca indica la actividad cininogénica de la calicreína glandular en el plasma de ratas control con operación ficticia y la columna achurada, de ratas con ligadura bilateral de uréteres 24 horas antes de la sangría. El número en las columnas indica los animales en cada grupo. * Indica diferencia significativa con $p < 0,02$ entre el grupo control y el grupo experimental.

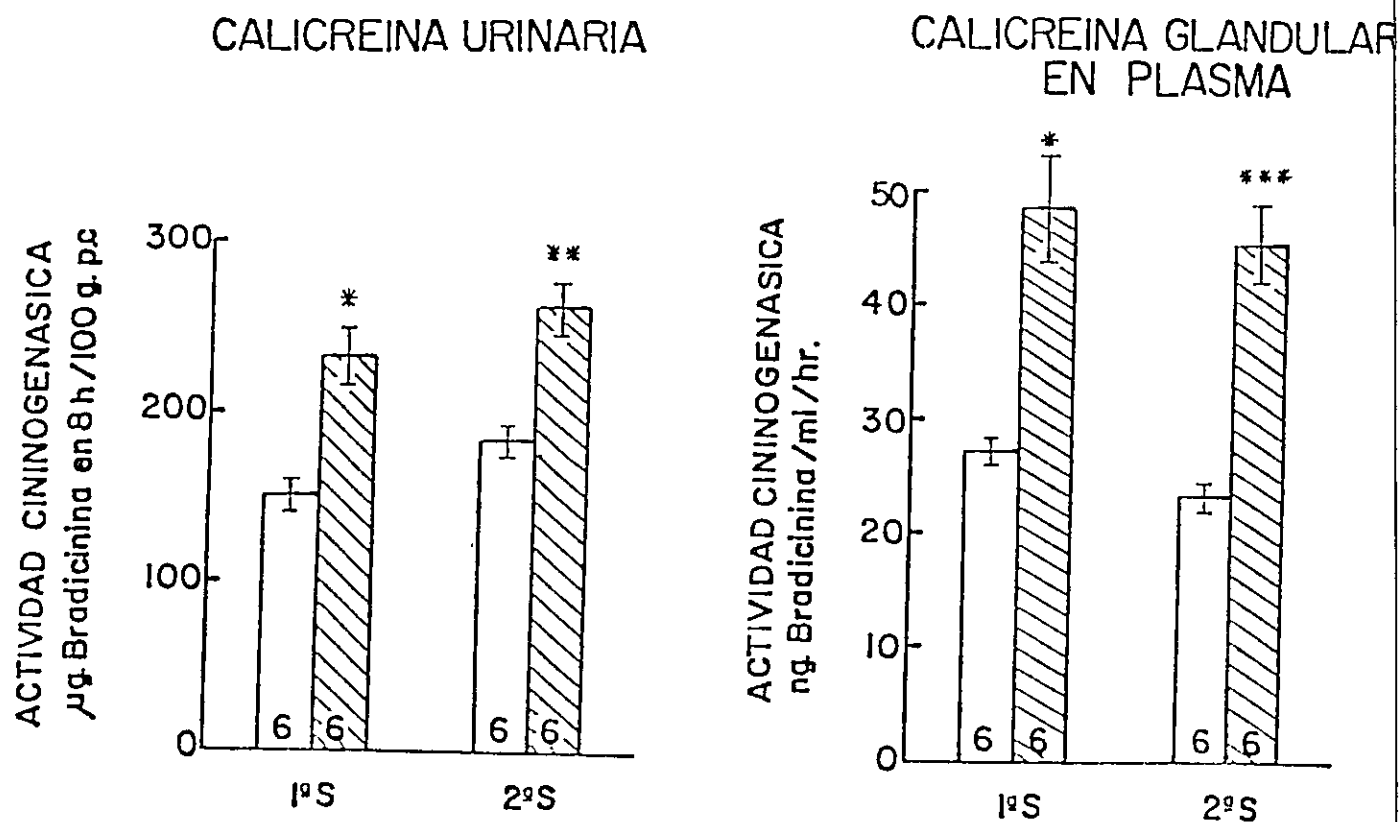


Figura 7.- Efecto de la dieta hiposódica sobre la excreción de calicreína urinaria y contenido de calicreína glandular en el plasma de ratas sometidas a 1 y 2 semanas de tratamiento (columnas achuradas). El grupo control (columnas blancas) se mantuvo con dieta normosódica. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos controles y experimentales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,005$. Los números en las columnas indican los animales en cada grupo.

ACTIVIDAD CININOGENASICA DE CALICREINA URINARIA

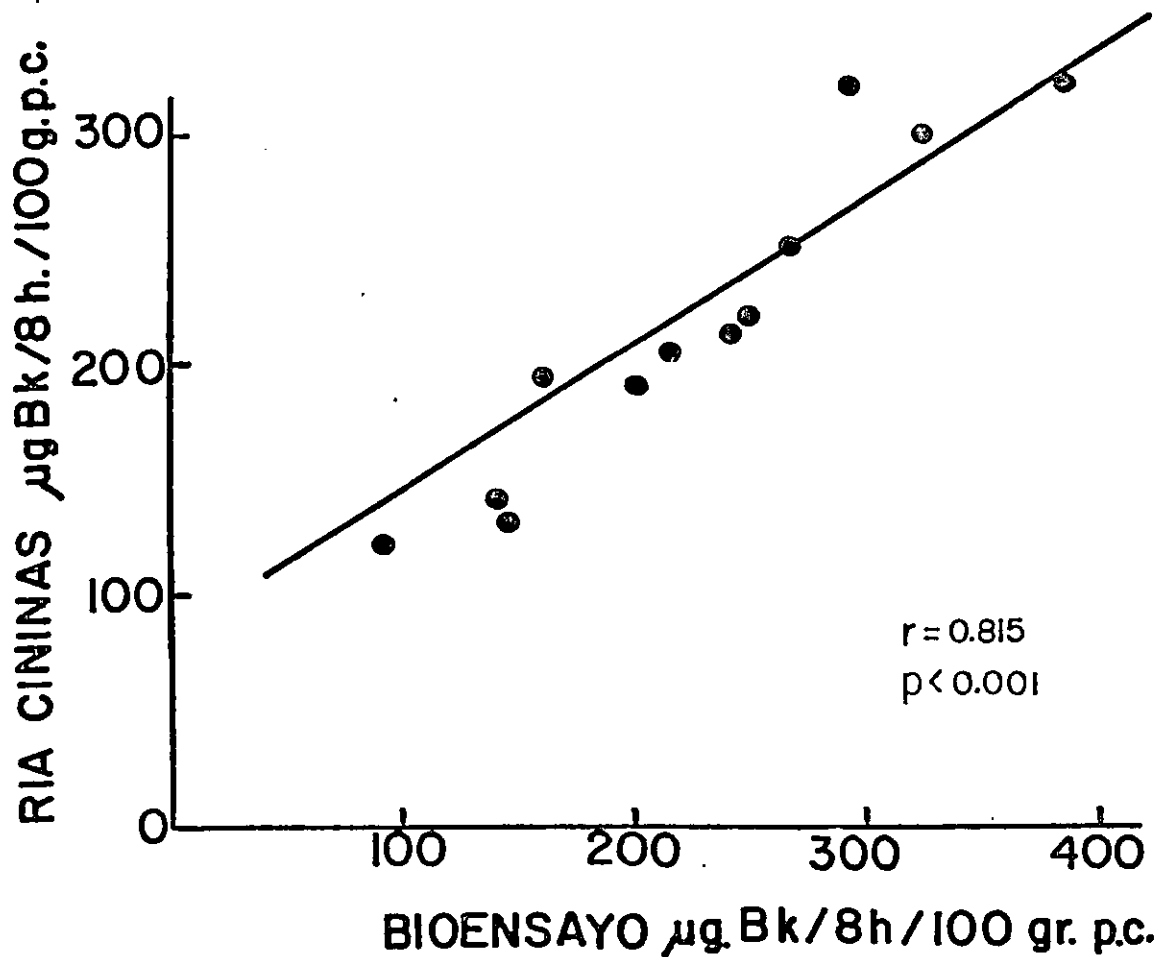


Figura 8.- Comparación entre RIA y bioensayo para medir cininas. Ambos métodos fueron utilizados para medir la actividad cininogénásica de calicreína urinaria en ratas sometidas a dieta hiposódica y normosódica durante 1 y 2 semanas.

La calicreína glandular en el plasma de los mismos animales con dieta hiposódica aumentó también significativamente la primera y segunda semana de tratamiento ($P < 0,05$ y $p < 0,005$ respectivamente) respecto a los grupos controles (Figura 7). Los valores obtenidos fueron $27,3 \pm 3,9$ ng BK/ml/h y $48,5 \pm 9,3$ ng BK/ml/h la primera semana de tratamiento y $23,3 \pm 1,9$ ng BK/ml/h contra $45,3 \pm 7,1$ ng BK/ml/h la segunda semana, para el grupo control y el grupo con dieta hiposódica respectivamente.

Los valores de la actividad cininogénica obtenidos mediante el bioensayo fueron $21,3 \pm 4,1$ ng BK/ml/h para el grupo control y $65,5 \pm 9,6$ ng BK/ml/h para el grupo tratado con dieta hiposódica la primera semana, y $22,0 \pm 5,7$ ng BK/ml/h contra $44,2 \pm 6,3$ ng BK/ml/h respectivamente para la segunda semana. Se encontró una correlación significativa entre los valores obtenidos por RIA y bioensayo con $r = 0,75$ y $p < 0,001$.

La correlación entre los valores de calicreína glandular en el plasma y calicreína urinaria fue significativa con $r = 0,62$ $p < 0,001$ (Figura 9).

La dieta hiposódica produjo una disminución significativa del Na^+ y K^+ urinario en la primera y segunda semana de tratamiento. Estos valores se muestran en la Tabla 3.

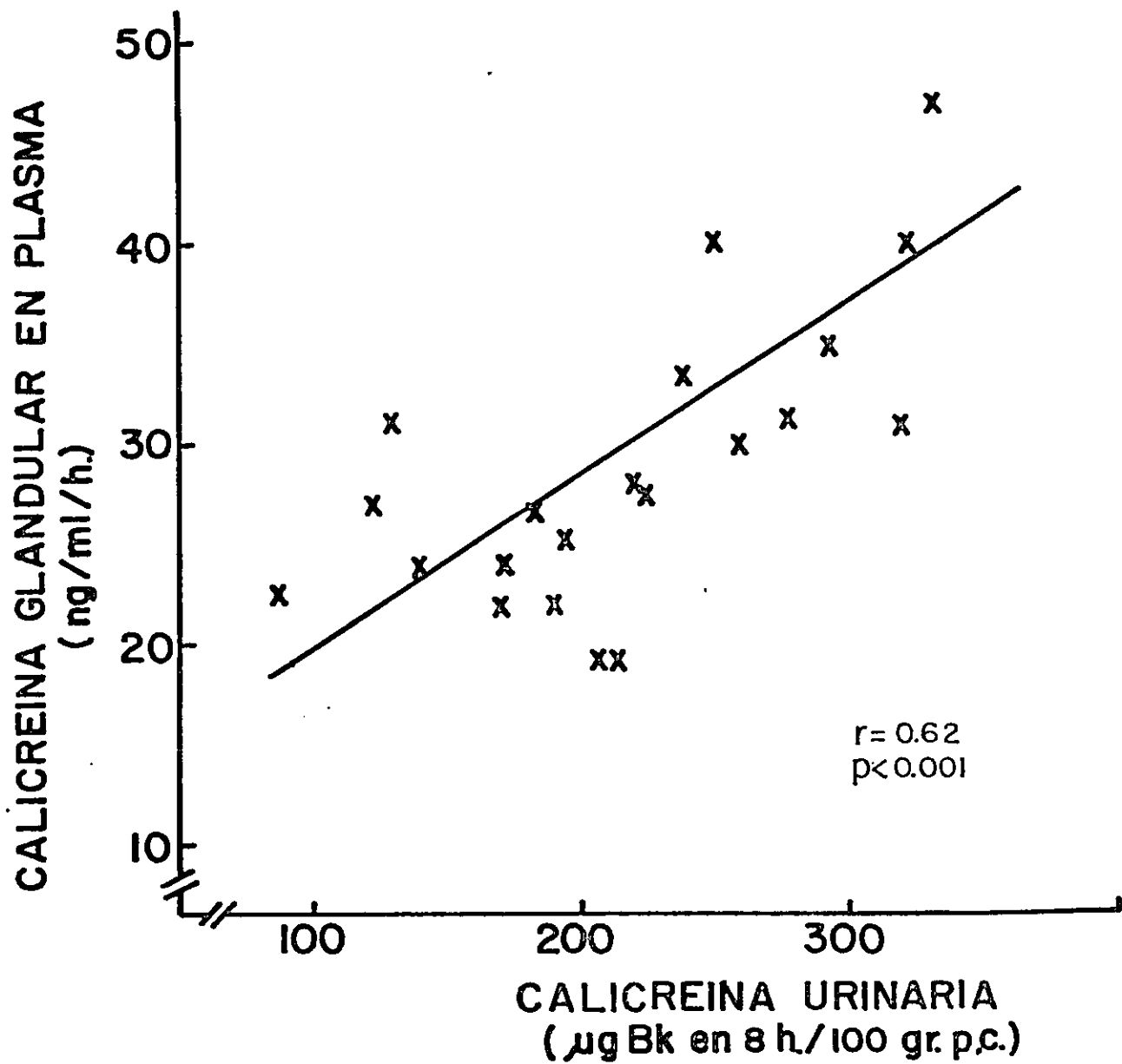


Figura 9.- Correlación entre los valores de la actividad ci ninogénica de calicreína glandular en el plasma y orinas de animales con dieta normo e hiposódica.

TABLA 3. EXCRECION DE Na⁺ Y K⁺ EN RATAS CON DIETA
NORMOSODICA E HIPOSODICA

Condición	n	Semanas tratam.	M. Eq. Na ⁺ en 8/h.	M.Eq. K ⁺ en 8/h.
Controles	6		262,7 ₋ 54,9	316,2 ₋ 51,2
Dieta hipos.	6	1	40,5 ₋ 9,8*	67,2 ₋ 24,6*
Controles	6		179,7 ₋ 27,2	635,3 ₋ 71,4
Dieta hipos.	6	2	28,3 ₋ 6,3*	148,2 ₋ 45,0*

n = número de animales

* Diferencias significativas con $p < 0,001$ entre el grupo control y el grupo experimental.

4.- Hipertensión Goldblatt 1 pinza 1 riñón (G1).

La presión arterial aumentó significativamente ($p < 0,001$) en el grupo G1 a partir de la segunda semana después del pinzamiento de la arteria renal y siguió aumentando hasta la séptima semana (Figura 10). Los valores de calicreína urinaria y calicreína glandular en el plasma de estos animales al final de la séptima semana se muestran en la Figura 11. La calicreína urinaria disminuyó significativamente en el grupo G1 al término de la séptima semana de desarrollo de la hipertensión ($p < 0,001$). $209,3 \pm 12,0$ ug BK/8 h/100 gr p.c. y $144,1 \pm 12,0$ ug BK/8 h/100 gr p.c. fueron los valores para el grupo control y G1 respectivamente. La calicreína glandular del plasma no mostró diferencia significativa entre el grupo control y G1, siendo los promedios entre ambos muy semejantes ($26,4 \pm 2,7$ ng BK/ml/h y $26,9 \pm 3,9$ ng BK/ml/h). La correlación con los valores medidos por el bioensayo fue significativa con $r = 0,91$, $p < 0,005$.

No se observaron diferencias significativas en la excreción de Na^+ y K^+ entre los animales control y G1 en la séptima semana. Los valores encontrados fueron $728,9 \pm 42,9$ uequiv. Na^+ /8 h, $464,0 \pm 20,1$ uequiv. K^+ /8h y $553,3 \pm 99,2$ uequiv Na^+ /8 h, $563,8 \pm 63,9$ uequiv. K^+ /8h para los grupos control y experimental respectivamente. Se encontró una correlación negativa significativa entre los

PRESION ARTERIAL

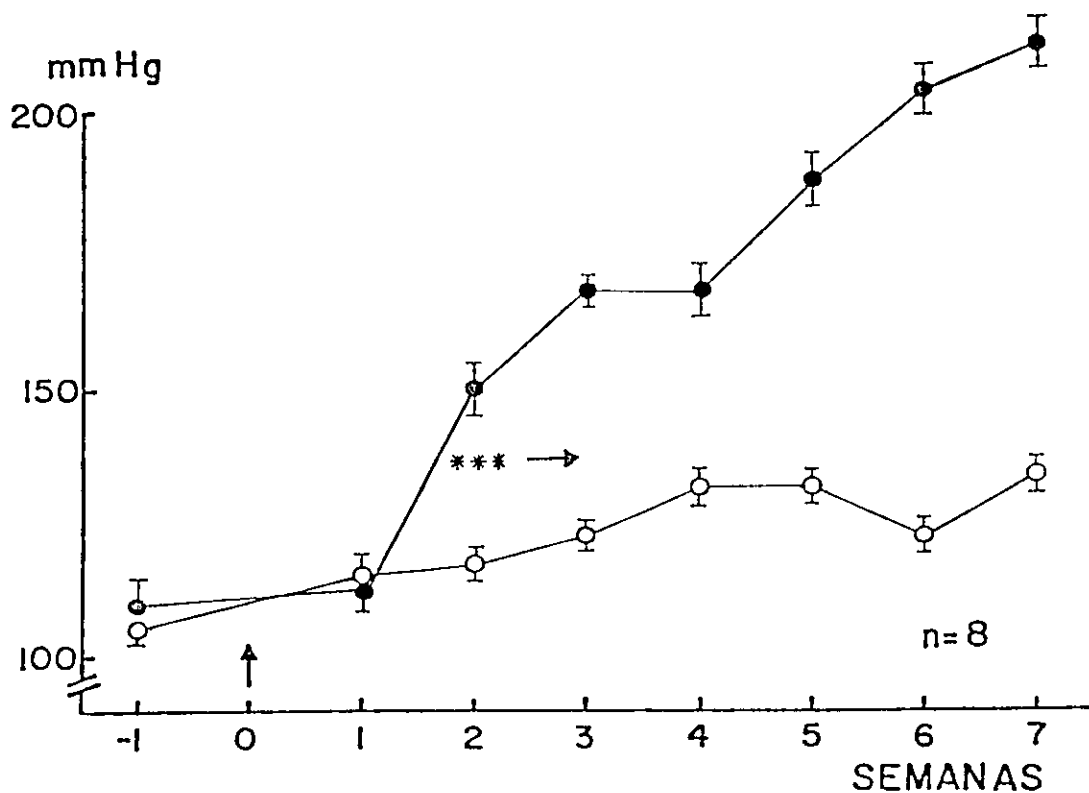


Figura 10.- Promedios \pm error estandar de los valores de presión arterial en mm Hg. El círculo lleno corresponde a los animales con pinza en una arteria renal y nefrectomía contralateral. El círculo abierto a los controles unilaterales nefrectomizados. En el eje de la abcisa se indica con 0 y una flecha vertical el momento de la intervención quirúrgica y con -1 los valores de presión obtenidos durante la semana anterior a dicha intervención. *** Diferencia significativa con $p < 0,001$ entre los valores de presión arterial de ambos grupos de animales. La flecha horizontal indica que la misma significancia estadística se mantuvo hasta el final del experimento. n= N° de animales en cada grupo.

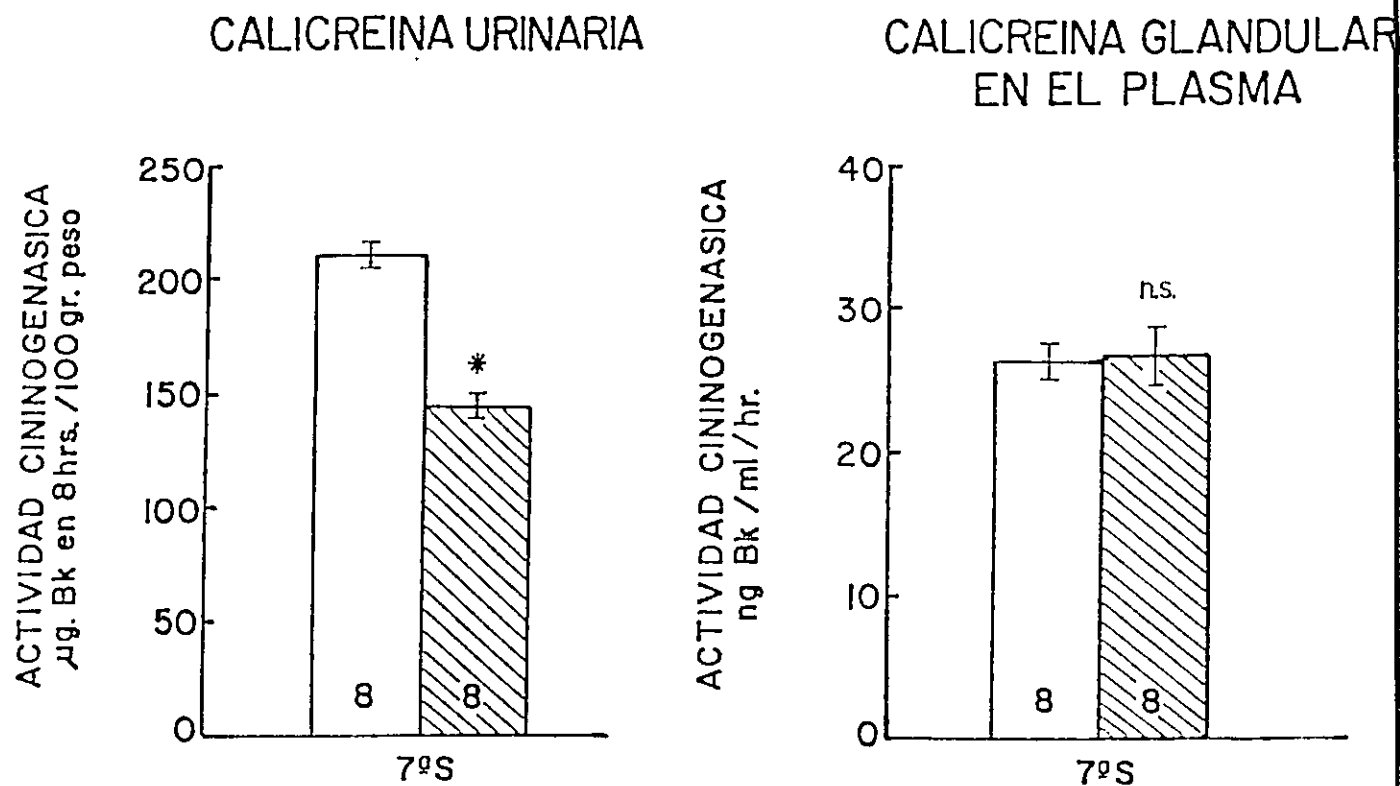


Figura 11.- Calicreína urinaria y calicreína glandular en el plasma de ratas con hipertensión experimental Goldblatt 1 riñón - 1 pinza (columnas achuradas) y sus controles uninefrectomizados (columnas blancas). Las mediciones corresponden a muestras obtenidas 7 semanas después del pinzamiento de la arteria renal o de la operación ficticia. Los números en las columnas corresponden a los animales en cada grupo. * Indica diferencia significativa con $p < 0,01$ entre el grupo control y el grupo experimental.

valores de presión arterial y calicreína urinaria ($r=-0,71$, $p < 0,005$) y entre presión arterial y Na^+ excretado ($r=-0,64$, $p < 0,005$). No hubo correlación significativa entre calicreína urinaria y calicreína glandular del plasma, ni entre ésta y presión arterial.

DISCUSION

La presencia de calicreína glandular en la sangre ha sido demostrada por radioinmunoensayo (25 - 29). Sin embargo, debido a las bajas concentraciones de material inmunoreactivo encontrado (29) no ha sido posible medir su actividad enzimática sobre sustratos sintéticos o naturales específicos. El procedimiento de purificación aquí descrito, permite separar y caracterizar una substancia que puede ser identificada como calicreína del tipo glandular porque muestra actividad enzimática sobre el sustrato natural, cininógeno de bajo peso molecular obtenido de plasma de rata (37); hidroliza el sustrato sintético S-2266 específico para calicreína glandular (36) y ambas actividades enzimáticas son completamente inhibidas por anticuerpos contra calicreína urinaria.

Para purificar este material activo se usó en una primera etapa un fraccionamiento con sulfato de amonio (30 - 70 %) para desechar proteínas de alto peso molecular las que podrían interferir en la cromatografía posterior. La etapa siguiente en la purificación fue una cromatografía de afinidad Sefarosa - Aprotinina, un inhibidor de calicreína glandular, empleándose p-aminobenzamidina, un inhibidor competitivo, para eluir la enzima en forma específica.

En esta etapa se obtuvo una purificación de 250 veces con un rendimiento del 71 %. Estos valores fueron calculados usando calicreína-I¹²⁵ como trazador. Este factor de purificación fue suficiente para el propósito del trabajo, que no era obtener la enzima pura, sino montar un método que permitiera titular la calicreína glandular del plasma manteniendo intacta la actividad biológica de la enzima. La actividad cininogenásica del eluido de la columna Sefarosa-Aprotinina medida mediante bioensayo y la actividad amidásica sobre el sustrato sintético S-2266 están asociadas exclusivamente con dos bandas tenues de proteína de migración electroforética igual a la calicreína urinaria usada como estandar. Este resultado sugiere que la actividad es debida a la presencia de calicreína glandular activa en el plasma de rata. La presencia, en las muestras de eluido, de calicreína plasmática que pudiera haber sido activada está descartada debido a que el material activo migra junto a la calicreína urinaria estandar de peso molecular aproximadamente 35.000 y su actividad enzimática no es inhibida por ovomucoide, un inhibidor específico para calicreína plasmática, pero sí es inhibida por anticuerpos específicos anti calicreína urinaria de rata, por aprotinina y por benzamida, inhibidores de la calicreína glandular. Estos resultados difieren de los descritos por Lawton et al. (27) que, usando una columna de Bio-Gel A, encontró un material

inmunoreactivo similar a calicreína glandular, pero sin actividad amidásica o cininogenásica. Esta diferencia puede deberse a que el material descrito por Lawton et al. puede ser un producto de degradación de calicreína activa producido por proteólisis durante el proceso de caracterización (27) resultando un péptido con actividad inmunológica pero no enzimática. Los estudios de recuperación incubando muestras de calicreína-I¹²⁵ con plasma intacto, indican que in vitro, la unión de calicreína activa a proteínas plasmáticas ocurre muy lentamente. Otros autores (39) demostraron que la calicreína pancreática de cerdo es también inactivada muy lentamente por el suero humano, encontrando un 66 % de inactivación a las 14 horas de incubación. Esto sugiere que la rápida inactivación de calicreína glandular "in vivo" podría deberse a la acción metabólica por parte de algunos órganos tales como el riñón, más que a la unión con inhibidores. La presencia de calicreína glandular en el plasma de rata, demostrada a través de su actividad enzimática en este trabajo y mediante inmunoreactividad por otros autores (25 - 29) sugieren que esta enzima podría participar en la homeostasis circulatoria debido a su capacidad de liberar cininas, potentes péptidos de acción vasodilatadora.

Con el fin de validar nuestro método de titulación y de estudiar la participación del riñón en la entrega de

calicreína al plasma, cuantificamos los niveles de la enzima activa en el plasma de rata frente a estímulos agudos y crónicos que comprometían la función renal. En ausencia de riñones (nefrectomía bilateral) los valores de calicreína activa en el plasma se duplicaron a las 24 horas de la extirpación. Esta respuesta puede atribuirse o a una mayor entrega de enzima por parte de otras glándulas como las salivales, submaxilares o el páncreas, o a una activación de la forma proenzima circulante por efecto del aumento de proteasas plasmáticas que se produce como consecuencia de la nefrectomía. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Rabito et al. (29) y Lawton et al. (27) usando RIA directo para titular calicreína glandular en plasma. Por otra parte, al ligar bilateralmente los uréteres, lo que disminuye aproximadamente a 1/6 la tasa de filtración glomerular renal a las 24 horas de la intervención quirúrgica (40) los valores de calicreína glandular en el plasma disminuyeron significativamente. La presencia del tejido renal, aunque el riñón no cumpla su función normal de filtración, invierte la situación observada en la nefrectomía. Esto podría atribuirse a una menor capacidad de síntesis o de entrega de la enzima por efecto del aumento de la presión intratubular. Estos resultados contradicen la hipótesis de que el riñón participaría solamente en el proceso de depuración de la enzima. (41).

La dieta hiposódica, diseñada por nosotros, produjo un aumento significativo en la cantidad de calicreína urinaria, efecto ampliamente descrito como respuesta a una baja ingesta de sodio (42,43). Paralelo al aumento en los niveles de calicreína urinaria, se encontró un incremento significativo en la cantidad de calicreína glandular del plasma de los mismos animales, con una correlación significativa entre el contenido de la enzima en la orina y el plasma. Por lo tanto, el estímulo que induce una mayor entrega de calicreína al túbulo también es efectivo para la entrega de la enzima al territorio vascular. Recientemente se ha demostrado, mediante técnicas inmunocitoquímicas, que la calicreína se encuentra asociada tanto a la membrana luminal como basolateral de las células del túbulo renal distal (44). Este hallazgo avala nuestros resultados, pues la enzima por su ubicación en la célula tubular puede ser entregada tanto al túbulo renal y aparecer en la orina, como al intersticio y aparecer en la sangre. No podemos indicar cuales son los estímulos que producen el aumento en los niveles de la enzima por efecto de nuestra dieta considerada hiposódica, porque debido a los valores de excreción de sodio y potasio observados, aparentemente estos animales estuvieron sometidos a una ingesta deficiente en ambos elementos. Sin embargo, se ha logrado el objetivo de este protocolo, que era producir cambios en la excreción de la enzima y ver si ellos se acompañaban de cambios

en sus valores plasmáticos. Para afirmar que el aumento de calicreína en orina y en plasma es atribuible a un déficit de sodio, será necesario repetir este protocolo midiendo el contenido de potasio en la dieta descrita y adicionando gluconato de potasio en caso que resulte deficitaria en este elemento.

El sistema calicreína-cininas renal se ha estudiado intensamente por la participación que tendría en el desarrollo y mantención de la hipertensión, pues en animales con hipertensión experimental crónica, genética y en pacientes con diversos tipos de hipertensión clínica, la cantidad de calicreína excretada por la orina está significativamente disminuída (15-18). Hasta ahora se ha estudiado la calicreína urinaria como un reflejo de lo que ocurre a nivel renal, pero no se sabe si podría participar en la ruptura del equilibrio homeostático a nivel sistémico. En este trabajo confirmamos hallazgos anteriores que demuestran una disminución significativa en el contenido de calicreína urinaria en la fase crónica de la hipertensión Goldblatt 1 riñón (6). Sin embargo, no se observó una disminución del contenido de calicreína glandular activa en el plasma de estas mismas ratas hipertensas. Esto sugiere, que en este modelo de hipertensión renovascular el sistema calicreína-cininas podría estar comprometido en esta patología por su acción local intrarenal y no en la alteración de la resistencia vascular periférica.

En resumen, el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo nos permite resaltar algunos hechos:

- 1.- Hemos logrado desarrollar un procedimiento válido para cuantificar la presencia de calicreína glandular biologicamente activa en el plasma, más específico que el RIA directo empleado por otros autores (25-29). El RIA directo, en efecto, es afín a todas las formas posibles de la enzima: calicreína activa, procalicreína, calicreína-inhibidor o fragmentos inactivos que conserven los sitios antigénicos reconocibles por los anticuerpos anticalicreína glandular.
- 2.- Al poder medir cambios en las cantidades de la enzima activa contenida en el plasma, en respuesta a variados estímulos que modifican la función renal, podemos afirmar que el sistema calicreína-cininas no sólo tiene un papel local sino también sistémico que deberá ser estudiado.
- 3.- Nuestros resultados indican que el riñón entrega calicreína glandular a la circulación, pero que no es la única y tal vez tampoco la principal fuente de ella.

- 4.- El método que hemos desarrollado implica un largo proceso. Creemos que es posible perfeccionarlo en cuanto a duración y rendimiento, empleando columnas Sefarosa-Aprotinina para pequeñas alícuotas de plasma y un RIA directo para titular las muestras eluidas.

REFERENCIAS

- 1.- Levinsky, N.G.:
The renal kallikrein-kinin system.
Circ. Res. 44:441-451, 1979.
- 2.- Kaplan, A.P., Meir, H.L., Yecies, L.D. and Heck, L.W.:
Hageman factor and its substrates: The role of factor XI,
prekallikrein and plasminogen proactivator in coagulation,
fibrinolysis and kinin generation.
Chemistry and biology of the kallikrein kinin system in
health and disease: pp 237-254 (Eds) Pisano, J.J. and
Austen, K.F., Fogarty International Center Proceedings,
N°27, Bethesda, 1977.
- 3.- Elliot, A.H. and Nuzum, F.R.:
The urinary excretion of a depressor sustance (kallikrein
of Frey and Kraut) in arterial hypertension.
Endocrinology 18:462-467, 1934.
- 4.- Croxatto, H.R., Albertini, R., Roblero, J. and Corthorn,
J.:
Renal kallikrein (kininogenase activity) in hypertensive
rats.
Acta Physiol. Latinoam. 24:439-442, 1974.

- 5.- Croxatto, H. R., Albertini, R., Corthorn, J. and Rosas, R.:
Kallikrein and kinins in hypertension.
Hypertension, Genest, J., Koiw, W., Kuchel, O. Ed. Mc Grow Hill Co., N. York, 1976.
- 6.- Albertini, R., Rosas, R., Croxatto, H.R. and Roblero, J.:
Kallikrein-kinin system in one and two kidney Goldblatt hypertensive rats.
Clin. Sci.: 56: 227-233, 1979.
- 7.- Mills, I.H.:
Kallikrein kininogen and kinins in control of blood pressure.
Nephron 23:61-71, 1979.
- 8.- Keiser, H.:
The kallikrein-kinin system in essential hypertension.
Clin. and Exp. Hypertension 2(3 & 4): 675-691, 1980.
- 9.- Albertini, R. and Oliveri, P.:
Calicreína renal y actividad renínica del plasma en la hipertensión renovascular en ratas.
Revista Hispano-Americana de Hipertensión Arterial 1(1):5-12, 1982.
- 10.- Levy, S.B., Frigon, R.P. and Stone, R.A.:
The relationship of urinary kallikrein activity to renal salt and water excretion.
Clin. Sci. Mol. Med. 54:39-45, 1978.

- 11.- Ørstavik, T.B., Nustad, K., Brandtzal, G.P. and Pierce, T.V.:
Cellular origin of urinary kallikrein
J. Histochem. Cytochem. 24:1037-1039, 1976.
- 12.- Scicli, A.G., Carretero, O.A., Hampton, A., Cortes, P. and Oza, N.:
Site of kininogenase secretion in the dog nephron.
Am. J. Physiol. 230:533-536, 1976.
- 13.- Figueroa, C.P., Caorsi, I., Subiabre, J. and Vio, C.P.:
Immunoreactive kallikrein localization in the rat kidney: an immunoelectron microscopic study.
J. Histochem. Cytochem. 32:117, 1984.
- 14.- Nustad, K., Vaaje, K. and Pierce, J.V.:
Synthesis of kallikreins by rat kidney slices.
Br. J. Pharmac. 53:229-234, 1975.
- 15.- Croxatto, H.R. and San Martín, M.:
Kallikrein-like activity in the urine of renal hypertensive rats.
Experientia 26:1216-1217, 1970.
- 16.- Margolius, H.S., Geller, R., De Jong, W., Pisano, J.J. and Sjoerdsma, A.:
Altered urinary kallikrein in rats with hypertension
Circ. Res. 30:358-362, 1972.

- 17.- Margolius, H.S., Geller, R., Pisano, J.J. and Sjoerdsma, A.:
Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension.
Lancet 2:1063 - 1065, 1971.
- 18.- Porcelli, G., Bianchi, G. and Croxatto, H.R.:
Urinary kallikrein excretion in spontaneously hypertensive strain of rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 149:983-986, 1975.
- 19.- Carretero, O.A., Oza, N.B., Scicli, A.G. and Schork, A.:
Renal tissue kallikrein, plasma renin and plasma aldosterone in renal hypertension.
Acta Physiol. Latinoam. 24:448-452, 1974.
- 20.- Albertini, R., Roblero, J., Corthorn, J. and Croxatto, H.R.:
Blood kininogen in uninephrectomized and hypertensive rats.
Acta Physiol. Latinoam. 24:443-447, 1974.
- 21.- Croxatto, H.R., Corthorn, J., Roblero, J., García, R. and Albertini, R.:
Blood kininogen in renal hypertensive rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 147:1-6, 1974.

- 22.- Mc Giff, J.C., Terragno, D.A., Terragno, N.A., Colina, J. and Nasjletti, A.:
Prostaglandins as modulator and mediators of kinins. Chemistry and biology of the kallikrein-kinin system in health and disease. pp 267-273, Ed. Pisano, J.J. and Austen, K.F., Fogarty International Center Proceedings, N^o 27, Bethesda, 1977.
- 23.- Roblero, J., Croxatto, H.R. and Albertini, R.:
Release of renal kallikrein to the perfusate by isolated rat kidney.
Experientia 32:1920-1941, 1976.
- 24.- Yamada, K., Schulz, W., Page, D.S., and Erdős, E.G.:
Kallikrein and prekallikrein on the basolateral membrane of rat kidney tubules.
Hypertension 3:II-59 - II-64, 1981.
- 25.- Nustad, K., Gautvik, K.M., Ørstavik, T.B.:
Radioimmunoassay of rat submandibular gland kallikrein and the detection of immunoreactive antigen in blood.
Kinins II, Vol 120 A: 225-234, 1979.
- 26.- Rabito, S.F., Scicli, A.G. and Carretero, O.A.:
Immunoreactive glandular kallikrein in plasma. Enzymatic release of vasoactive peptides. Cross, F. and Vogel, G. Ed. New York, Raven.:247-258, 1980.

- 27.- Lawton, W.J., Proud, D., Frech, M.E., Pierce, J.V.,
Keiser, H.R. and Pisano, J.J.:
Characterization and origin of immunoreactive glandular
KK in rat plasma.
Biochem. Pharmac. 30:1731-1737, 1981.
- 28.- Oza, N.B.:
Development of a rat urinary kallikrein-binding radio
immunoassay and identification of homologous enzyme in
plasma.
J. Clin. Chem. Biochem. 19: 1033-1038, 1981.
- 29.- Rabito, S.F., Scicli, A.G., Kher, V. and Carretero, O.A.:
Immunoreactive glandular kallikrein in rat plasma: a
radioimmunoassay for its determination.
Am. J. Physiol. 242: H602-610, 1982.
- 30.- Nustak, K., Ørstavik, T.B., Gautvik, K.M. and Pierce,
J.V.:
Glandular kallikreins.
Gen. Pharmacology 9:1 1978b.
- 31.- De Bono, E. and Mills, I.H.:
Simultaneous increases in kallikrein renal, lymph and
urine during saline infusion.
J. Physiol. (Lond.) 241, 127, 1974.
- 32.- Cuatrecasas, P., Wilcker, M. and Anfinsen, C.B.:
Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61:636-643, 1968.

- 33.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.T., Farr, A.L. and Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
- 34.- Oza, N.B., Amin, V.M., Mc Gregor, R.K., Scicli, A.G. and Carretero, O.A.:
Isolation of rat urinary kallikrein and properties of its antibodies.
Biochem. Pharmac. 25:1607-1612, 1976.
- 35.- Laemli, V.K. and Favre, M.:
Maturation of the head of bacterophage T4.
J. Mol. Biol. 80:575-599, 1973.
- 36.- Amundsend, E., Pütter, J., Friberger, P., Knas, M., Larsbraaten, M. and Glaesan, G.:
Methods for the determination of glandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptide substrate.
Adv. Exp. Med. Biol. 120A, 83, 1979.
- 37.- Jacobsen, S. and Kriz, M.:
Some data on two purified kininogen from human plasma.
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 29:25, 1967.
- 38.- Hunter, W.M. and Greenwood, F.G.:
Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity.
Nature 194:495-496, 1962.

- 39.- Vahtera, E. and Hamberg, V.:
Absence of binding of pancreatic and urinary kallikreins
to α_2 macroglobulin.
Biochem. J. 157:521-524, 1976.
- 40.- Harris, R. and M Gill, J.:
Changes in glomerular filtration rate during complete
ureteral obstruction in rats.
Kidney International 19:603-608, 1981.
- 41.- Fink, E., Geiger, R., Witte, J., Biedermann, S., Seifert,
J. and Fritz, H.:
Biochemical, pharmacological and functional aspects of
glandular kallikreins.
Enzymatic release of vasoactive peptides. Cross, F. and
Vogel, G. eds. Raven Press, N. York, 101-115, 1980.
- 42.- Mills, I.H., Mac Farlane, N.A., Ward, P.E. and Obika,
L.F.:
The renal kallikrein-kinin system and the regulation of
salt and water excretion.
Federation Proc. 35:181-188, 1976.
- 43.- Omata, K., Carretero, O.A., Sadayoshi, I. and Scicli,
A.G.:
Active and inactive kallikrein in rabbit connecting
tubules and urine during low and normal sodium intake.
Kidney International 24:714-718, 1983.

44.- Figueroa, C.D., Caorsi, I. and Vio, C.P.:

Visualization of renal kallikrein in luminal and basolateral membranes. Effect of the tissue processing method.

J. Histochem. Cytochem. (en prensa), 1984.