

INCORPORACION DE LEUCINA TRITIADA  
A CALICREINA EN CORTES DE TEJIDO 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

POR

MARIA DEL PILAR GARCIA MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS:

PROF. RENATO ALBERTINI B.  
LABORATORIO DE FISIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

PROFESOR PATROCINANTE:

DR. FERNANDO ZAMBRANO B.  
LABORATORIO DE FISIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

1985

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION DE  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, que la tesis de Magister presentada por la candidata

MARIA DEL PILAR GARCIA MARTINEZ

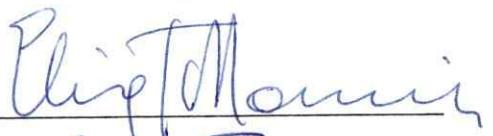


ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología.

Director de Tesis:  
Prof. Renato Albertini  
Profesor Patrocinante  
Dr. Fernando Zambrano

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

COMISION INFORMANTE:

Dra. Elisa Marusic  
Dr. Mario Rosenmann  
Dr. Juan Roblero

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

*A mis padres.*

## Agradecimientos

Al finalizar este trabajo, quiero agradecer a todas las personas que lo hicieron posible.

Al Dr. Renato Albertini, le doy las gracias por su apoyo y estímulo durante mi permanencia en el Laboratorio.

Al Dr. Fernando Zambrano, le agradezco su confianza y ayuda permanente.

A todos mis amigos de Fisiología, por hacer del laboratorio un lugar de trabajo grato y estimulante.

A Inés, María Eugenia y Jaime, gracias por su sincera amistad y cariño durante estos años, y por su gran apoyo " a la distancia".

Agradezco al Dr. Luis Roblero y al Dr. Alfredo de Ioan nes sus consejos y ayuda técnica.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia por su paciencia, comprensión y cariño.

## INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE	III
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
SUMMARY	XII
INTRODUCCION	1
MATERIALES	7
Animales	7
Reactivos	7
Equipos	8
METODOS	9
OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-CALICREINA URINARIA DE RATA	9
1.1 Inmunización	9
1.2 Procesamiento del suero	10
1.3 Purificación de inmunoglobulina G (IgG)	10
A) Fraccionamiento salino con sulfato de amonio	10
B) Cromatografía en DEAE-celulosa	11

	Pág.
1.4 Caracterización del suero y las fracciones obtenidas en cromatografía de DEAE-celulosa	11
A) Determinación de proteínas	11
B) Inmunodifusión	11
C) Determinación de la actividad por ELISA	12
D) Capacidad inhibitoria	13
E) Unión del anticuerpo, fracción IgG, a la calicreina	14
PREPARACION DEL ANTIGENO MARCADO	15
2.1 Iodación	15
2.2 Unión de calicreina- $^{125}\text{I}$ a anticuerpos específicos	15
SINTESIS "IN VITRO" DE CALICREINA RENAL	17
3.1 Incubación de cortes de tejido renal	17
3.2 Consumo de glucosa en el medio de cultivo	18
CUANTIFICACION DE LA CALICREINA RENAL SINTETIZADA "IN VITRO"	19
4.1 Inmunoprecipitación	19
4.2 Recuperación de la enzima	20
4.3 Migración del inmunoprecipitado en geles de Poliacrilamida	20
4.4 Curva de precipitación de calicreina- $^{125}\text{I}$ con PEG.	22

	Pág.
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE O <sub>2</sub> EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA SINTESIS DE CALICREINA EN EL TEJIDO DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS	24
5.1 Protocolos experimentales	24
RESULTADOS	26
OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-CALICREINA URINARIA DE RATA	26
1.1 Cromatografía en DEAE-celulosa	26
1.2 Determinación de la actividad por ELISA	26
1.3 Inmunodifusión	29
1.4 Capacidad inhibitoria	30
1.5 Unión del anticuerpo anti-caliceína urinaria, fracción IgG, a caliceína	32
PREPARACION DEL ANTIGENO MARCADO	32
2.1 Iodación de caliceína urinaria de rata	32
SINTESIS IN VITRO DE CALICREINA RENAL	35
3.1 Consumo de glucosa en el medio de cultivo	35
CUANTIFICACION DE LA CALICREINA RENAL SINTETIZADA "IN VITRO"	37
4.1 Niveles de recuperación de la enzima	37
4.2 Migración del inmunoprecipitado en geles de Poliacrilamida	38
4.3 Curva de precipitación de caliceína- <sup>124</sup> I con PEG	38

	Pág.
VALORES DE CALICREINA SINTETIZADA "IN VITRO" POR TEJIDO RENAL DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS EN UNA ATMOSFERA CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE OXIGENO	42
5.1 Valores de presión arterial	42
5.2 Síntesis de proteínas totales medida por incorporación de leucina - ( $^3\text{H}$ )	44
A) Incubación en una atmósfera de 95% oxígeno y 5% $\text{CO}_2$	44
B) Incubación en una atmósfera de 95% aire y 5% $\text{CO}_2$	44
5.3 Síntesis de calicreina medida por incorporación de leucina - ( $^3\text{H}$ )	44
A) Incubación en una atmósfera de 95% oxígeno y 5% $\text{CO}_2$	
B) Incubación en una atmósfera de 95% aire y 5% $\text{CO}_2$ .	
DÍSCUSION	49
REFERENCIAS	56



#### ABREVIATURAS

CUR	:	Calicreina urinaria de rata.
IgG	:	Inmunoglobulina G.
BSA	:	Seroalbúmina de bovino.
PEG	:	Polietilén glicol.
Bis acrilamida	:	N-N'-metilen-Bis-acrilamida.
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.
PPO	:	2,5 Difeniloxazol.
POPOP	:	2,2'-p-Fenilen bis (5 fenil-oxazol).
D	:	Dalton.

## RESUMEN

En la hipertensión renovascular experimental modelo Goldblatt un riñón-una pinza (G1), se observa una disminución precoz de la calicreina urinaria y del tejido renal, la que podría estar relacionada a una alteración de la capacidad de síntesis de la enzima. Con el objeto de clarificar si esta alteración en la síntesis de calicreina está relacionada con el menor aporte de oxígeno a la corteza renal, originado por la reducción y la redistribución del flujo sanguíneo, debido al pinzamiento de la arteria, estudiamos la incorporación de leucina tritiada a la calicreina en cortes de tejido renal, incubados en atmósferas de 95% oxígeno y 95% aire.

En la cuantificación e identificación de la enzima, utilizamos técnicas de inmunoprecipitación, lo que hizo necesario obtener la fracción de inmunoglobulina G del suero de un conejo inmunizado con calicreina urinaria de rata (CUR). El suero fue fraccionado con sulfato de amonio al 50%, para eliminar proteínas de alto peso molecular. La fracción cruda de inmunoglobulinas se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa, obteniéndose dos picos de proteínas; el primero, que contenía la mayor proporción de IgG, se eluyó con tampón fosfato de sodio 0,01 M, pH 8,0. El segundo pico se eluyó con aumento de la fuerza iónica. Ambos picos de proteínas dieron reacción con CUR, usada como estandar en los ensayos

de inmunodifusión, mostrando una línea única de precipitación. Sin embargo, se requiere de una mayor concentración proteica, tanto en el ensayo de inmunoprecipitación como para lograr el 50% de la inhibición de la enzima, cuando se usa el segundo pico.

La incorporación de leucina tritiada a calicreina se efectuó incubando cortes de tejido renal por 12 horas en un medio EAGLE con ( $^3\text{H}$ )-3,4,5-L-leucina (6 uCi/ml) en una atmósfera controlada de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  y pH 7,4. Finalizada la incubación los cortes de riñón se homogeneizaron y se centrifugaron a  $20.000 \times g$  durante 2 h. La calicreina presente en el material soluble se inmunoprecipitó utilizando los anticuerpos anti-CUR provenientes del primer pico de la columna de DEAE-celulosa, en una dilución de 1:6000. Como agentes coprecipitantes se utilizaron soluciones que contenían BSA-anti BSA al 0,2% y polietilén glicol al 25%. En el análisis electroforético en PAGE-SDS al 11%, este material precipitado mostró un patrón de migración similar al de calicreina - $^{125}\text{I}$  usada como estandar.

Con el objeto de estudiar la posible participación del menor aporte de oxígeno en la disminución de la excreción de la calicreina observada en la hipertensión G1, cuantificamos la incorporación de leucina a la enzima. Los estudios se realizaron en cortes de tejido renal provenientes de animales hipertensos, incubados en atmósferas de 95%  $\text{O}_2$  y 5%

CO<sub>2</sub> ó 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>. Los riñones fueron obtenidos después de 8 semanas del pinzamiento de la arteria renal. Los valores de proteínas solubles totales y de calicreína de los grupos experimentales fueron comparados con aquellos de los controles con operación ficticia.

La incorporación de leucina a la calicreína en riñones de animales G1 fue un 32% menor que en los riñones control ( $p < 0,02$ ), a una concentración de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. En una atmósfera con 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>, la diferencia fue de un 72% ( $p < 0,01$ ). También, la incorporación de (<sup>3</sup>H)-leu a proteínas solubles totales en riñones G1 fue menor que en riñones control: 24% inferior en una atmósfera con 95% oxígeno ( $p < 0,001$ ), y 62% del control en una atmósfera con 95% aire ( $p < 0,001$ ).

Podemos concluir:

1. El método que hemos desarrollado, permite determinar la calicreína renal que incorporó el trazador "in vitro", y cuantificar sus cambios.
2. Los resultados obtenidos al modificar la concentración de oxígeno en el medio de incubación, indican que la síntesis de calicreína estaría afectada por la disminución del aporte de oxígeno a la zona cortical del riñón, donde se encuentran las células que sintetizan calicreína.

3. Para postular un efecto directo y específico del oxígeno sobre la síntesis de la calicreína, sería necesario comparar la incorporación de (<sup>3</sup>H)-leu a la calicreína, con la de una proteína con tasas de síntesis y degradación similares a las de la calicreína.

## SUMMARY

In Goldblatt one clip-one kidney experimental hypertension G1, we can observe an early decrement of urinary kallikrein and renal tissue kallikrein, which could be associated to an alteration of the capacity to synthesize of the enzyme. With the idea to clarify whether this alteration in the kallikrein synthesis is related to the lesser supply of oxygen to the renal cortex, originated by the reduction and redistribution of the blood flux, occasionated by the clipping of the artery, we studied the incorporation of (<sup>3</sup>H)-leucine to kallikrein in the renal tissue slice, incubated with 95 % oxygen and with 95 % air. To achieve this, we obtained the immunoglobulin G fraction from the serum of an immunized rabbit with rat urinary kallikrein (RUK) fractionated with a ammonium sulphate 50 %, to eliminate proteins of high molecular weight. The raw fraction of the immunoglobulins was applied to a column of DEAE-celulose, obtaining two protein peaks; the first one, that contained the biggest proportion of IgG was eluted with buffer sodium phosphate 0.01 M, pH 8.0. The second peak was eluted by an increase in the ionic force. Both protein peaks reacted to RUK, used as standard in immunodiffusion assays, showing a unique line of precipitation. On the other hand, it

is necessary a stronger protein concentration, not only in the immunoprecipitation assay, but also to obtain the 50 % of inhibition of the enzyme when using the second peak.

The incorporation of (<sup>3</sup>H)-leucine to kallikrein was developed by incubating renal tissues slices for twelve hours in an EAGLE with (<sup>3</sup>H) - 3, 4, 5 - L - leu (6 uCi/ml) medium in a controlled atmosphere of O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> at 37°C and pH 7.4. After the incubation, renal slices were homogenized in the cultured medium, previous addition of desoxicolate of sodium (0.5 % w/v) and benzamidine (0.05 M) and were centrifuged at 20.000 x g for two h. The kallikrein present in the soluble material was immunoprecipitated by using the antibodies anti-RUK from the first peak of the DEAE-cellulose column in a dilution of 1/6000. As coprecipitating agents we used solutions that had BSA ∝ BSA to 0.2 % and Polyetilen glicol at 25 %. In PAGE-SDS at 11%, this precipitated showed a migration pattern similar to one for kallikrein -<sup>125</sup>I, used as standard.

With the idea to study the possible role of the lesser supply of O<sub>2</sub> in the disminution of urinary kallikrein excretion in G1 hypertension, we quantificated the incorporation of (<sup>3</sup>H)-leucine to the enzyme in slice of renal tissue from hypertensive animals, incubated in an atmosphere of 95 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub> or 95 % air and 5 % CO<sub>2</sub>. The kidneys were obtained after eight weeks of clipping the renal artery. The values of

total soluble proteins and kallikreins from the experimental groups were compared to the control sham operated.

The incorporation of ( $^3\text{H}$ )-leucine to kallikrein in the kidneys of G1 animals was 32 % lower than in control kidneys ( $p < 0.02$ ) to a concentration of 95 %  $\text{O}_2$  and 5 %  $\text{CO}_2$ . In an atmosphere with 95 % air and 5 %  $\text{CO}_2$ , the difference was 72% ( $p < 0.001$ ). Also the incorporation of ( $^3\text{H}$ ) - leu to total soluble proteins in G1 kidneys was lower than in control kidneys, 24 % with 95 % oxygen ( $p < 0.001$ ) and 62 % with 95 % air ( $p < 0.001$ ).

As conclusions we can say:

- 1.- The method developed allows us to determine the "in vitro" synthesized kallikrein and quantify its variations.
- 2.- The results obtained when the oxygen concentration was modified, show that the kallikrein synthesis is altered by a diminution of the oxygen delivery to the renal cortex, where cells that synthesize kallikrein are found.
- 3.- To postulate the direct and specific effect of the oxygen on the kallikrein synthesis, it would be necessary to compare the incorporation of ( $^3\text{H}$ ) - leu to the kallikrein, with the incorporation to another protein having synthesis and degradation rates similar to kallikrein.



## INTRODUCCION

Las calicreinas son enzimas proteolíticas que al actuar sobre cininógenos, alfa globulinas presentes en el plasma liberan péptidos vasoactivos denominados cininas.

Se describen dos tipos de calicreinas; la calicreina plasmática y las calicreinas de origen glandular. Ambas clases difieren en sus mecanismos de activación, identidad inmunológica, peso molecular y comportamiento frente a inhibidores específicos, manteniendo en comun sólo su capacidad para liberar cininas.

La calicreina plasmática circula principalmente como precalicreina. La precalicreina y el factor Hageman se activan recíprocamente en un mecanismo que requiere la presencia de cininógeno de alto peso molecular (80.000 - 200.000 D). A través de la activación del factor XI, la forma plasmática activa participa en el mecanismo de coagulación sanguínea y en otros procesos fisiológicos tales como la conversión de plasminógeno a plasmina y en procesos de inflamación (1, 2). Al actuar sobre el cininógeno de alto peso molecular, la calicreina plasmática libera bradicinina, reacción que es inhibida por el inhibidor de tripsina del poroto de soya.

Las calicreinas de origen glandular se encuentran en el tejido renal, páncreas, intestino, glándulas salivales y sudoríparas y en las secreciones exocrinas de estos órganos. Entre estas calicreinas existe gran semejanza química e inmunológica. Las calicreinas glandulares actúan sobre el cininógeno de bajo peso molecular (50.000 - 80.000 D) liberando el de capéptido lisil-bradicinina (calidina) que es rápidamente con vertido a bradicinina por acción de aminopeptidasas presentes en el plasma, tejidos y orina. La acción enzimática de estas calicreinas no es inhibida ni por ovomucoide ni por el in hibidor de tripsina del poroto de soya.

La calicreina glandular de origen renal es una glicoproteína. Esta enzima, a la que aún no se le describe su secuen cia aminoacídica, es sintetizada y secretada en el túbulo distal en la zona cercana a la mácula densa (3, 4, 5). Por técnicas de inmunocitoquímica se ha demostrado que la enzima se encuen tra asociada tanto a la membrana luminal como a la membrana basolateral de las células del túbulo renal distal, pudiendo así ser entregada al túbulo y aparecer en la orina, como al intersticio y encontrarse en la sangre (6).

El sistema calicreina-cininas, especialmente de origen renal, ha sido intensamente estudiado debido a la participación que le cabría en la homeostasis circulatoria (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Aunque algunos de los efectos de la calicreina renal pueden deberse a una acción catalítica directa, varios de ellos parecen estar mediados por la liberación de cininas, péptidos de potente acción vasodilatadora, que ejercería un efecto tanto sobre la actividad celular en el transporte de agua y electrolitos, como sobre la distribución del flujo sanguíneo renal (13).

No está claro todavía cuales serían las señales precisas que determinarían la entrega de calicreina por parte del riñón y su efecto tanto a nivel local como sistémico, existiendo evidencia de un control del sistema nervioso (14, 15) y de modificaciones en los valores de la enzima debidas a cambios en la ingesta de agua y sodio (13). En cuanto a su función existen evidencias que sugieren que las cininas, generadas por la acción de la calicreina sobre el cininógeno, son el principal activador de las prostaglandinas en el riñón (16). Estas últimas, caracterizadas por sus efectos vasodilatadores y natriuréticos, podrían amplificar y prolongar la acción directa de las cininas a nivel local.

Por otra parte, se ha postulado que el aumento de la presión arterial podría resultar de un incremento de sustancias vasopresoras o de una pérdida de factores hipotensores. Ello ha llevado a estudiar el papel que le cabría al sistema calicreina-cininas de origen renal en la patogénesis de varios tipos de hipertensión humana y experimental. La calicreina

es entregada a la circulación donde forma cininas que pueden actuar sobre la pared vascular produciendo vasodilatación. La calicreina puede, por lo tanto, ser un factor hipotensivo circulante (8). Esta hipótesis está avalada por experimentos en riñón aislado y perfundido con una solución libre de calicreina y de precursores de la enzima, que muestran liberación de calicreina a la orina y al perfusado (17) y por estudios que muestran la presencia de calicreina biológicamente activa en el plasma, cuyos valores cambian en respuesta a estímulos que modifican la función renal (18).

La participación del sistema calicreina-cininas de origen renal en la regulación de la presión arterial se ha inferido usualmente de estudios realizados con calicreina contenida en la orina. Ello se debe a que ambas calicreinas, renal y urinaria, son enzimática e inmunológicamente iguales, considerándose que presentan identidad molecular (19).

Al investigar las posibles relaciones entre los niveles de calicreina urinaria e hipertensión, se encontró un descenso de calicreina en la hipertensión esencial en el hombre (2), hipertensión genética en ratas (21), y en ciertos modelos de hipertensión renovascular experimental (7, 22, 23). Además, se ha descrito que el cininógeno plasmático está aumentado en ratas hipertensas, variación atribuible a menor producción o entrega de calicreina (7, 24, 25). En la hipertensión inducida por pinzamiento parcial de una arteria renal,

extirpando el riñón contralateral, se ha observado que la calicreina urinaria y renal varían en diferentes momentos de la hipertensión, favoreciendo su mantención (9, 12). Estas variaciones del sistema calicreina-cininas sugieren su participación en los mecanismos de mantención de la presión arterial. Sin embargo, el modo como estos cambios se producen, son aún objeto de estudio. Alteraciones de la tasa de síntesis, activación, secreción o degradación de la enzima son algunos de los fenómenos que podrían estar involucrados.

En el presente trabajo tratamos de clarificar si en la hipertensión renovascular modelo Goldblatt un riñón-una pinza, la disminución precoz de la calicreina urinaria y del tejido renal está asociada a cambios en la tasa de síntesis de la enzima, y si estos cambios pueden estar relacionados con el menor aporte de oxígeno a la corteza renal, provocado por la disminución del flujo sanguíneo debido al pinzamiento de la arteria renal.

El objetivo de este trabajo es:

Determinar cuantitativamente la incorporación de un aminoácido radioactivo a la molécula de calicreina, en cortes de tejido renal expuestos a dos diferentes concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo.

El logro de este objetivo requiere el desarrollo de técnicas experimentales, como son:

- La obtención de un anti-suero anticalicreína urinaria de rata.
- El desarrollo de un método para la cuantificación de la calicreína marcada, usando técnicas de inmunoprecipitación.

## MATERIALES

### Animales:

Ratas machos Sprague-Dawley, de 120 g.

Conejo hembra de tipo neozelandez, de 2,5 K.

### Reactivos:

- DEAE-celulosa y Sephadex G-100 de Pharmacia.
- Acrilamida, Bis-acrilamida, Temed, Seroalbúmina de bovino, gamma globulina, Polietilen glicol y Coomasie brilliant blue R, de Sigma Ch. Co.
- Medio mínimo esencial EAGLE, glutamina, penicilina y estreptomomicina de Gibco.
- Statzyme glucose de Worthington.
- ( $^3\text{H}$ ) - 3, 4, 5 - L - leucina de New England Nuclear.
- Los demás reactivos de grado analítico fueron provistos por Merk y por Sigma Ch. Co.
- Calicreina urinaria de rata facilitada por el Laboratorio de Fisiología de la P. Universidad Católica de Chile.
- Anticuerpos antiseroalbúmina de bovino y reactivos necesarios en los métodos inmunológicos, facilitados por el Laboratorio de Inmunología de la P. Universidad Católica de Chile.

Equipos:

- Colector de fracciones automático LKB con registrador de transmitancia a 280 nm., modelo Uvicord 8301A.
- 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 preparativas.
- Cámara para electroforesis vertical en slab.
- Polígrafo Grass, modelo 79 D., con transductor de tensión Grass ET10, para las mediciones de ensayo biológico.
- Polígrafo Grass, modelo 5D, 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.
- Contador Beta, Rack Beta I-LKB 1217, conectado a un microprocesador modelo 700 de Texas Instruments.
- Estufa de cultivo termoregulada Heraeus.



## METODOS

## OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-CALICREINA URINARIA DE RATA.

1.1.- Inmunización.

Un conejo hembra de tipo neozelandez que al inicio del protocolo pesó 2.5 K., fue inmunizado con calicreina urinaria de rata (CUR). Esta fue obtenida mediante un proceso de purificación que contempla etapas sucesivas de cromatografía en DEAE-celulosa, cromatografía de afinidad Sefarosa-Aprotinina y filtración en gel Sefacril S-200 (Masferrer, 1980), (26).

El esquema de inmunización fue el siguiente:

- Día 1 (1ª dosis) : 1 mg de CUR emulsionada con adyuvante de Freund completo, vía intradérmica abdominal.
- Día 15 (2ª dosis) : 1 mg de CUR emulsionada con adyuvante de Freund incompleto, vía intramuscular e intradérmica.
- Día 37 (3ª dosis) : 1 mg de CUR emulsionada con adyuvante de Freund incompleto, vía intramuscular.

Los días 14, 36 y 50 el título del suero fue medido utilizando el ensayo ELISA. Para ello, se extrajeron 5 ml de sangre desde la vena marginal de la oreja.

Día 52 : El conejo fue sangrado a fondo por punción cardíaca, obteniéndose 50 ml de sangre.

### 1.2 Procesamiento del suero.

La sangre extraída se colectó en tubos estériles dejándose a 37° C hasta la retracción del coágulo. El suero fue centrifugado a 1.000 x g durante 10 min e incubado a 56° C por 30 min para inactivar el complemento. Finalmente, se agregó azida de sodio al 0.1 % conservándose a -20° C, hasta el momento de proceder a la purificación de la IgG.

### 1.3 Purificación de inmunoglobulina G (IgG).

#### A. Fraccionamiento salino con sulfato de amonio:

10 ml de suero se precipitaron con igual volumen de sulfato de amonio sobresaturado a temperatura de 4°C y agitación continua. Luego de 60 min de reposo, la mezcla se centrifugó a 5.000 x g durante 30 min. El precipitado se resuspendió en 10 ml de sulfato de amonio al 50% de saturación del mismo modo anterior. El precipitado obtenido por centrifugación se resuspendió en 10 ml de tampón fosfato de sodio 0,01 M pH 8,0, se dializó exhaustivamente primero contra agua destilada y luego contra la misma solución tampón y se centrifugó a 5.000 x g por 30 min.

B. Cromatografía en DEAE-celulosa:

El sobrenadante obtenido en la etapa superior se cromatografió en una columna de 18 x 2,2 cm de DEAE-celulosa equilibrada en tampón fosfato de sodio 0,01 M, pH 8,0. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con la misma solución tampón. Proteínas diferentes de IgG (excluida en el lavado) fueron eluidas con 200 ml de tampón fosfato de sodio 0,01 M -NaCl 0,5, pH 8,0.

Mediante bomba peristáltica se mantuvo un flujo de 10 ml/h para la aplicación de la muestra, 20 ml/h para el lavado y 40 ml/h para el eluido. Tanto el material lavado como el eluido se colectaron en fracciones de 5 ml que se concentraron en filtro Amicon (MX - 50/25.000 D) para su poste-rior identificación. La concentración de proteínas se re-gistró a 280 nm con un monitor de absorbancia.

1.4. Caracterización del suero y las fracciones obtenidas en cromatografía de DEAE-celulosa.

A. Determinación de proteínas:

La proteína de las muestras se determinó mediante el método de Lowry et al. (27) usando BSA como estandar.

B. Inmunodifusión:

Se realizó de acuerdo a la técnica de Muñoz (28).

En placas de agarosa al 1% en tampón fosfato de sodio 0,05 M-NaCl 0,15 M, pH 7,2 (solución PBS) se horadaron pocillos de 4 mm de diámetro y 25 ul de capacidad.

Alícuotas de suero, el lavado (primer pico) y el eluido (segundo pico) de la cromatografía se dejaron difundir 24 h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con tampón PBS y agua destilada durante un día para eliminar las proteínas no precipitadas. Los pocillos se rellenaron con agarosa al 1% y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente cubiertas por papel filtro. Las bandas de precipitación, observables por opalescencia sobre la agarosa húmeda, se tiñeron por inmersión de las placas secas en Amido Black (1 g/L en tampón acetato 0,05 M, pH 3,7) por 20 min. El exceso de colorante se lavó con ácido acético al 2 % y glicerol al 5 %.

#### C. Determinación de la actividad por ELISA:

El método ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) permite determinar unión de un anticuerpo a un antígeno en fase sólida mediante una reacción enzimática acoplada (29).

Una placa de cloruro de polivinilo se sensibilizó agregando 50  $\mu$ l (100  $\mu$ g/ml) de CUR en tampón PBS 0,05 M, pH 7,2 por 2 h a temperatura ambiente.

Los sitios libres de la placa se bloquearon con una solución de seroalbúmina de bovino (BSA) en PBS al 1 %, azida de sodio 0,02 %. Una vez sensibilizada la placa, el suero inmune, primer pico y segundo pico se diluyeron sucesivamente al doble incubándose por 2 h a temperatura ambiente.

La reacción se detuvo por vaciado y lavado reiterado de la placa con Tween 20 % al 1 % en PBS. Luego de agregar 50 ul (dilución 1/200) del conjugado Proteína A - Fosfatasa Alcalina en PBS-BSA al 1 %, se incubó a 4° C durante la noche. Los complejos unidos al antígeno en fase sólida se revelaron por adición de 50 ul del sustrato p-Nitrofenil fosfato (1 mg/ml en tampón Carbonato 0,05 M - Mg Cl<sub>2</sub> 1 mM, pH 9,6), incubando 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 ul de NaOH 3 M y la liberación de p-Nitrofenol se registró en forma cuantitativa midiendo la absorbancia a 405 nm.

D. Capacidad inhibitoria:

Tubos que contenían una cantidad fija de calicreína (500 ng) y diluciones seriadas del suero y sus fracciones se incubaron por 24 h a 4° C en solución Tyrode, en un volumen final de 300 ul.

La actividad remanente de calicreína se determinó por su efecto directo sobre útero aislado de rata virgen en período de estro, mantenido en solución Tyrode a 37 ° C con oxigenación, en un baño de 20 ml de capacidad.



El efecto de la enzima no unida a anticuerpos sobre la contractibilidad del útero, se comparó con la respuesta del útero a dosis conocidas de calicreina estandar obtenida de orina. Un protocolo similar se desarrolló incubando calicreina con anticuerpos no específicos. La respuesta contractil del útero detectada mediante un transductor de tensión, se registró en un polígrafo Grass.

E. Unión del anticuerpo, fracción IgG, a la calicreina:

La titulación de la fracción IgG obtenida luego de la purificación del suero inmune se realizó incubando por 24 h a 4° C, 100 ul de calicreina-<sup>125</sup>I (aproximadamente 10.000 cpm) en tampón PBS-BSA al 1% con diluciones seriadas en base 2 de los anticuerpos disueltos en PBS 0,1 M pH 7,4 - 0,1 % gamma globulinas de bovino. Los complejos inmunes fueron precipitados con gamma-globulinas de bovino al 1% y Polietilenglicol al 25% en PBS 0,1 M pH 7,4. Luego de centrifugar a 5.000 x g durante 30 min, el sobrenadante se aspiró por vacío y la radioactividad de los precipitados se midió en un contador gamma LKB 1270. La cantidad de radioactividad se expresó como cpm total.

## PREPARACION DEL ANTIGENO MARCADO.

### 2.1 Iodación.

La iodación de calicreina urinaria de rata, purificada en nuestro laboratorio, se realizó de acuerdo al método de Shimamoto (30).

3 ug de calicreina en tampón fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,4 se trataron con 0,5 mCi de Na-<sup>125</sup>I en NaOH 0,1 N y 14 ug de Cloramina T (1 mg/6ml). Luego de agitar e incubar por 120 s, la reacción se detuvo con 70 ug de Metabisulfito de sodio (2,4 mg/ml). La muestra obtenida se cromatografió en una columna de 25 x 0,8cm de Sefadex G-100 equilibrada con tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4 - 0,5 % BSA, eluyéndose con la misma solución. El material eluido se colectó en fracciones de 1 ml, con un flujo de 20 ml/h. Las cuentas en el eluido se determinaron midiendo la emisión gamma de una alícuota de cada fracción.

### 2.2 Unión de calicreina-<sup>125</sup>I a anticuerpos específicos.

El porcentaje de unión de calicreina yodada a anticuerpos específicos se obtuvo incubando alícuotas de las fracciones obtenidas en la etapa de cromatografía con 100 ul de la fracción IgG (dilución 1/6000) en solución tampón PBS 0,1 M, pH 7,4 - 0,1% gamma globulinas de bovino por 24 h a 4° C. Los complejos inmunes se precipitaron agregando gamma-globulinas de bovino al 1% y Polietilen glicol al 25% en solución

PBS 0,1 M, pH 7,4.

Las muestras se centrifugaron a 5.000 x g por 30 min y los precipitados se contaron en un contador gamma LKB.



## SINTESIS "IN VITRO" DE CALICREINA RENAL.

### 3.1 Incubación de cortes de tejido renal.

Cortes sagitales de tejido renal de ratas (aproximadamente 0,5 mm de espesor y, 3 g tejido por botella), lavados con solución salina fría y preincubados por 15 min, se incubaron en frascos de cultivo de poliestireno de 100 ml de capacidad, a pH 7,4 y 37° C en una atmósfera de 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub> ó 95 % aire y 5 % CO<sub>2</sub>, durante 12 h.

Previo a la incubación, los frascos de cultivo se equilibraron durante 1 h con la mezcla gaseosa requerida.

Por cada gramo de tejido, se agregaron 5 ml de medio EAGLE con solución salina de EARLE que permite mantener el pH en sistemas abiertos y en contacto con una fase gaseosa con 5% de CO<sub>2</sub>. Al medio de cultivo, carente de L-leucina, se adicionó (<sup>3</sup>H)-3,4,5-L-leucina (6 uCi/ml) como marcador de síntesis, glutamina 0,3 mg/ml, 50 unidades de penicilina y 50 ug de estreptomicina.

El frasco de cultivo, conteniendo el medio de incubación y el tejido renal, se montó en una cámara termoregulada. El oxígeno o aire, y el dióxido de carbono (contenidos en balones separados) se hicieron burbujear en agua, y posteriormente, a través de medidores de flujo, se reguló el porcentaje requerido de cada uno de los gases. Tanto la entrada de gas como la salida se unieron a un sistema para

detectar cambios de pH (tampón fosfato-bicarbonato en igual concentración que en el medio de cultivo, y rojo fenol).

Al cabo de las 12 h de incubación, se agregó L-leucina X fría 0,3 mg/ml y se procedió a la homogeneización del tejido.

### 3.2 Consumo de glucosa en el medio de cultivo.

La viabilidad celular del tejido renal durante el período de incubación se determinó midiendo el consumo de glucosa en el medio de cultivo.

Cortes de riñón (3 g/15 ml medio) se incubaron según las condiciones descritas (37°C, pH 7,4), en una atmósfera con 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>. Alicuotas del medio de cultivo fueron retiradas a tiempo 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15 y 20 h). La cantidad de glucosa remanente en el medio se determinó utilizando el reactivo Statzyme glucose de Worthington, que permite, en una primera reacción, la oxidación de glucosa por la glucosa oxidasa y liberación de peróxido de hidrógeno, y en una segunda reacción, la unión oxidativa de este peróxido de hidrógeno a un sustrato cromogénico y posterior formación de un cromóforo que presenta una absorbancia máxima a 500 nm. El cambio de absorbancia a esa longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

El ensayo se realizó tomando alícuotas de la muestra y del reactivo en una proporción de 1:150. Luego de 10 min de incubación a 37°C, se registró la absorbancia final, y la concentración de glucosa en las muestras se determinó interpolando en una curva estandar obtenida con cantidades conocidas de glucosa.

## CUANTIFICACION DE LA CALICREINA RENAL SINTETIZADA "IN VITRO".

4.1 Inmunoprecipitación.

La calicreina sintetizada por el tejido renal a partir de un precursor marcado se cuantificó utilizando un método de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos.

Cortes de riñón obtenidos luego de la etapa de síntesis se homogeneizaron junto con el medio de cultivo usando un ULTRA-TURRAX. El homogeneizado se trató con desoxicolato de sodio 0,5% p/v (19) y benzamidina 0,05 M como inhibidor de proteasas, durante 4 h a 4° C, siendo posteriormente centrifugado a 20.000 x g por 2 h. El sobrenadante, mantenido a 4° C con agitación, se precipitó con sulfato de amonio sobresaturado a una concentración final del 30%; la mezcla se dejó reposar por 1 h. La fracción no precipitada fue dializada contra tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4 por 24 h a 4°C y centrifugada a 20.000 x g durante 2 h. Alicuotas de 2 ml del sobrenadante se precipitaron utilizando una solución de anticuerpos anti-calicreina urinaria de rata (fracción IgG) dilución 1/6000, seroalbúmina de bovino 0,2% y suero de conejo anti-BSA 0,2% en tampón fosfato de sodio 0,05 M - 0,15 M NaCl, pH 7,4 en un volumen final de 2,2 ml. Luego de 24 h de reposo a 4° C, los complejos inmunes se precipitaron agregando Polietilen glicol al 25% en la misma solución tampón y centrifugando a 5.000 x g por 30 min. Aspirados los sobrenadantes,

los precipitados fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4 sonicados por 30 min y transferidos a frascos de conteo con 10 ml de solución de centelleo (4 gr de PPO y 50 mg POPOP por litro de tolueno) para medir la emisión  $\beta$  durante 5 min.

#### 4.2 Recuperación de la enzima.

A una muestra de 2 gr de riñón en 10 ml de medio de cultivo se agregaron 6000 pg de calicreina-  $^{125}\text{I}$  marcada según el método de Shimamoto (30). La distribución de calicreina yodada durante el proceso descrito anteriormente se midió tomando alicuotas en las diferentes etapas. La presencia de la enzima se determinó midiendo radioactividad mediante un contador Gamma LKB 1270 y la cantidad de enzima marcada en las muestras se expresó como cpm totales.

#### 4.3 Migración del inmunoprecipitado en Geles de Poliacrilamida.

Para analizar si la radioactividad presente en el inmunoprecipitado, obtenido al incubar el material sintetizado "in vitro" con anticuerpos específicos, correspondía a radioactividad incorporada a la molécula de calicreina, se utilizó el método de Laemmli y Favre (31) para electroforesis discontinua en medio desnaturalizante (SDS).

Se utilizaron placas de vidrio de 16,5 x 16,5 cm, con un espacio interno entre 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% Bis-acrilamida y 0,1% SDS 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 lavar con agua destilada, se agregaron 4 ml de gel empacador.

La mezcla polimerizante del gel empacador contenía 3% de acrilamida, 0,08% de Bis-acrilamida, 0,1% SDS, TRIS-HCl 0,125 M, pH 6,8, persulfato de amonio 0,25% y Temed 0,0625%. En el gel empacador se introdujo una peineta con 13 dientes de 0,6 cm de ancho por 1,5 cm de alto.

Una vez polimerizado el gel empacador, se retiró la peineta quedando los espacios para colocar las muestras.

Las muestras a analizar se trataron con una solución desnaturalizante que contenía 15% glicerol, 5% 2-mercaptotanol, 3% SDS, trazas de azul de bromofenol en TRIS-HCl 0,0625 M, pH 6,8. Esta mezcla se calentó a 100° C por 2 min y luego se procedió a realizar la electroforesis usando como tampón de corrida TRIS 0,025 M- Glicina 0,192 M, pH 8,6 en ambos electrodos. Entre 10 y 50 ul 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 y a temperatura ambiente. La corriente se cortó cuando el azul indicador se encontraba a unos 0,5 cm del final del gel, el que posteriormente se retiró de las placas:

Las columnas del gel contenían respectivamente:

- Inmunoprecipitado de calicreina sintetizada por tejido renal "in vitro" y con leucina- ( $^3\text{H}$ ) como marcador.
- Inmunoprecipitado obtenido incubando calicreina-  $^{125}\text{I}$  (300 pg) con anticuerpos específicos del mismo modo que en el protocolo de recuperación.

Las columnas del gel fueron seccionadas en segmentos de 0,5 cm y transferidos a tubos para medir la radioactividad asociada a cada trozo de gel.

#### 4.4 Curva de precipitación de Cal- $^{125}\text{I}$ con PEG.

Para determinar las concentraciones óptimas de Polietilén glicol (PEG), seroalbúmina de bovino (BSA) y suero de conejo anti-BSA necesarias para lograr máxima precipitación de los complejos calicreina-anticuerpos específicos, se desarrolló el siguiente protocolo.

Aproximadamente 20.000 cpm de calicreina -<sup>125</sup>I se incubaron en tampón fosfato de sodio 0,05 M - 0,15 M NaCl pH 7,4 con anticuerpos anti-calicreina urinaria de rata (IgG), dilución 1/6000 y cantidades crecientes, 0; 0,1; 0,2% de BSA y anti-BSA, en un volumen final de 2,2 ml, a 37°C por 24 h. Los complejos inmunes se precipitaron agregando PEG en concentraciones finales de 2, 4, 8 y 12,5% en solución tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4.

Luego de centrifugar durante 30 min a 5000 x g y de aspirar el sobrenadante, la radioactividad de los precipitados se midió en un contador gamma y se expresó como cpm totales.

La solubilidad de los complejos se expresó como porcentaje de radioactividad precipitada en función del porcentaje de concentración de PEG.

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE O<sub>2</sub> EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA SINTESIS DE CALICREINA EN EL TEJIDO RENAL DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS.

### 5.1 Protocolos experimentales.

Sesenta ratas machos de aproximadamente 120 g de peso corporal se dividieron en dos grupos, uno control y otro experimental, de 30 animales cada uno. A las ratas del grupo experimental se les practicó bajo anestesia etérea, una incisión dorsal de aproximadamente 2 cm, a través de la cual se implantó una pinza de plata de 0,2 mm de abertura, alrededor de la arteria renal izquierda, y se extirpó el riñón derecho. Los animales del grupo control sufrieron el mismo grado de manipulación de la arteria renal izquierda, sin que fuera pinzada, extirpándose el riñón contralateral.

La presión arterial se midió una vez por semana en la arteria de la cola mediante un detector de pulso y se obtuvo su registro en un polígrafo Grass.

Ocho semanas después de la intervención, los animales de ambos grupos fueron sacrificados y sus riñones, descapsulados y lavados, fueron cortados en trozos de aproximadamente 0,5 mm de espesor.

#### Protocolo 1:

Cortes de riñones obtenidos de animales con hipertensión Goldblatt un riñón-una pinza y de sus controles uninefrectomizados normotensos se incubaron durante 12 h en una atmósfera



de 95 % oxígeno, 5 % dióxido de carbono, a 37° C y pH 7,4.

Protocolo 2:

Cortes de riñones de animales hipertensos y normotensos se incubaron en una atmósfera de 95% aire y 5% dióxido de carbono, por 12 h a 37° C y pH 7,4.

Luego del período de incubación, el contenido de cada frasco de cultivo (3 g tejido/15 ml medio) fue tratado suparadamente para cuantificar la incorporación de leucina-<sup>3</sup>H) a las proteínas solubles totales y calicreina por los métodos descritos anteriormente.

## RESULTADOS

## OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-CALICREINA URINARIA DE RATA, FRACCION IgG.

1.1 Cromatografía en DEAE-Celulosa.

La figura 1 muestra el fraccionamiento del suero de conejo (170 mg proteina/ml) precipitado con sulfato de amonio al 50%, en una columna de DEAE-Celulosa. La fracción del suero correspondiente a inmunoglobulina G eluyó libremente (fracción 5-12), mientras que las restantes proteínas séricas fueron eluidas por aumento de la fuerza iónica con tampón Fosfato de sodio 0,01 M- 0,5 M NaCl, pH 8,0. Ambos picos de proteínas fueron concentrados en filtro Amicon obteniéndose concentraciones proteicas de 7 mg/ml para el primer pico y 51 mg/ml para el segundo.

1.2 Determinación de la actividad por ELISA.

El título de un suero, se define como la dilución a la que se obtiene el 50% de la actividad máxima o saturación.

El título del suero de un conejo hembra de tipo noozelandez inmunizado con calicreina urinaria purificada de rata mostró incremento luego de cada inmunización, alcanzando valores

### CROMATOGRAFIA DEL SUERO DE CONEJO EN DEAE-CELULOSA

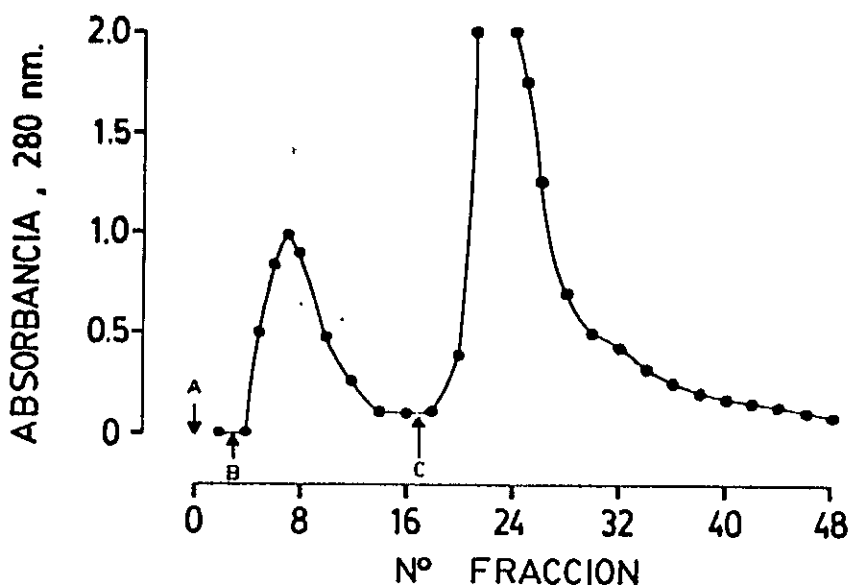


Figura 1: Cromatografía de una columna de 18 x 2,2 cm de DEAE-celulosa, equilibrada con tampón fosfato de sodio 0,01 M, pH 8,0. En (A) se aplicó una muestra obtenida por fraccionamiento con sulfato de amonio (50%), equilibrada en la misma solución tampón. En (B) se lavó con 200 ml de la solución de equilibrio. En (C) se eluyó con aumento de la fuerza iónica con 200 ml de tampón fosfato de sodio 0,01 M - 0,05 M NaCl, pH 8,0. Se mantuvo un flujo constante de 20 ml/h para el lavado y 40 ml/h para el eluido y se colectaron fracciones de 5 ml. El trazado representa la absorbancia a 280 nm, leída en un espectrofotómetro tubo a tubo.

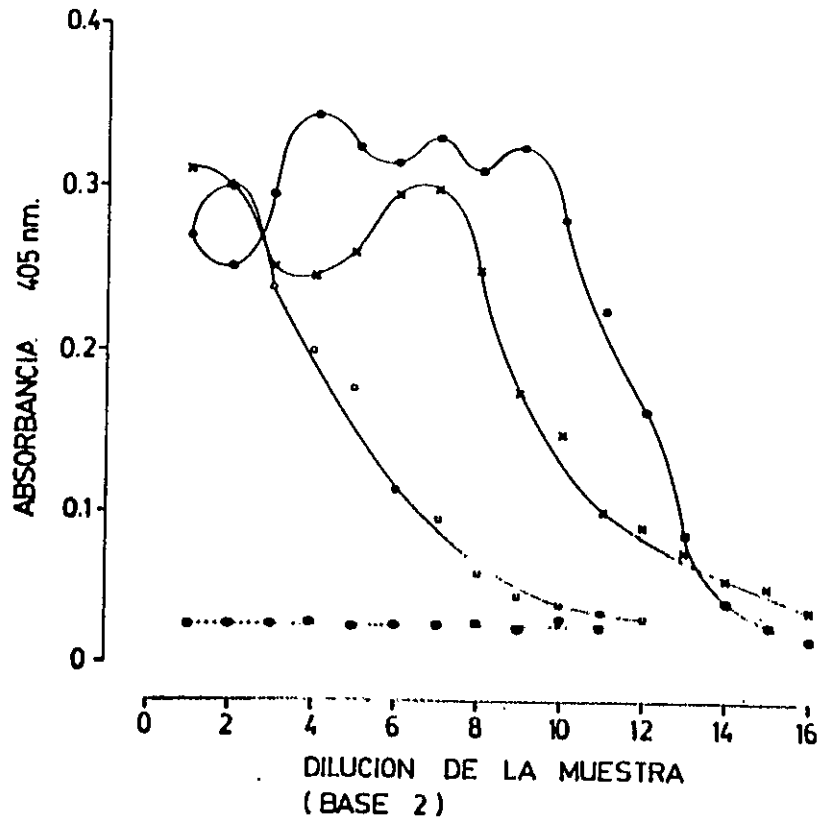


Figura 2: La figura representa la actividad del suero obtenido en inmunización terciaria y, de las fracciones resultantes de la cromatografía de DEAE-celulosa, determinada mediante en sayo ELISA en una placa sensibilizada con CUR (100 ug/ml) en tampón PBS 0,05 M, pH 7,2, por 2 h a temperatura ambiente.

- ×——× Suero completo de conejo neozelandez.
- Fracción correspondiente al primer pico de proteína eluido desde la cromatografía de intercambio iónico.
- Fracción correspondiente al segundo pico de proteína.
- - -● Lectura basal obtenida en una placa control sensibilizada solamente con BSA.

Los trazados representan la absorbancia a 405 nm.

de  $2^8$  en inmunización secundaria y de  $2^{10}$  en inmunización terciaria (Fig. 2).

El título de la fracción eluida en el primer pico de proteína, en la cromatografía de intercambio iónico, fue de  $2^{12}$ , mientras que la del segundo pico de elución fue de  $2^5$  (Fig. 2). En esta figura, la lectura basal corresponde a la absorbancia a 405 nm obtenida en una placa control sensibilizada solamente con BSA.

### 1.3 Inmunodifusión.

Los ensayos de inmunoprecipitación se muestran en la figura 3. El suero completo obtenido por inmunización terciaria da reacción de precipitación con las preparaciones de calicreína urinaria estandar purificada de rata y calicreína contenida en una orina concentrada (Fig. 3a, 3c).

El primer pico de elución de la cromatografía de DEAE-celulosa reaccionó positivamente con diluciones seriadas en base 2 de calicreína estandar y orina concentrada, en una línea de precipitación que indica identidad entre los determinantes antigénicos (Fig. 3b). Concomitantemente, diluciones de este pico de proteína dan respuesta positiva contra calicreína estandar (Fig. 3a).

Diluciones seriadas del segundo pico de elución muestran reacción de precipitación con calicreína estandar (Fig. 3c). Las diluciones seriadas de esta calicreína, al igual que orina

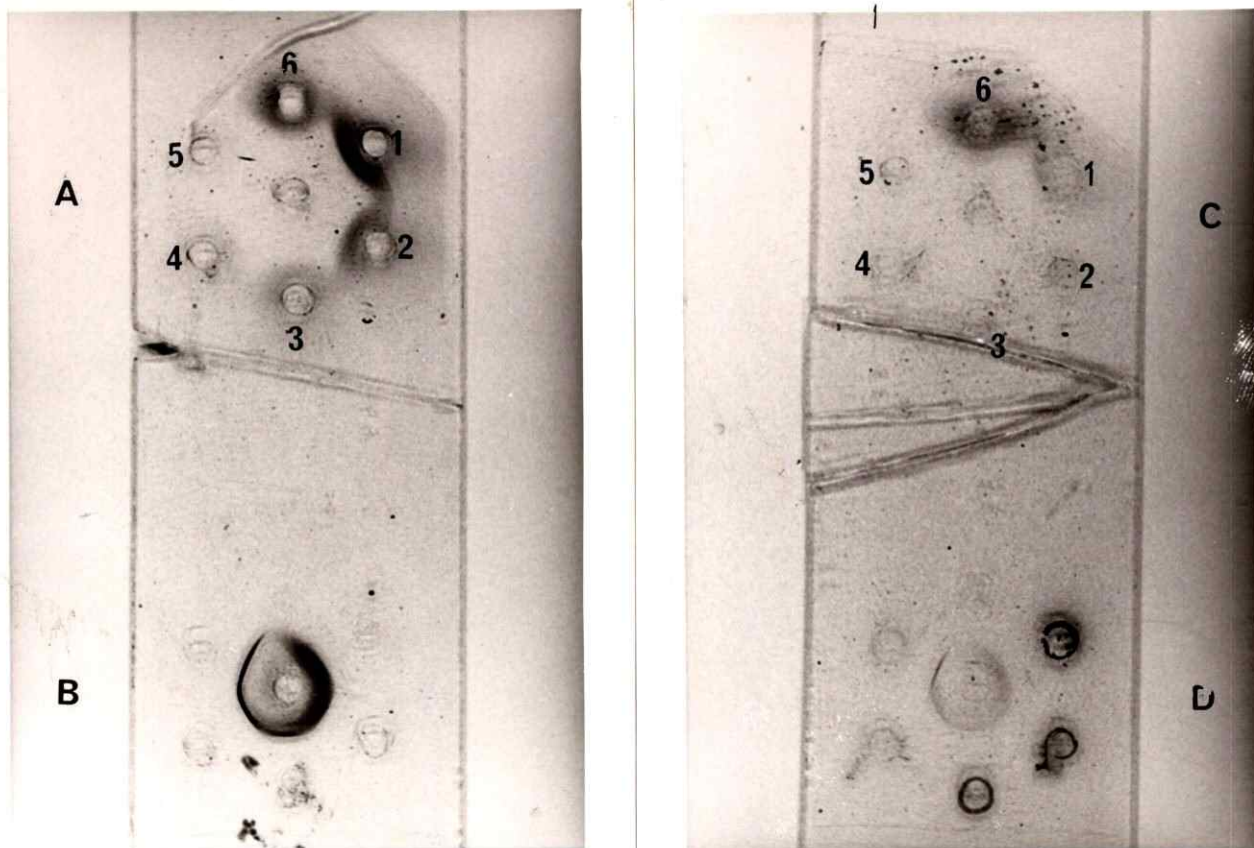


Figura 3: Se muestran las bandas de inmunoprecipitación obtenidas en placas de agarosa al 1%, teñidas con Amido Black.

En el pocillo central de (A), se colocaron 25  $\mu$ l de CUR. Alrededor, se pusieron a difundir 25  $\mu$ l del primer pico de elución de la columna de DEAE-celulosa (1), y diluciones seriadas en base 2, de la misma fracción (2-5). En (6), se colocaron 25  $\mu$ l del suero completo. En el pocillo central de (B), se agregaron 25  $\mu$ l del primer pico de elución. En (1), 25  $\mu$ l de CUR, y de 2 a 5, diluciones en base 2 de la enzima. En (6), se colocó orina concentrada de rata. En (C) y (D) se muestra la misma distribución de las muestras que en A y B, respectivamente, esta vez, usando el segundo pico de elución de la columna de DEAE-celulosa.

concentrada dan reacción positiva con este pico de elución (Fig. 3d). Sin embargo, ambas líneas de precipitación son más débiles y/o alcanzan a concentraciones mayores (menor dilución) cuando se comparan con el primer pico de elución.

Como control de la orina concentrada se usó un suero de conejo anti-Hemocianina de loco, que no da reacción de identidad de ninguna clase.

#### 1.4 Capacidad inhibitoria.

La capacidad del suero completo y de los picos de elución de la columna de DEAE-celulosa de unir específicamente a la calicreina urinaria purificada de rata se determinó por la inhibición de la actividad directa de calicreina sobre útero aislado de rata, luego de que la enzima fuera incubada con las tres fracciones.

En la Fig. 4 se observa que el suero completo inhibe el 50% de la calicreina estandar (250 ng) a una concentración de 55 ug de proteina. El primer pico de elución requiere la menor concentración proteica para lograr el 50 % de precipitación (25 ug), mientras que el segundo pico requiere la concentración más alta (108 ug). El suero completo no tuvo efecto por si solo sobre el útero de rata.

Los anticuerpos anti-Hemocianina de loco utilizados como control no tuvieron capacidad inhibitoria sobre la enzima.



## CAPACIDAD INHIBITORIA DEL ANTICUERPO

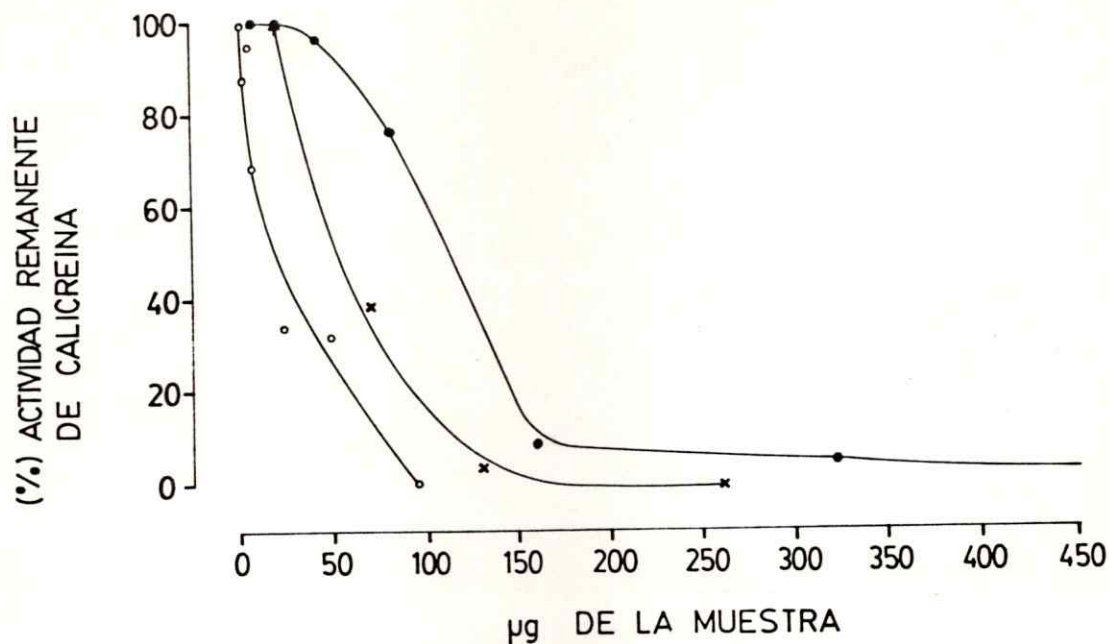


Figura 4: La figura representa las curvas de actividad de calicreina remanente, obtenidas incubando 500 ng de la enzima con diluciones seriadas del suero y las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio iónico. Las muestras se incubaron 24 h a 4° C, en solución Tyrode y la actividad de calicreina se midió en útero aislado de rata.

x—x

Actividad remanente de calicreina incubada con suero completo.

o—o

Actividad remanente de calicreina incubada con el primer pico de proteína eluido desde la columna de DEAE-celulosa.

●—●

Actividad remanente de calicreina incubada con el segundo pico de proteína eluido desde la misma columna.



### 1.5 Unión del anticuerpo anti-caliceína urinaria, fracción IgG, a caliceína.

La fracción de inmunoglobulina G obtenida luego de la etapa de purificación en cromatografía de DEAE-celulosa, se tituló utilizando caliceína -<sup>125</sup>I, y gamma globulinas de bovino-PEG como agentes precipitantes.

En la figura 5 se observa el porcentaje de caliceína precipitable en función de la dilución de los anticuerpos. El máximo de caliceína precipitable corresponde al 60% de la radioactividad inicial. Para lograr este porcentaje de precipitación es necesaria una dilución final de los anticuerpos de 1:25.600.

Esta dilución fue la utilizada en la cuantificación de la caliceína renal sintetizada "in vitro" y en todos los ensayos donde los anticuerpos fueron requeridos.

#### PREPARACION DEL ANTIGENO MARCADO.

### 2.1 Iodación de caliceína urinaria de rata:

La muestra obtenida de la yodación de caliceína, se cromatografió en una columna de Sephadex-G100. La radioactividad precipitable por el anticuerpo se midió en las fracciones eluidas de esta columna. La Fig. 6 muestra la distribución de la radioactividad total (línea continua) y de la

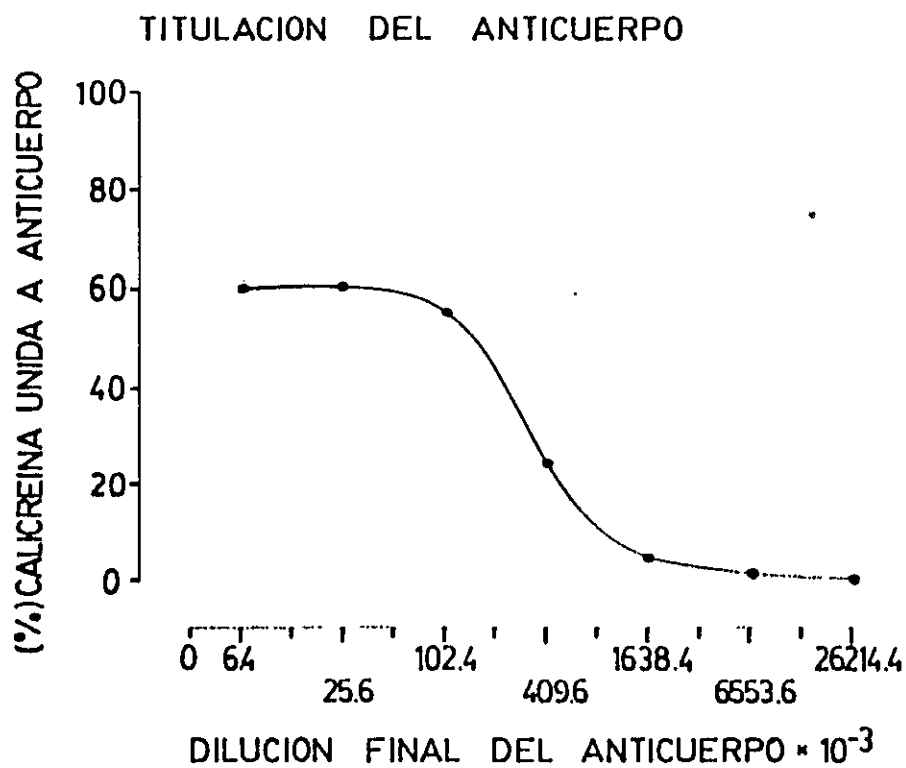


Figura 5: Tubos que contenían 200  $\mu$ l de solución tampón de ensayo, 100  $\mu$ l de diluciones seriadas en base 2 del anticuerpo y 100  $\mu$ l de caliceína-<sup>125</sup>I se incubaron a 4° C por 24 h. Después de la incubación, la enzima unida al anticuerpo se separó de la enzima libre por el método del PEG.

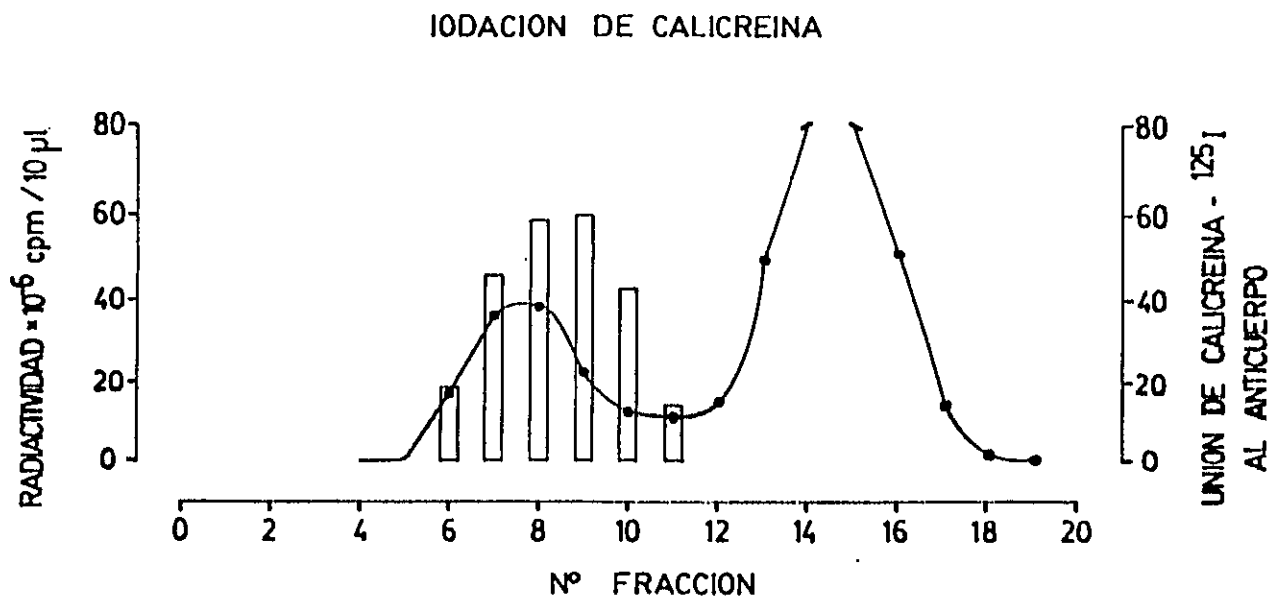


Figura 6: Esta figura representa la iodación de calicreina urinaria de rata, y muestra la distribución de la radioactividad total ( ●—● ) y de la radioactividad unida a exceso de anticuerpo (barra), en las fracciones de 1 ml eluidas desde una columna de Sephadex G-100.

Para determinar la radioactividad unida al anticuerpo, tubos que contenían 200 µl del tampón de ensayo, 100 µl de anticuerpo (1/6000) y alícuotas de cada tubo con 10.000 cpm fueron incubadas a 4°C por 24 h. La enzima unida al anticuerpo se separó de la enzima libre mediante el método del PEG.

radioactividad precipitada con el anticuerpo, dilución 1:6000 (barras). Se observan dos picos de radioactividad total; el segundo pico de radioactividad corresponde a yodo libre. En el primer pico se obtuvo un 60% de la enzima precipitable por los anticuerpos (tubo 9). La radioactividad precipitada en las muestras inespecíficas (tubos que no contenían anticuerpo) fue de 7,2% a 13,5% del total de cuentas.

La calicreina iodada contenida en la fracción N°9 se utilizó en los experimentos que requirieron de enzima marcada. La actividad específica fue de 22,5% uCi/ug de proteína. La enzima guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$  es estable por dos meses.

#### SINTESIS "IN VITRO" DE CALICREINA RENAL.

##### 3.1 Consumo de glucosa en el medio de cultivo.

Debido a que las condiciones experimentales exigían someter al tejido a una atmósfera con 95% aire y, a períodos de incubación prolongados, se determinó la viabilidad del tejido a través del consumo de glucosa desde el medio de incubación.

En la Fig. 7 se muestra este consumo expresado como ug glucosa/ml/g de tejido, en función del tiempo de incubación. Se observa una relación lineal entre ambos parámetros que alcanza hasta las 13 h, con un coeficiente de regresión de  $r = 0,984$ .

### CONSUMO DE GLUCOSA EN EL MEDIO DE INCUBACION

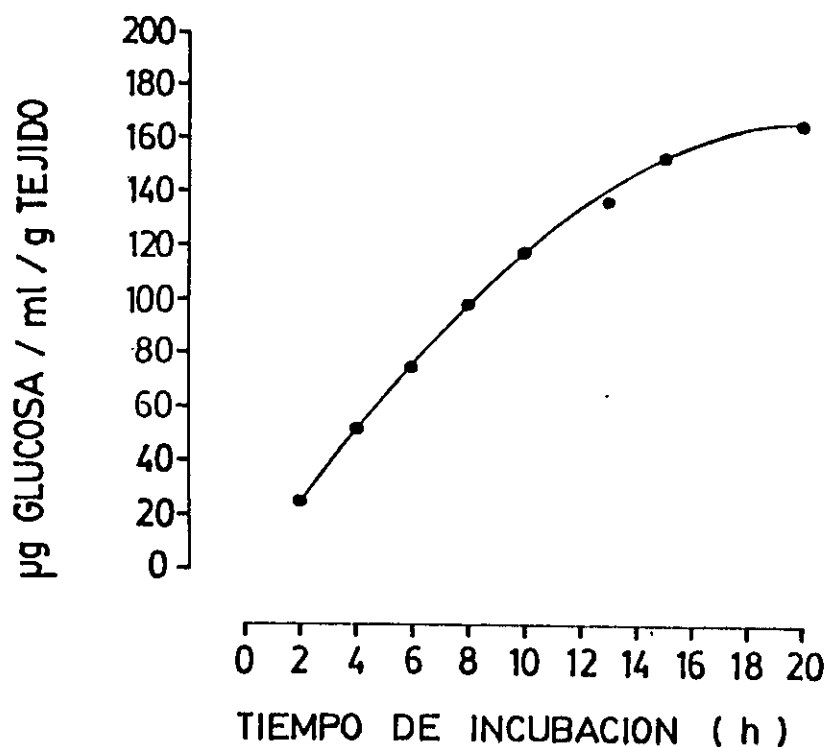


Figura 7: La viabilidad celular del tejido renal medida a través del consumo de glucosa en una atmósfera con 95% aire y 5%  $\text{CO}_2$ , expresada en  $\mu\text{g}$  glucosa/ml/g de tejido, en función del tiempo de incubación.

Los puntos representan el promedio de 5 experimentos.

## CUANTIFICACION DE LA CALICREINA RENAL SINTETIZADA "IN VITRO"

4.1 Niveles de recuperación de la enzima.

Cuando se agregó calicreina  $^{125}\text{I}$  (200.000 cpm) a 2 g de riñón en 10 ml de medio, la cantidad de enzima presente en cada una de las etapas se expresó como radioactividad total (cpm) y porcentaje de precipitación.

La homogeneización del tejido renal y el tratamiento con desoxicolato de sodio y benzamidina precipitó el 6,6% (13.200 cpm) de la radioactividad agregada. El fraccionamiento salino con sulfato de amonio al 30% de saturación precipitó el 22,1% (44.200 cpm) de la calicreina presente en la fracción soluble del homogeneizado. La diálisis del material no precipitado por el sulfato de amonio eliminó el 18,8% de la radioactividad (37.500 cpm), quedando al inicio de la etapa de inmunoprecipitación 105.000 cpm, correspondientes al 52,5% de las cuentas iniciales. Al incubar la muestra con anticuerpos específicos, se logró precipitar el 45,6% (91.200 cpm) de las cuentas iniciales, correspondiente al 86,8% de las cuentas presentes al inicio de la etapa de inmunoprecipitación. En el control sin anticuerpos específicos precipitó sólo un 4,4% de la calicreina agregada inicialmente (8.700 cpm), correspondiente al 8,3% de las cuentas presentes en la inmunoprecipitación.

#### 4.2 Migración del inmunoprecipitado en geles de Poliacrilamida.

El análisis electroforético en condiciones desnaturantes del inmunoprecipitado obtenido al incubar la calicreína sintetizada "in vitro" por el tejido renal con la fracción IgG, muestra que esencialmente toda la radioactividad migra siguiendo el patrón electroforético de la calicreína  $^{125}\text{I}$  usada como estándar y precipitada con los anticuerpos específicos. En el frente de migración (cortes 10-16) se observa radioactividad asociada a tritio libre (Fig. 8).

Comparando la migración en PAGE-SDS al 11% del inmunoprecipitado específico y del precipitado obtenido sin anticuerpos anticalicreína urinaria de rata, se encontró que en este último, la radioactividad aparece asociada en igual proporción a casi todas las rebanadas del gel, excepto en el corte 15 donde se aprecia radioactividad asociada a tritio libre (Fig. 9).

#### 4.3 Curva de precipitación de calicreína $^{125}\text{I}$ con PEG.

En la figura 10 se observan las curvas de solubilidad de los complejos inmunes incubados con concentraciones crecientes de Polietilen glicol, seroalbúmina de bovino y anti-BSA expresadas como porcentaje de radioactividad precipitada en función de la concentración de PEG.

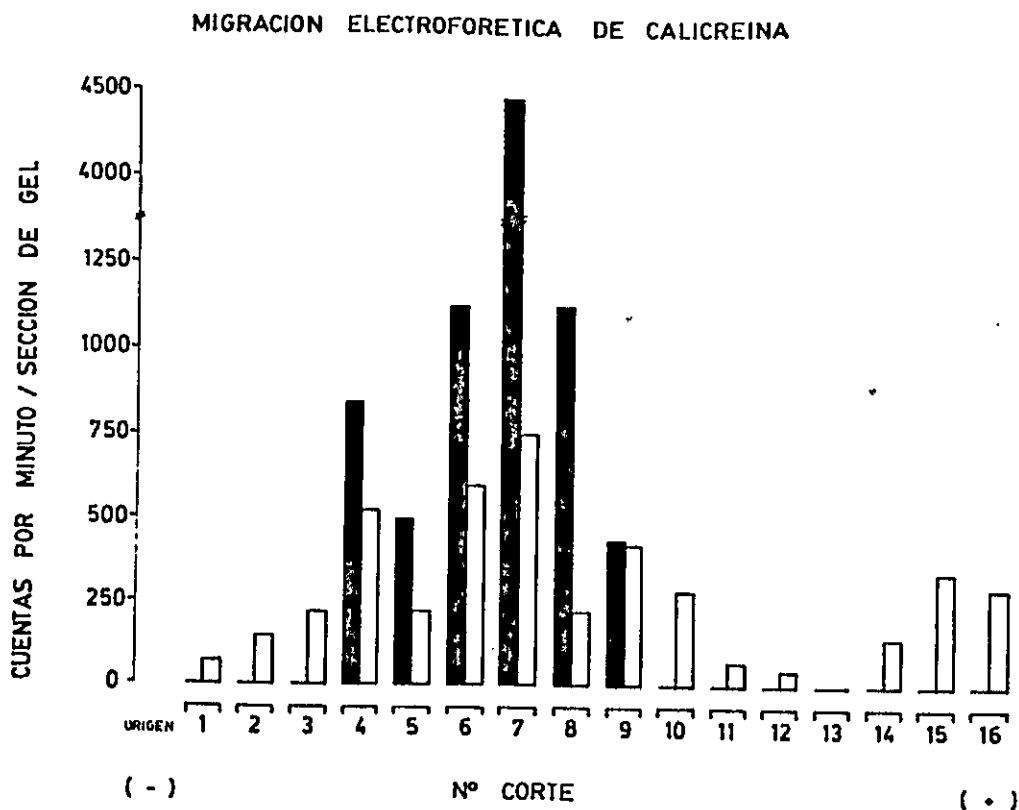


Figura 8: Comparación de la migración electroforética en PAGE-SDS al 11%, del inmunoprecipitado obtenido al incubar los anticuerpos específicos con calicreina sintetizada "in vitro" por el tejido renal (columnas blancas), y con calicreina urinaria yodada, empleada como estándar (columnas sombreadas).

\* La figura corresponde a los datos de un experimento. Se efectuó un total de 4 experimentos con resultados similares.



MIGRACION ELECTROFORETICA DEL  
 INMUNOPRECIPITADO ESPECIFICO E INESPECIFICO

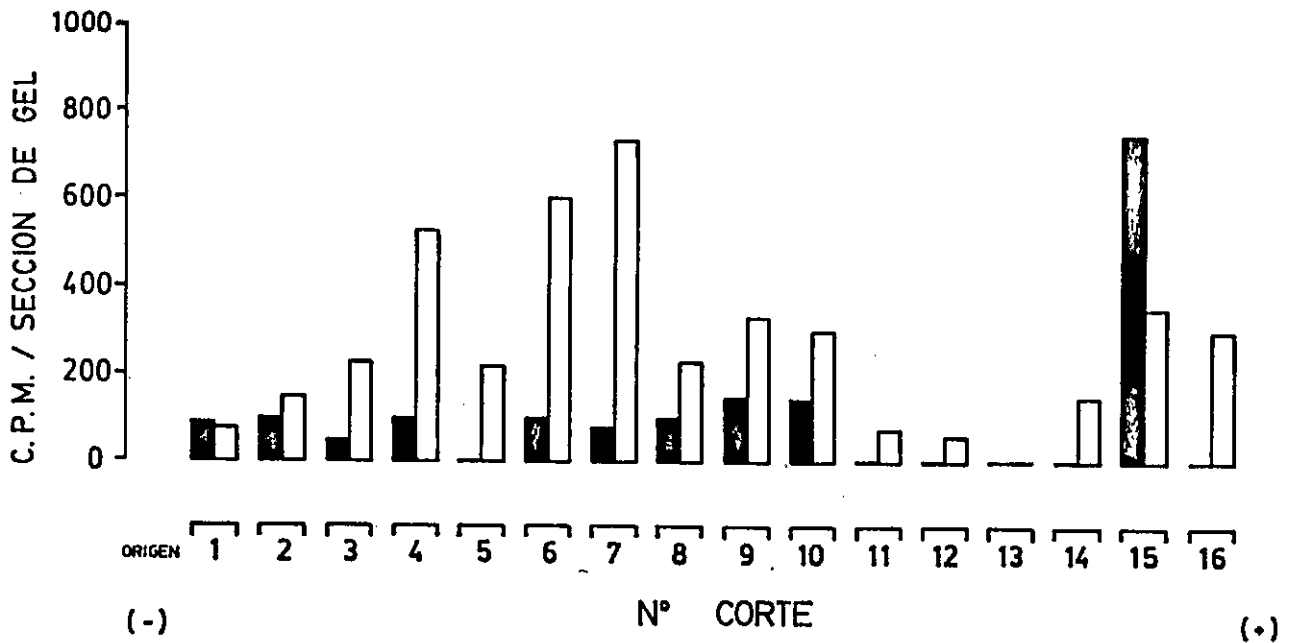


Figura 9: Comparación de la migración electroforética en PAGE-SDS al 11%, del inmunoprecipitado obtenido al incubar calicreina sintetizada por el tejido renal "in vitro" con anticuerpos específicos (columnas blancas), y el precipitado obtenido sin anticuerpos anticalicreina urinaria (precipitado inespecífico) (columnas sombreadas). \*

La figura corresponde a los datos de un experimento. Se efectuó un total de 4 experimentos con resultados similares.

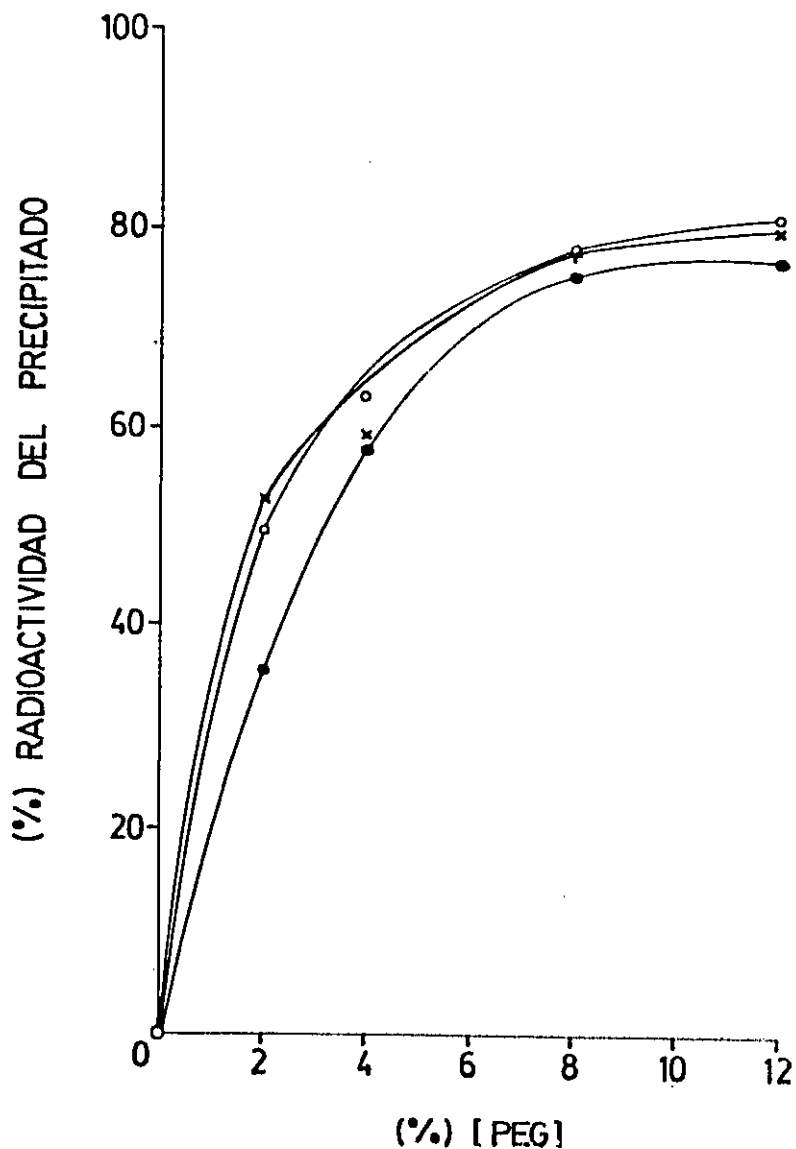


Figura 10: Solubilidad de calicreína  $^{125}\text{I}$  en PEG como una función de la concentración del polímero y de la concentración de BSA y suero de conejo anti-BSA. La solubilidad se determinó en tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4.

0% BSA y 0% suero conejo anti-BSA  
 0,1% BSA y 1,1% suero conejo anti-BSA  
 0,2% BSA y 0,2% suero conejo anti-BSA.

Se aprecia que el mayor porcentaje de precipitación 80,7% se logra agregando al sistema de inmunoprecipitación concentraciones de 0,2% de BSA y anti-BSA. Se encontró que la concentración mínima de PEG para asegurar máxima precipitación de la enzima unida al anticuerpo es de 12,5% final.

El porcentaje de precipitación en el inmunoprecipitado inespecífico (no se agrega anticuerpo) varió entre 1,02% y 2,02% en las tres concentraciones estudiadas. Al ir aumentando la concentración del polímero, la calicreína libre permanece casi totalmente soluble y sólo esta mínima proporción de enzima coprecipita con las proteínas séricas.

VALORES DE CALICREINA SINTETIZADA "IN VITRO" POR TEJIDO RENAL DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS EN UNA ATMÓSFERA CON CENCENTRACIONES VARIABLES DE OXIGENO.

### 5.1 Valores de presión arterial.

La presión arterial aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) en el grupo con pinza arterial (G1), a partir de la segunda semana después del pinzamiento de la arteria renal, y siguió aumentando hasta la octava semana (Fig. 11). Los valores de presión arterial al momento de obtener los riñones para incubarlos fueron de  $138,9 \pm 4,8$  en el grupo control y  $206,4 \pm 6,3$  en el grupo G1.

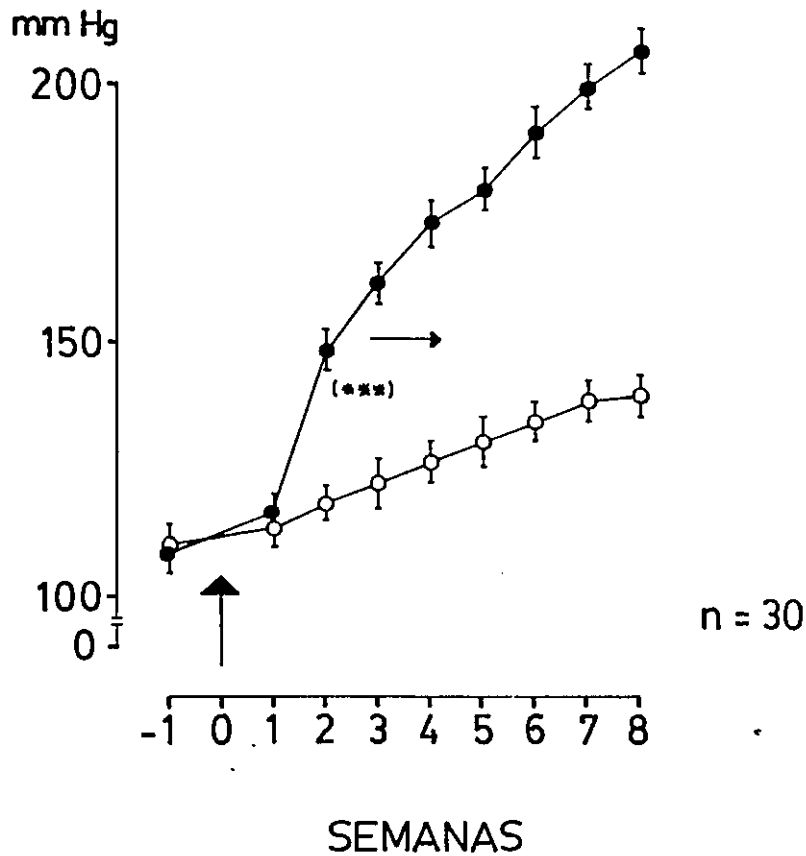


Figura 11: Valores promedio  $\pm$  error estándar de la presión arterial en mm de Hg. El círculo lleno corresponde a los animales con pinza en una arteria renal y nefrectomía contralateral, y el círculo abierto a los controles uninefrectomizados. En el eje de la abscisa se indica con 0 y una flecha vertical el momento de la intervención quirúrgica, y con -1 el valor de presión arterial obtenido la semana previa a dicha intervención.

\*\*\* Diferencia significativa con  $p < 0,001$  entre los valores de presión arterial de ambos grupos. La flecha horizontal indica que la misma significancia estadística se mantuvo hasta el final del experimento.  $n$  = número de animales en cada grupo.

## 5.2 Incorporación de leucina -(<sup>3</sup>H) a proteínas totales:

### A. Incubación en una atmósfera de 95% oxígeno y 5% CO<sub>2</sub>:

La incorporación de leucina tritiada a proteínas totales en riñones de animales con hipertensión Goldblatt (G1) y sus controles uninefrectomizados fue de  $12 \pm 0,7$  pg Leu/mg/h y  $16 \pm 2,2$  pg Leu/mg/h respectivamente. La incorporación de leucina -(<sup>3</sup>H) a proteínas totales en riñones G1 fue un 24% menor (p 0,001) que en los controles normotensos (Fig. 12).

### B. Incubación en una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>:

La incorporación de leucina (<sup>3</sup>H) a proteínas totales en riñones de animales uninefrectomizados fue de  $18 \pm 2,8$  pg Leu/mg/h. En riñones de animales G1, la incorporación de leucina fue  $7 \pm 0,7$  pg Leu/mg/h, un 38% con respecto al control, diferencia que altamente significativa (p 0,001).

## 5.3 Incorporación de leucina -(<sup>3</sup>H) a calicreina.

### A. Incubación en una atmósfera de 95% oxígeno y 5% CO<sub>2</sub>:

La incorporación de leucina tritiada a la molécula de calicreina en riñones de animales hipertensos G1 fue de  $0,3 \pm 0,8$  pg Leu/mg/h mientras que en los controles uninefrectomizados, la incorporación alcanzó un valor de  $0,5 \pm 0,06$  pg Leu/mg/h. En esta atmósfera con 95% de oxígeno, la incorpo

## INCORPORACION $(^3\text{H})$ -L-Leu. A PROTEINAS

n = 5

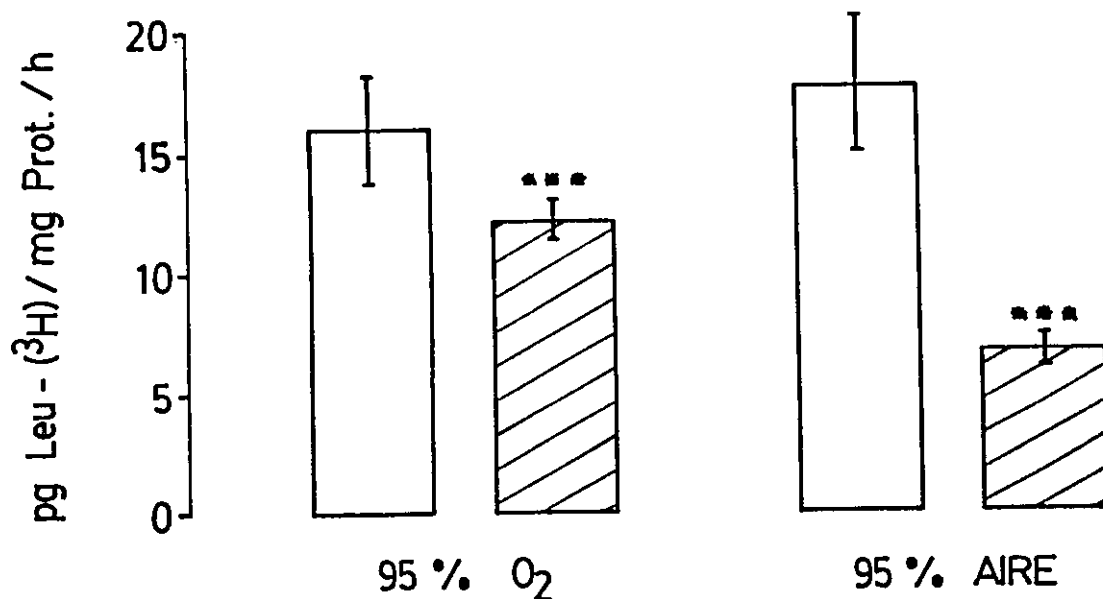


Figura 12: Incorporación de Leu- $(^3\text{H})$  a proteínas solubles totales de cortes de riñones de animales uninefrectomizados normotensos (columnas blancas) y de animales con hipertensión G1 (columnas achuradas).

Los riñones, obtenidos 8 semanas después del pinzamiento de la arteria renal o de la operación ficticia, fueron incubados durante 12 h en atmósferas de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$  ó 95% aire y 5%  $\text{CO}_2$ .

Se muestran los valores promedios  $\pm$  desviación estándar.

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

### INCORPORACION ( $^3\text{H}$ ) -L-Leu A CALICREINA

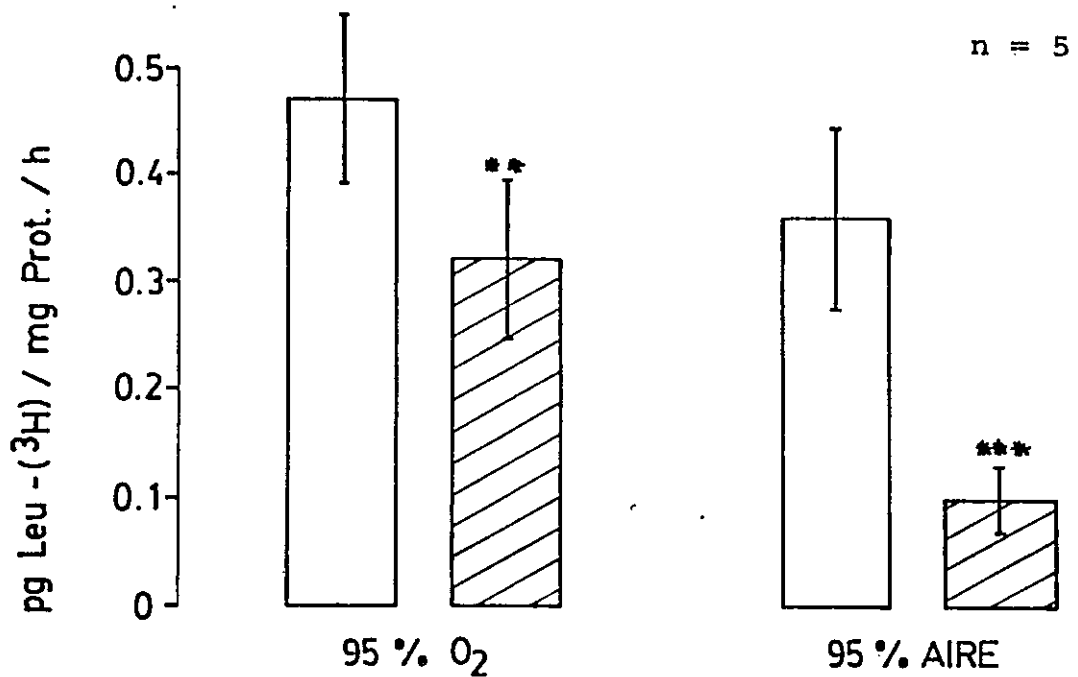


Figura 13: Incorporación de Leu-( $^3\text{H}$ ) a calicreina en riñones de animales uninefrectomizados normotensos (columnas blancas) y de animales con hipertensión G1 (columnas achuradas). incubados en atmósferas de 95% O<sub>2</sub> y 95% aire. Se muestran los valores  $\pm$  desviación estándar.

\*\* Indica diferencia significativa con  $p < 0,02$  entre el grupo control y el grupo experimental.

\*\*\* Indica una diferencia significativa con  $p < 0,001$ .

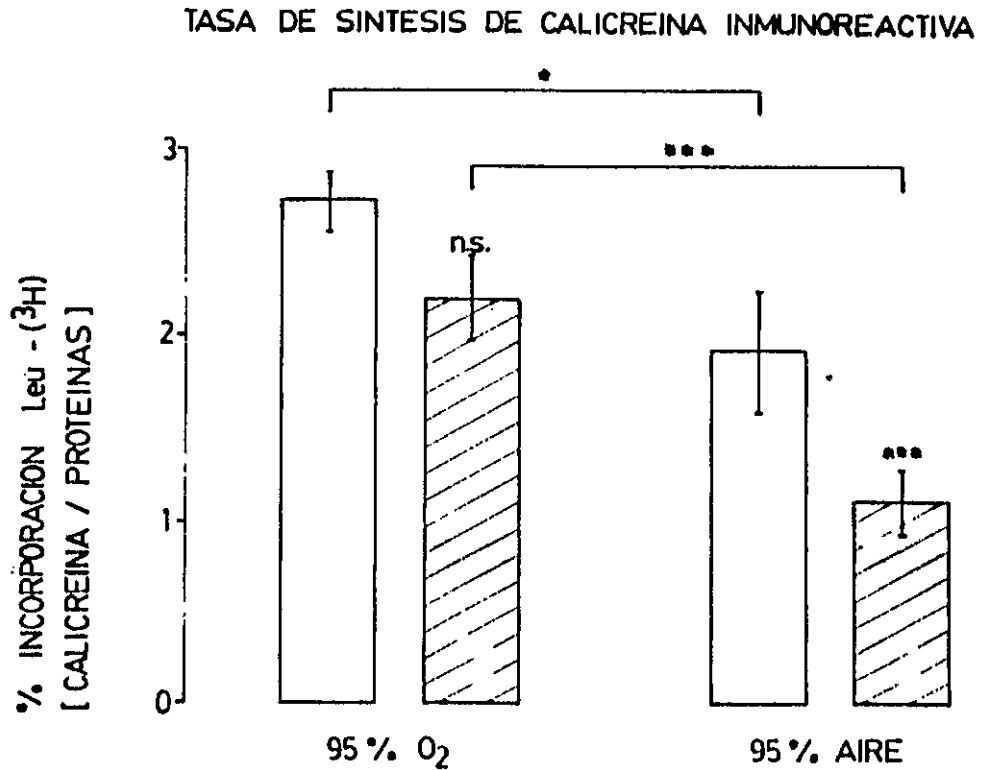


Figura 14: Tasa de síntesis de calicreína inmunoreactiva. Las columnas blancas, muestran la tasa de síntesis de calicreína en cortes de riñones de animales uninefrectomizados normotensos, y las columnas achuradas, en cortes de riñones de animales con hipertensión G1.

\* Indica diferencia significativa con  $p < 0,05$ , entre los diferentes grupos que se representan.

\*\*\* Indica diferencia significativa con  $p < 0,001$ .



ración en riñones de animales G1 fue un 32% menor que en los riñones de animales uninefrectomizados (p 0,02).

B. Incubación en una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>:

En esta atmósfera, la incorporación de leucina - (<sup>3</sup>H) a moléculas de calicreina en riñones de animales G1 fue 0,1 ± 0,03 pg Leu/mg/h. En riñones de animales control uninefrectomizados, esta incorporación fue de 0,4 ± 0,09 pg Leu/mg/h. El porcentaje de incorporación a calicreina en los riñones de los animales hipertensos fue menor en un 72% (p 0,001) con respecto a la incorporación observada en los riñones de los animales control normotensos.

Expresando la incorporación de leucina tritiada a la calicreina en relación a la incorporación de leucina - (<sup>3</sup>H) a proteínas totales, se observa que en una atmósfera con 95% oxígeno y 5% CO<sub>2</sub>, no hay diferencia significativa entre riñones de animales con hipertensión y sus controles normotensos. En una atmósfera con 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>, la tasa de síntesis de calicreina es significativamente menor (p 0,001) en riñones de animales G1 (Fig. 14).

En el proceso global de separación de la enzima se recuperó el 46% de la calicreina agregada inicialmente. La recuperación de la enzima presente en el material dializado, incubado con los anticuerpos, fue del 86%, mientras que la precipitación inespecífica de la misma fracción fue de un

8%. Dado que el coeficiente de variación del método, medido a través de la recuperación de calicreína marcada en diferentes ensayos fue de un 5%, consideramos que el método desarrollado en esta tesis resulta una buena herramienta para determinar diferencias en la incorporación de leucina tritiada a calicreína, en cortes de tejido renal, los que son sometidos a diferentes condiciones experimentales.

## DISCUSION

En el modelo de hipertensión renovascular Goldblatt un riñón-una pinza, la mantención de la presión arterial elevada parece estar ligada a la incapacidad del riñón pinzado para entregar cantidades normales de calicreina. En dicho modelo de hipertensión se observa una disminución de la excreción urinaria de la enzima y una disminución del contenido renal de la misma (12). Nuestra hipótesis, es que la menor capacidad del tejido renal para sintetizar calicreina pudiera deberse a un decremento en el aporte de oxígeno a la zona cortical donde se ubica la porción distal del túbulo renal que sintetiza la enzima, originada por la reducción y redistribución de la sangre en el riñón, luego del pinzamiento de la arteria renal.

Para dilucidar nuestra hipótesis, diseñamos un procedimiento experimental que permite estudiar la incorporación de un aminoácido marcado a la calicreina, en cortes de tejido renal. En la identificación y cuantificación de la enzima, empleamos técnicas de inmunoprecipitación. Para esto, obtuvimos la fracción de inmunoglobulina G del suero de conejo, la que reconoce a la calicreina urinaria, tanto en fase sólida como en solución. Al someter esta fracción cruda a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, se obtuvo dos picos de proteínas; que reaccionaron con calicreina

urinaria de rata, mostrando una línea única de precipitación, en los ensayos de inmunodifusión, lo que indica identidad entre los determinantes antigénicos. Sin embargo, se requiere una mayor concentración de proteínas, tanto en el ensayo de inmunoprecipitación como para lograr el 50% de la inhibición de la enzima, cuando se usa el segundo pico.

El comportamiento de esos picos de proteínas frente a la enzima podría ser explicado en base a la heterogeneidad en la carga eléctrica presentada por las inmunoglobulinas G en un suero policlonal. Aproximadamente el 80% de las IgG con carga eléctrica positiva son eluidas en el primer pico de proteínas de la columna de intercambio iónico y se encuentran libres de otras proteínas séricas (32). Las IgG restantes, aquellas que son de migración más lenta, son retenidas por la interacción entre sus cargas negativas y las cargas positivas de la matriz, por lo que son eluidas con un incremento en la fuerza iónica, conjuntamente con inmunoglobulinas de otros tipos (IgA, IgM, IgD) y proteínas séricas, incluyendo alfa globulinas (33). Estas inmunoglobulinas, distintas de IgG, reconocen también a la calicrina, aunque con menor afinidad.

Para separar el material inmunoreactivo obtenido de los cortes de tejido renal, se homogeneizó el tejido en presencia de un detergente iónico y de un inhibidor de pro

teasas (benzamidina). Este tratamiento permitió no sólo solu bilizar la calicreina unida a membranas, gracias al uso del detergente iónico, sino también, prevenir la degradación de la enzima y la pérdida de su actividad inmunológica, ya que benzamidina se une al sitio de actividad enzimática de la molécula y, debido a su bajo peso molecular, no bloquea el sitio antigénico.

La alta concentración de proteínas presentes en la par te soluble del homogeneizado, la que podía causar la coprecipitación de la calicreina con proteínas séricas de alto peso molecular en el tratamiento posterior con anticuerpos, se redujo mediante un fraccionamiento con sulfato de amonio al 30%.

La inmunoprecipitación de la calicreina presente en el material dializado se realizó utilizando los anticuerpos anticalicreina urinaria de rata descritos en este trabajo. Como agentes precipitantes se utilizaron soluciones que con tenían BSA-anti BSA y Polietilen glicol, método descrito en la literatura como altamente eficiente en la precipitación de los complejos inmunes, ya que no precipitan la proteína libre ni disocian los complejos inmunes formados (34).

Con el fin de estudiar la posible participación de un decremento en el aporte de oxígeno en la disminución de la excreción de calicreina urinaria en la hipertensión Goldblatt un riñón-una pinza, cuantificamos la capacidad de incorpora ción de leucina tritiada a la enzima inmunoreactiva en cortes de riñones provenientes de animales con hipertensión G1 y de

sus controles uninefrectomizados normotensos, en atmósfera con 95% oxígeno - 5% CO<sub>2</sub> ó 95% aire - 5% CO<sub>2</sub>.

La incorporación de leucina tritiada a proteínas y a calicreina esta significativamente disminuida en cortes de riñones provenientes de animales hipertensos, cuando se la compara con la síntesis en los controles normotensos, aunque la incubación se realice en un medio con 95% oxígeno.

La menor excreción de calicreina que se observa "in vivo", en el modelo de hipertensión G1, podría ser explicada en base al fenómeno de la redistribución del flujo sanguíneo renal. Esta redistribución del flujo, que se observa en experimentos de hipoperfusión (35), podría ser un mecanismo de prevención de la isquemia renal medular, tanto por el aumento en el aporte de oxígeno entregado al tejido medular, como, indirectamente, por la disminución en la demanda de oxígeno para la reabsorción de solutos, debido a la reducción de la tasa de filtración glomerular (36, 37, 38).

Ya que la vasoconstricción cortical persiste mientras dura la isquemia (39), el menor flujo sanguíneo cortical podría estar actuando en forma sostenida sobre la capacidad de síntesis de la calicreina por parte de las células del túbulo distal.

Sin embargo, esta hipótesis, la que podría explicar los bajos valores de calicreina "in vivo", no explica las dife

rencias observadas "in vitro". En nuestro modelo experimental el fenómeno de redistribución del flujo sanguíneo renal no está presente, y por lo tanto, no puede dar cuenta de la menor incorporación de leucina a proteínas y a calicreina que se observa en riñones de animales hipertensos incubados en una atmósfera con 95% de oxígeno o con 95% aire, donde la incorporación de leucina tritiada a la calicreina está más afectada que la incorporación a proteínas totales.

La disminución de la incorporación a proteínas en general y a calicreina en particular, podría deberse a una alteración de la integridad de las células del túbulo distal, como consecuencia del menor aporte sostenido de oxígeno a la zona cortical, provocado por la redistribución del flujo sanguíneo renal. Esta alteración, celular o metabólica, la que podría comprometer la maquinaria de síntesis proteica, tendría lugar durante las ocho semanas en que los riñones permanecieron pinzados.

Finalmente, la diferencia observada en la tasa de síntesis de calicreina, donde se contempla la incorporación tanto por síntesis como recambio, en cortes de animales hipertensos, incubados con 95% oxígeno y con 95% aire, podría deberse a que la calicreina es una proteína de recambio rápido (42), y por lo tanto, la incorporación del aminoácido a la enzima podría verse más afectada que la incorporación a proteínas de recambio lento, cuando la incubación se rea

liza en un medio con 95% aire.

Para poder postular un efecto directo y específico del oxígeno sobre la síntesis de calicreina, sería necesario hacer un estudio comparativo con otra proteína que tuviera tasas de síntesis y degradación similares a las de la calicreina, lo que implica el desarrollo de un método de precipitación similar al descrito para la calicreina con producción de anticuerpos específicos para esta proteína, preferencialmente monoclonal, y un estudio más exhaustivo de la síntesis de calicreina.

Resumiendo, podemos concluir que en el presente trabajo se ha logrado:

1. Desarrollar un procedimiento experimental para cuantificar "in vitro", la capacidad de incorporación de un aminoácido radioactivo a la calicreina renal, utilizando la fracción de IgG de un suero policlonal de alto título.
2. Demostrar que el aporte de oxígeno al medio de incubación es importante para la incorporación, de leucina tritiada a esta enzima, y que las células de los riñones obtenidos de animales que han desarrollado hipertensión arterial como consecuencia de una isquemia renal, se han hecho más sensibles al menor aporte de oxígeno en su capacidad de síntesis de calicreina.



Este hallazgo experimental, nos permite postular que la disminución de calicreína que se observa en la orina de estos animales hipertensos, podría deberse a una disminución de su síntesis en el tejido renal. Nuestros resultados no son concluyentes, ya que no podemos descartar que "in vivo" el menor aporte de oxígeno por efecto de la pinza pudiera producir la alteración de otros mecanismos, como la activación, secreción o degradación de la enzima, que en conjunto con la alteración de la tasa de síntesis, podrían ser los responsables de la disminución de la calicreína en el modelo de hipertensión mencionado.

## REFERENCIAS

- 1.- Colman, R.W. and Wong, P.Y.:  
Participation of Hageman factor dependent pathways in human disease states.  
Thromb. Homeostasis 38:751-774, 1977.
- 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.- Orstavik, T.B., Nustad, K., Brandtzal, G.P. and Pierce, T.V.:  
Cellular origin of urinary kallikrein.  
J. Histochem. Cytochem. 24:1037-1039, 1976.
- 4.- 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.

- 5.- 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. 32:117-121, 1984.
- 6.- Figueroa, C.D., Caorsi, I. and Vio, C.P.:  
Visualitation of renal kallikrein in luminal and basolateral  
membranes. Effect of the tissue processing method.  
J. Histochem. Cytochem.: 32:1238-1240, 1984.
- 7.- Croxatto, H.R., Albertini, R., Roblero, J., and Corthorn, J.:  
Renal kallikrein (kininogenase activity) in hypertensive  
rats.  
Acta Physiol. Latinoam. 24:439-442, 1974.
- 8.- Croxatto, H.R., Albertini, R., Corthorn, J. and Rosas, R.:  
Kallikrein and kinins in hypertension.  
Hypertension, Genest, J., Koiv, W., Kuchel, O. Ed. Mc Grow  
Hill Co., N. York, 1976.
- 9.- Albertini, R., Rosas, R., Croxatto, H.R. and Roblero, J.:  
Kallikrein-kinin system in one and two kidney Goldblatt  
hypertensive rats.  
Clinical Science 56:227-233, 1979.
- 10.- Mills, I.H.:  
Kallikrein kininogen and kinins in control of blood pres-  
sure.  
Nephron 23:61-71, 1979.

11.- Kaiser, H.:

The kallikrein-kinin system in essential hypertension.

Clin. and Exp. Hypertension 2(384):675-691, 1980.

12.- Albertini, R. and Oliveri, P.:

Calicreina renal y actividad renínica del plasma en la hipertensión renovascular en ratas.

Revista Hispano-Americana de Hipertensión Arterial 1(1): 5-12, 1982.

13.- 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.

14.- Albertini, R., Ladrón de Guevara, R., Asenjo, F. and Boric, M.

Effect of renal nerves stimulations on urine and tissue kininogenase activity in cats.

Hypertension 3:50-II - 55-II, 1981.

15.- Albertini, R., Asenjo, F., Vargas, L., Paredes, C., Pardo, F. y Oliveri, P.:

Sistema nervioso autónomo y calicreina renal.

Revista Médica de Chile 112:1183, 1984.

- 16.- 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° 27, Bethesda, 1977.
- 17.- Roblero, J., Croxatto, H.R. and Albertini, R.:  
Release of renal kallikrein to the perfusate by isolated rat kidney.  
Experientia 32:1920-1941, 1976.
- 18.- Pinto, I.:  
Calicreina glandular en plasma. Estudios de los niveles circulantes y su relación con la función renal.  
Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología, Universidad de Chile, 1984.
- 19.- Nustad, K., Veaje, K. and Pierce, J.V.:  
Synthesis of kallikrein by rat kidney slices.  
Br. J. Pharmac. 53:229-234, 1975.
- 20.- Margolius, H.S., Geller, R., Pisano, J.J. and Sjoerdsma, A.:  
Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension.  
Lancet 2: 1063-1065, 1971.
- 21.- Porcelli, G., Bianchi, G. and Croxatto, H.R.:  
Urinary kallikrein excretion in spontaneously hypertensive strain of rats.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 149:938-986, 1975.



- 22.- Croxatto, H.R. and San Martin, M.:  
Kallikrein-like activity in the urine of renal hypertensive rats.  
Experientia 26:1216-1217, 1970.
- 23.- 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.
- 24.- Albertini, R., Roblero, J., Corthorn, J. and Croxatto, H.R.:  
Blood kininogen in uninephrectomized and hypertensive rats.  
Acta Physiol Latinoam.: 24:448-452, 1974.
- 25.- 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.
- 26.- Masferrer, J.:  
Purificación de calicreina urinaria de rata.  
Tesis para optar al Grado de Licenciado en Bioquímica,  
Universidad de Chile, 1982.
- 27.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.T., Farr, A.L. and Randall, R.J.:  
Protein measurement with folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
- 28.- Muñoz, J.:  
Doble diffusion in plates.  
Methods in immunology and immunochemistry, III:140-160.  
Eds. Williams, C.A. and Chase, M.W., Academic Pres, N.York.

- 29.- Crowter, J.R. and Abu Elzein, E.M.E.:  
Detection of antibodies against foot -and - mouth disease virus using purified satphyloccocus A protein conjugated with alkaline phosphatase.  
J. Immunol. Methods. 34:261, 1980.
- 30.- Shimamoto, K., Margolius, H.S., Chao, J. and Croswell, A.R.:  
A direct radioimmunoassay of rat urinary kallikrein activity  
J. Lab. Clin. Med. 94:172-179, 1979.
- 31.- Laemli, V.K. and Favre, M.:  
Maturation of the head of bacterophage T<sub>4</sub>.  
J. Mol. Biol. 80:575-599, 1973.
- 32.- Fahey, J.L. and McKelvey, G.:  
Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agarplates.  
J. Immunol. 94:84, 1965.
- 33.- Levy, H.B. and Sober, H.A.:  
A simple chromatographic method for preparation of Gamma Gobulin.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103:250, 1960.
- 34.- Desbuquois, B. and Aurbach, G.D.:  
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassays.  
J. Clin. Endocr. 33:732-738, 1971.

- 35.- Vatner, S.F.:  
Effects of hemorrhage on regional blood flow distribution  
in dogs and primates.  
J. Clin. Invest. 54:225-235, 1974.
- 36.- Alcorn, D., Emslie, K.R., Ross, B.D., Ryan, G.B. and  
Tange, J.D.:  
Selective distal nephron damage during isolated kidney  
perfusion.  
Kidney Int. 19:638-647, 1981.
- 37.- Brezis, M., Rosen, S., Silva, P. and Epstein, F.H.:  
Transport activity modifies thick ascending limb damage  
in isolated perfused kidney.  
Kidney Int. 25:65-72, 1984.
- 38.- Brezis, M., Rosen, S., Silva, P., Spokes, K. and Epstein,  
F.H.:  
Transport-dependent anoxic cell injury in the isolated  
perfused rat kidney.  
Am. J. Path. 116:327-341, 1984.
- 39.- Hollenberg, N.K., Adams, D.F., Oken, D.E., Abrams, H.L.  
and Merrill, J.P.:  
Acute renal failure due to nephrotoxins. Renal hemodynamic  
and angiographic studies in man.  
N. Engl. J. Med. 282:1329-1334, 1970.



40.- Miller, D.H., Chao, J. and Margolius, S.:

Tissue kallikrein synthesis and its modification by  
testosterone or low dietary sodium.

Biochem. J. 218:37-43, 1983.