

Cininogenasa vascular.

HECTOR NOLLY, MONTSERRAT CRUZADO, M. CRISTINA LAMA

Cátedra de Fisiología Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Dirección para separatas: Cátedra de Fisiología Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, (5000) Mendoza, Argentina

Enzimas cininogenásicas similares a las calicreínas tisulares se encuentran en arterias y venas de perro. La actividad cininogenásica es cinco veces mayor en venas que en arterias. Dicha actividad es resistente al tratamiento con SBTI (100 µg/ml), lo-cual diferencia a estas enzimas de ciertas proteasas menos específicas, como la tripsina y las calicreínas plasmáticas. El efecto inhibitorio de los anticuerpos anticalicreína de perro se probó incubando en paralelo muestras con calicreína urinaria de perro. La inhibición observada fue sólo parcial. El empleo de aprotinina (1.000 KIU/ml), un reconocido inhibidor de las calicreínas tisulares, abolió completamente la actividad cininogenásica de los extractos vasculares. La cromatografía en columnas de AcA₅₄ mostró un volumen de elución similar al de las calicreínas tisulares. El peso molecular aparente de las cininogenasas vasculares de arterias y venas de perro fue de 33.000 y 36.000 daltons respectivamente. Este peso molecular es muy cercano al de la calicreína tisular, como así también el pH óptimo de reacción enzima-sustrato. Por consiguiente, se trata de enzimas o isoenzimas de calicreína tisular presentes en la pared vascular con capacidad de liberar cininas a pH fisiológicos; dichas enzimas podrían contribuir a la regulación del tono vascular de modo directo y/o indirecto a través de la liberación de prostaglandinas.

Las cininogenasas tisulares son enzimas que generan cininas, potentes vasodilatadores, a partir de sustratos llamados cininógenos. Las cininogenasas tisulares se clasifican como serine-proteasas, indicando la presencia de serina en el sitio catalítico activo y su inhibición con diisopropil-fluorofosfato. Las cininogenasas incluyen a un numeroso grupo de enzimas, entre 25 a 30, con diferente grado de especificidad y entre las que se encuentran la tripsina, la trombina y la plasmina.

La ubicuidad de las cininogenasas en diferentes tejidos, su participación en la liberación de pépti-

dos biológicamente activos, la potente acción vasodilatadora de las cininas y su efecto estimulante sobre la síntesis de prostaglandinas en arterias y venas, son algunos de los argumentos que apoyan el posible rol de las cininogenasas en la regulación de la resistencia vascular. En estudios previos^{1,2} se ha demostrado la presencia de enzimas formadoras de cininas en el tejido vascular de rata. El presente trabajo describe y analiza la actividad cininogenásica en arterias y venas de perro en diferentes lechos vasculares, su caracterización bioquímica y su presencia en diferentes especies animales.

MATERIAL Y METODO

Preparación de extractos vasculares: Se emplearon 12 perros machos, entre 10 a 20 kg de peso corporal. Se anestesió al animal con pentobarbital sódico, se lo sangró y se extrajeron las arterias (carótida, femoral, renal, mesentérica, ilíaca) y venas (safena, cava, femoral y yugular), luego de perfundir por algunos minutos con solución salina fisiológica. Se disecaron los vasos apartando el tejido adiposo y conectivo que los rodea, bajo control microscópico. Luego se cortaron en pequeños anillos de 3-4 mm y se lavaron en repetidas oportunidades con solución salina. Se los congeló y descongeló en cuatro oportunidades y se los resuspendió en 3 volúmenes de sucrosa (0,25 M) a pH 7,0; se los homogeneizó en homogeneizador de vidrio enfriado con hielo. El homogenado se centrifugó a 5.000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se guardó congelado a -20°C hasta la medición de la actividad enzimática.

Drogas: En los experimentos realizados se emplearon las siguientes drogas: SBTI (inhibidor de tripsina derivado de la soja (Sigma) y Aprotinina (inhibidor proteásico) (Bayer), 50.000 KIU (unidades inhibitorias de calicreína)/ml.

Estudios de inhibición: Todas las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en presencia de SBTI (100 µg/ml), con el fin de distinguir entre la acti-

vidad cininogénica debida a enzimas del tipo de la calicreína tisular de otras menos específicas, o debida a enzimas del tipo de la tripsina. Las calicreínas tisulares e isocalicreínas no son inhibidas por el SBTI en esa concentración.

Los homogenados vasculares y la calicreína urinaria de perro fueron preincubados con 20 μ l de una solución de aprotinina en 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 (50.000 KIU/ml), siendo la concentración final de 1.000 KIU por ml.

La fracción gammaglobulínica de suero de conejo anticalicreína urinaria de perro se diluyó en buffer 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) para lograr una concentración final de 200 mg/ml, una alícuota conteniendo 10 μ g de proteínas se agregó a las muestras de tejido vascular o de calicreína urinaria y se preincubaron durante 60 minutos a 37°C. Como control, se empleó suero de conejo normal en igual concentración. Luego del período de preincubación se les agregó cininógeno de perro para el ensayo de actividad cininogénica.

Determinación de peso molecular: Las suspensiones de arterias y de venas de perro (2 ml) se aplicaron a una columna de gel filtración de AcA₅₄ (100 x 1 cm) equilibrada con 0,1 M buffer de fosfato, pH 7,4. La columna se eluyó con 0,1 M buffer de fosfato (pH 7,4), a un flujo de 12 ml/h.

Fracciones de 4 ml se colectaron, concentraron, desalinizaron y guardaron concentradas a -70°C. Los estándares usados para la determinación de peso molecular fueron los siguientes: ovoalbúmina (44.000), mioglobina (17.000) y cianocobalamina (1.350).

Actividad cininogénica: La actividad formadora de cininas en arterias y venas de perro, así como en las fracciones de gel de filtración, se incubaron con cininógeno de perro parcialmente purificado, en presencia de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 e inhibidores de peptidasas, de acuerdo al procedimiento descrito previamente.² Las cininas liberadas se midieron por bioensayo en útero de rata estrogenizada y por radioinmunoensayo.³ La determinación de proteínas se efectuó por el método de Bradford,⁴ usando albúmina de bovino como estándar. La concentración de proteínas en la columna de gel de filtración se midió a 280 mm (280 A).

RESULTADOS

La Figura 1 muestra la actividad cininogénica presente en venas de perro. Dicha actividad es cinco veces mayor que la encontrada en arterias, es resistente al tratamiento con SBTI, parcialmente bloqueada por anticuerpos anticalicreína tisular y

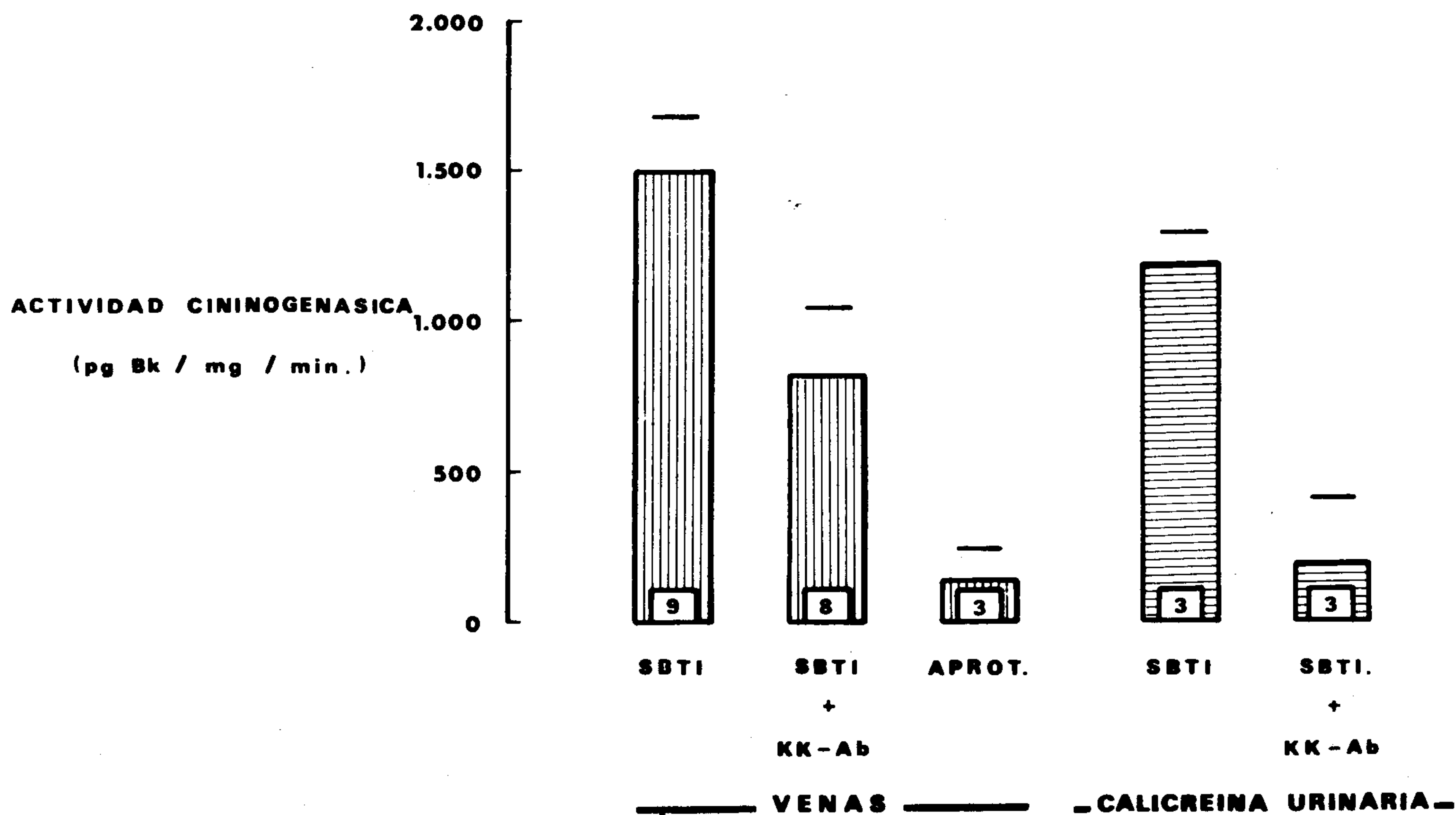


Fig. 1. Actividad cininogénica presente en venas de perro incubadas en presencia de SBTI. Efecto de anticuerpos anticalicreína (KK-Ab) y de aprotinina. Simultáneamente se incubó calicreína urinaria de perro en presencia de SBTI con y sin anticalicreína como control

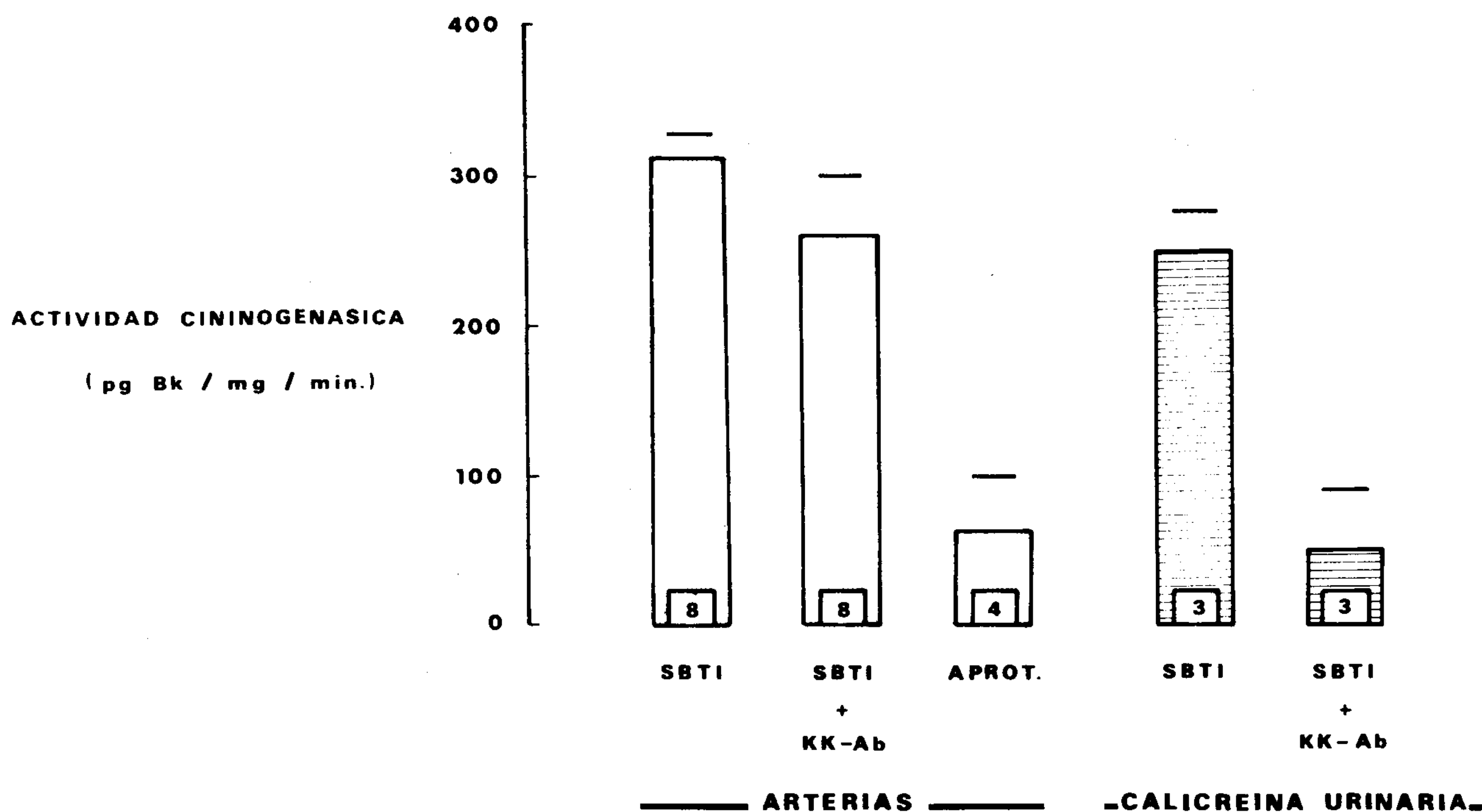


Fig. 2. Actividad cininogénica en arterias de perro en presencia de SBTI. Efecto de la incubación con anticuerpos y anticalicreína y aprotinina. En paralelo muestras controles de calicreína urinaria de perro con y sin anticuerpo anticalicreína.

completamente abolida por incubación con aprotinina, un efectivo inhibidor de las calicreínas tisulares.

La actividad formadora de cininas en arterias de perro (Fig. 2) es significativamente menor que la hallada en venas, es también completamente resistente al SBTI, sólo parcialmente afectada por

incubación con anticuerpos anticalicreína y totalmente abolida por aprotinina.

Mediante cromatografía en AcA₅₄ (Fig. 3) ambas cininogenasas eluyen con un peso molecular aparente muy próximo entre sí y similar al de la calicreína tisular.

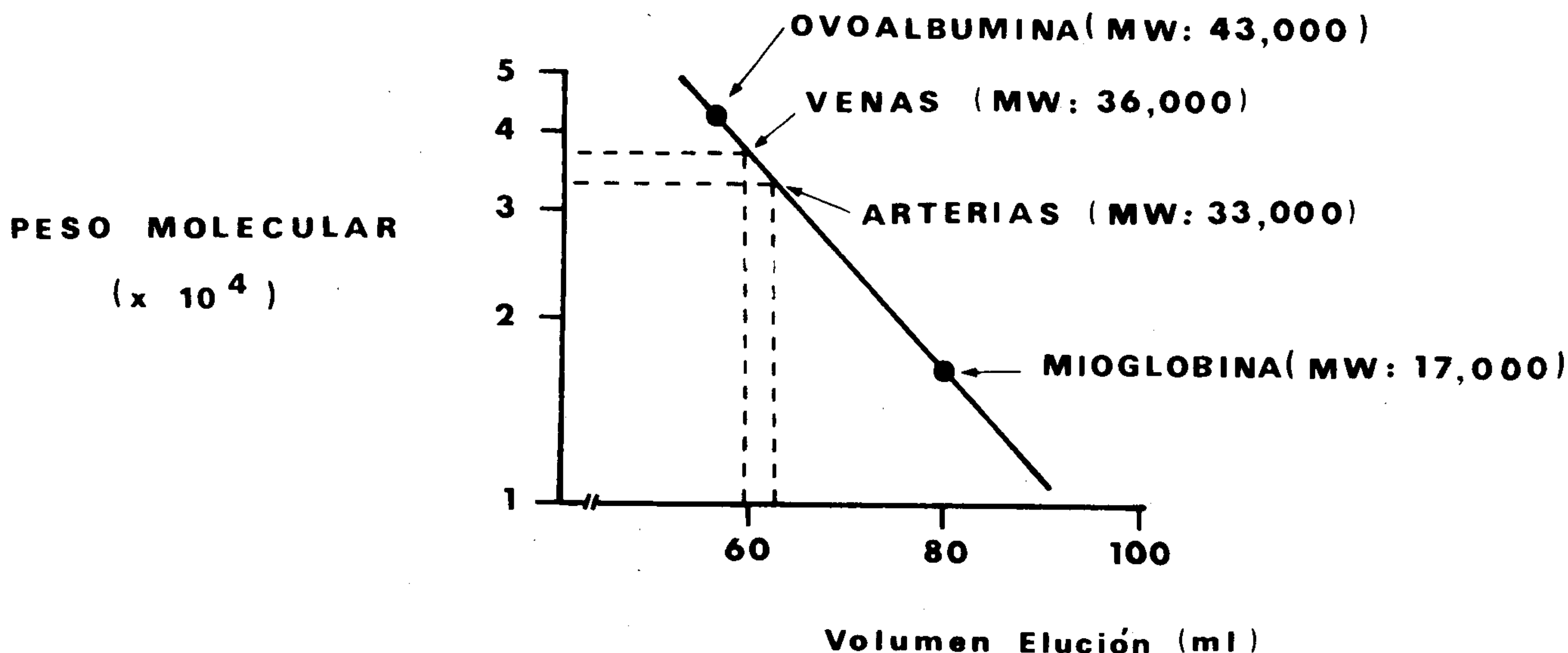


Fig. 3. Determinación del peso molecular aparente de las cininogenasas presentes en venas y arterias de perro, mediante empleo de una columna de AcA₅₄.

DISCUSION

El presente estudio demuestra la existencia de enzimas cininogénicas resistentes al SBTI en arterias y venas de perro. Hemos incluido SBTI en todas las reacciones enzimáticas para circunscribir nuestro estudio a enzimas cininogénicas tipo calicreína. De esta manera eliminamos la posible interferencia de la calicreína plasmática u otras enzimas del tipo de la tripsina, que puedan permanecer en el tejido vascular y que son completamente inhibidas por el SBTI a la concentración usada (100 μ g de SBTI por ml de muestra). Por otra parte, las enzimas del tipo de la calicreína tisular no son afectadas por este inhibidor. Los resultados presentes confirman y amplían observaciones previas realizadas en tejido vascular de rata.^{1,2} En esta oportunidad se ha examinado la actividad cininogénica de arterias y de venas por separado.

Se ha encontrado actividad cininogénica en ambos tejidos vasculares, aunque la concentración en venas es significativamente mayor. Los anticuerpos anticalicreína tisular fueron capaces de inhibir sólo parcialmente la actividad cininogénica, mientras que la mayor parte de la actividad formadora de cininas en ratas fue bloqueada por el anticuerpo anticalicreína. La inhibición parcial observada con anticuerpos anticalicreína tisular en el perro podría ser explicada de dos maneras: a) la cininogenasa presente en vasos de perro es reconocida sólo parcialmente por el anticuerpo, y b) además de calicreína, otra cininogenasa está presente en tejido vascular. Se efectúan actualmente en nuestro laboratorio estudios empleando cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos anticalicreína de perro, con el fin de dilucidar las posibilidades citadas previamente.

El peso molecular aparente obtenido por gel filtración (36.000 y 33.000 daltons) para las cininogenasas venosa y arterial y la ausencia de inhibición por SBTI, distingue a estas enzimas vasculares de otras enzimas plasmáticas tales como plasmina, trombina o calicreína plasmática. Otros autores⁵ han demostrado la presencia de actividad cininogénica en células cebadas, y la presencia de estas células en los tejidos vasculares empleados en el presente trabajo no puede ser descartada. Sin embargo, la cininogenasa descrita en células cebadas es resistente al tratamiento con aprotinina,⁶ que es, en cambio, un potente inhibidor de las enzimas vasculares presentes en arterias y venas de perro.

Los resultados precedentes sugieren que las cininogenasas vasculares son sintetizadas localmente. La presencia de enzimas con capacidad de generar cininas en el propio lecho vascular resulta un hecho promisorio, dado que las cininas generadas en otros

tejidos e hipotéticamente vehiculizadas por la sangre serían rápidamente destruidas antes de llegar a destino.

El rol preciso de las cininogenasas vasculares es aún desconocido. Se sabe que las cininas dilatan las arterias y contraen las venas, y el presente trabajo demuestra la presencia de cininogenasas en arterias y en venas. Podría especularse con que la generación de cininas en el lado arterial influiría localmente en la resistencia vascular y, por consiguiente, en el flujo sanguíneo. La generación de cininas en el lado venoso aumentaría la presión hidrostática en los capilares, debido a la vasoconstricción y secundariamente podría aumentar la permeabilidad vascular.

La interrelación entre cininas, prostaglandinas y el sistema renina-angiotensina es de particular importancia. Las cininas generadas localmente en la propia pared vascular pueden influenciar la actividad de las prostaglandinas y del sistema renina-angiotensina sobre el músculo liso vascular. La angiotensina I generada en la pared vascular puede competir con las cininas, en los sitios de unión con la enzima de conversión (cininasa II); las cininas inducen la síntesis de prostaglandinas de acción opuesta a la angiotensina y además las calicreínas pueden producir activación y liberación de renina.

Las cininas son importantes reguladores de la biosíntesis de prostaglandinas, las cuales son sintetizadas en la propia pared vascular.^{7,8} Las cininas no sólo activan acylhidrolasas, dando lugar a mayor aporte de sustrato para la prostaglandin-ciclooxigenasa, sino que además aumentan la actividad de la PGE-9-ceto-reductasa, que estereoespecíficamente reduce PGE a PGF y determina la relación PGE/PGF en tejidos como los vasculares. La activación de esta enzima en las venas resultaría en un aumento del tono venoso (PGF contrae las venas) y podría ser uno de los mecanismos por los cuales el volumen minuto aumenta en la fase inicial de la hipertensión arterial experimental. Las cininas pueden afectar el grado de constricción de los vasos de resistencia, aumentando las prostaglandinas intramurales. Las cininas modificarían la adhesividad plaquetaria de las superficies endoteliales, a través del control de la formación de PGI₂, un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. La interacción de cininas y prostaglandinas en las venas puede contribuir no sólo a cambios en la capacitancia venosa sino que, además, puede participar en la actividad antitrombótica de la pared venosa a través de la generación de prostaciclina. Todas estas importantes interacciones sólo ocurrirían si hubiera síntesis y liberación local de cininas y prostaglandinas, y no podrían explicarse

por la liberación a la circulación con acción a distancia. Recientemente se ha publicado^{9,10} que la calicreína puede inducir síntesis de PGI₂ por mecanismos independientes de la formación de cininas y que la calicreína participaría en el metabolismo de lipoproteínas de baja densidad.

En resumen, existen proteasas similares a la calicreína tisular en arterias y venas de perro. Estas enzimas se encuentran en forma activa y son capaces de generar cininas a pH fisiológico. Las cininas liberadas localmente en la pared vascular podrían participar en los mecanismos biológicos citados anteriormente.

SUMMARY

Kinin forming enzymes, similar to tissular kallikrein, have been found in dog veins and arteries. Kinin-releasing activity in veins is five fold higher than it is in arteries. Enzyme activity is unaffected by incubation with soybean trypsin inhibitor (SBTI, 100 µg/ml) which makes these enzymes from plasmatic kallikrein. The inhibitory effect of dog urinary antikallikrein antibodies was not complete. When a tissular kallikrein inhibitor, aprotinin (1000 KIU/ml) was used, the vascular kininogenasic activity was completely abolished. The elution volume obtained by gel filtration with chromatographic column of AcA₅₄ was similar to that of tissular kallikrein. The vascular kininogenase of dog arteries and veins showed an apparent molecular weight (33.000 and 36.000 daltons respectively). Their apparent molecular weight and an optimal pH, quite similar to those of tissular

kallikrein. These enzymes or isoenzymes found in blood vessels with kinin forming activity at physiologic pH may probably participate in vascular tone regulation either directly or indirectly through prostaglandin release.

BIBLIOGRAFIA

1. Nolly H, Lama MC: Vascular kallikrein: A kallikrein-like enzyme present in vascular tissue of the rat. *Clinical Science* 63: 249-251, 1982.
2. Nolly H, Scicli A, Scicli G, Carretero O: Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein. *Circulation Research* 56: 816-821, 1985.
3. Carretero O, Oza NB, Piwoska A, Ocholik T, Scicli A: Measurement of urinary kallikrein activity by kinin radioimmunoassay. *Biochemic Pharmacol* 25: 2265-2270, 1976.
4. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976. -
5. Garret JR, Kidd A, Kyriacou K, Smith RE: New observations on the localization of kallikrein-like activity in human salivary parenchymal and mast cells by enzyme histochemistry. *Histochem J* 16: 789-791, 1982.
6. Garret JR, Smith RE, Kidd A, Kyriacou K, Grabske RJ: Kallikrein-like activity in salivary glands using a new tripeptide substrate, including preliminary secretory studies and observations on mast cells. *Histochem J* 14: 967-979, 1984.
7. Terragno NA, Lonigro AJ, Malik KU, McGiff JC: The relationship of the renal vasodilator action of bradykin to the release of prostaglandin E-like substances. *Experientia* 28: 437-439, 1972.
8. Whorton AR, Young SC, Data JL, Barchowsky A, Kent RS: Mechanism of bradykinin-stimulated prostacyclin synthesis in porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Acta* 712: 79-87, 1982.
9. Morita I, Kanayasu T, Morota S: Kallikrein stimulates prostacyclin production in bovine vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 792: 304-309, 1984.
10. Cardin AD, Witt KR, Chao J, Margolius HS, Donalson VH, Jackson RL: Degradation of apolipoprotein B-100 of human plasma low density lipoproteins by tissue and plasma kallikreins. *J Biol Chem* 259: 8522-8528, 1984.