

POTENCIACION DE LOS EFECTOS RENALES DE BRADIQUININA Y BLOQUEO DE SU DESAPARICION EN LA CIRCULACION RENAL POR INHIBICION DE QUININASAS EN EL PERRO ANESTESIADO

José Colina-Chourio*, Alberto Nasjletti** y John C. McGiff**

RESUMEN

En perros anestesiados con morfina-cloralosa se investigó la hipótesis de que la capacidad del riñón para inactivar quininas puede ser un factor determinante de la actividad intrarrenal del Sistema Calicreína-Quinina, estudiando la desaparición de bradiquinina en su paso a través de la circulación renal. Se infundió bradiquinina en la arteria renal a varias dosis, causando aumento de flujo sanguíneo renal, flujo urinario, excreción de sodio y contenido de quininas en la sangre venosa renal, relacionados con la dosis. La administración simultánea de un péptido inhibidor de quininasas ($BPPg_{\alpha}$) potenció estas acciones vasodilatadora, diurética y natriurética de bradiquinina y aumentó la sobrevida de la quinina en su paso a través del riñón. Este aumento de la sobrevida de la quinina fué correlacionado positivamente con los aumentos en flujo sanguíneo renal, flujo urinario y excreción de sodio. $BPPg_{\alpha}$ por sí solo también aumentó el flujo sanguíneo renal, flujo urinario, excreción de sodio, concentración de quininas en sangre venosa renal y excreción urinaria de quininas. Los resultados sugieren que las quininas generadas intrarrenalmente pueden jugar papel importante en la regulación del flujo sanguíneo renal y la excreción hidro-salina, y que las variaciones

* Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

** Department of Pharmacology, University of Tennessee, Memphis, Tennessee, U.S.A.

en la capacidad del riñón para inactivar quininas pueden ser determinantes de la actividad del Sistema Calicreína-Quinina.

INTRODUCCION

Las quininas son un grupo de polipéptidos de cadena recta, resultantes de reacciones enzimáticas y cuyos componentes forman el llamado Sistema Calicreína-Quinina (Fig. 1). Estos polipéptidos son formados por la acción enzimática de las quininogenasas ó calicreínas* que una vez activadas actúan sobre una α_2 globulina del plasma producida en el hígado llamada

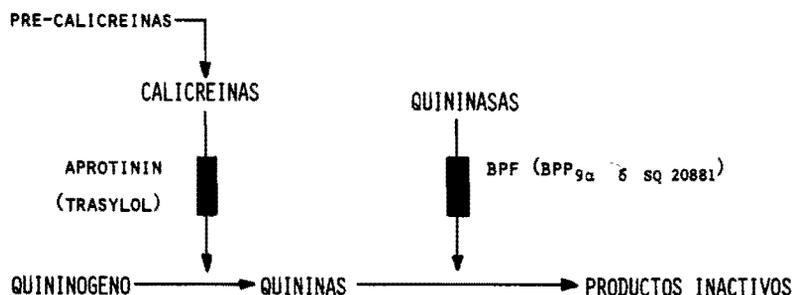


Fig. 1.— Esquema simplificado del Sistema Calicreína-Quinina. BPF = Factor Potenciador de Bradyquinina (Bradykinin Potentiating Factor). La marca rectangular negra significa bloqueo a ese nivel por el producto que aparece a su lado.

quininógeno*, que constituye el sustrato del sistema, resultando en los polipéptidos llamados genéricamente QUININAS; una vez que éstas han ejercido su efecto, son atacadas por otras enzimas colectivamente llamadas quininasas, resultando así inactivadas (Fig. 1). El prototipo del grupo de las quininas lo constituye la bradiquinina (BQ) un nonapéptido (Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (35) que es el vasodilatador más potente hasta ahora conocido; la quinina más importante encontrada en el riñón es el decapeptido calidina (lysil-bradiquinina). El prototipo de las quininogenasas es la calicreína (del griego Kallikreas = páncreas) que se encuentra abundantemente tanto en riñón como en orina (24, 27); este efecto también lo ejercen la tripsina, pepsina y proteasas contenidas en veneno de serpientes (33) y algunos productos bacterianos.

Después del descubrimiento de la bradiquinina por Rocha e Silva, Beraldo y Rosenfeld en Brasil en 1949 (30), se inauguró una nueva era en far-

* La nomenclatura utilizada aquí es la adoptada por el Comité de Nomenclatura de de péptidos hipotensores, véase referencia 29.

macología y fisiología que aunque ha dado fructíferos resultados, aún su papel fisiológico permanece en discusiones. Tanto las calicreínas como las quininas han sido implicadas en una variedad de estados fisiológicos y fisiopatológicos: 1— conversión normal de la circulación intra-uterina a extra-uterina en el recién nacido (23); 2— los efectos natriurético, diurético e hipotensor (1, 20), por lo cual han sido postuladas como el "tercer factor" natriurético o por lo menos a formar parte de dicho sistema; 3— su papel como mediadoras de la liberación intrarrenal de prostaglandinas (7, 22); 4— en condiciones que se acompañan de vasodilatación, hipotensión y/o shock: síndrome de Dumping, shock endotóxico, shock anafiláctico, shock por mordeduras de ciertas serpientes, las quemaduras, pancreatitis aguda, artritis, infarto al miocardio, reacción de Shwartzman, edema angioneurótico (35), síndrome carcinoide (28); 5— más recientemente ha sido demostrado que la excreción urinaria de calicreínas puede estar alterada en varias formas de hipertensión arterial humana (18).

De particular importancia es el hallazgo de dos agentes farmacológicos que pueden bloquear diferentes etapas del sistema (Fig. 1): el Aprotinin inhibe las calicreínas, resultando en bloqueo de la formación del producto activo (9); el BPP_{9α} ó BPF (Bradykinin Potentiating Factor) ó SQ 20881 inhibe las quininasas y fué aislado de veneno de serpientes (2, 10), resultando su efecto en potenciación de las acciones de las quininas por disminución de su destrucción. Este último elemento es utilizado en el presente trabajo.

La demostración de que la orina contiene grandes cantidades de quininas (3, 24) y una calicreína activa similar a la forma activa de calicreína renal o tisular (27), sugiere que las quininas pueden ser generadas dentro del riñón. Puesto que el riñón también es una fuente rica de quininasas (9) la actividad intrarrenal del Sistema Calicreína-Quinina es muy probable que sea una función de tanto los mecanismos generadores (calicreínas) como inactivadores (quininasas) de quininas. La importancia de este último mecanismo no debe ser desestimada cuando se considera la actividad local de hormonas como las quininas, que son inactivadas tan eficazmente por enzimas renales o locales.

En comparación con otros tejidos, el riñón es una de las fuentes más ricas en quininasas, ya que tiene por lo menos 3 tipos de quininasas (9). Puesto que estas enzimas están localizadas predominantemente en estructuras subcelulares (9), la inactivación *in vitro* de quininas por un extracto renal puede ser que no tenga ninguna relación con la inactivación *in vivo* del péptido; por ejemplo, pulmones homogeneizados destruyen más lentamente que los extractos renales (34), mientras que pulmones intactos parece que remueven las quininas circulantes más eficientemente que los ri-

ñones (11). Ferreira y Vane estimaron la capacidad del riñón para remover quininas *in vivo*; en dos experimentos, ellos encontraron que el 72% de la bradiquinina infundida intrarrenalmente desapareció durante su paso a través de la circulación renal del gato (11). Estos experimentos, no obstante, no indican si el péptido fué degradado enzimáticamente o excretado a la orina, como lo sugiere el hallazgo de grandes cantidades de material radioactivo en el riñón y orina de ratas infundidas con bradiquinina marcada (5).

Evidencia reciente sugiere que el Sistema Calicreína-Quinina participa en la regulación de la presión arterial y la homeostasis del metabolismo hidromineral (1, 20), y ésto enfatiza la necesidad de definir los mecanismos e implicaciones funcionales de los procesos inactivadores de quininas en el riñón.

Para evaluar la destrucción intrarrenal de quininas como un mecanismo que modula la actividad del Sistema C-Q en el riñón, se investigó la desaparición de bradiquinina (BQ) exógena en su paso a través de la circulación renal del perro anestesiado antes y después de la administración de un inhibidor de las quininasas (BPPG_α), asumiendo que al inhibir las quininasas las acciones de las quininas son potenciadas. Además se correlacionaron la respuesta renal a infusiones de BQ con la sobrevida del nonapéptido en su paso a través del riñón. Finalmente, se examinaron los efectos de la inhibición de quininasas sobre el flujo sanguíneo renal (FSR) y la excreción de sodio, y sus variaciones se relacionaron con el contenido de quininas en la orina y la sangre venosa renal.

MATERIAL Y METODOS

Perros machos mestizos (23-27 Kg) fueron privados de alimentos por lo menos 12 horas antes del experimento, pero se les permitió libre acceso al agua. Luego fueron anestesiados con sulfato de morfina (2 mg/Kg SC) y cloralosa (100 mg/Kg IV), se canuló la tráquea y los pulmones fueron ventilados mecánicamente con una bomba de presión positiva (Respiration pump, Harvard Apparatus, modelo 607). A través de una incisión abdominal media se expusieron la arteria, vena y uréter del riñón derecho. En un polígrafo (Hewlett-Packard, modelo 7720) se midieron: a) presión arterial media aórtica (PAMA) a través de un catéter de polietileno introducido en dirección retrógrada por la arteria braquial izquierda, y conectado con un transductor de presión arterial (Statham P23 Db). b) flujo sanguíneo renal (FSR) con un medidor de flujo electromagnético no canulante (Statham, modelo M 4001).

A través de la vena femoral derecha se introdujo un catéter de polietileno (O.D 2 mm) y dirigido hasta la vena renal derecha, para obtener muestras de sangre venosa renal. El uréter derecho fué canulado con un catéter de polietileno (PE 160) y se midió el flujo urinario en un cilindro graduado y se obtuvieron muestras de orina para análisis. La arteria renal derecha fué canulada con una aguja 25 conectada a un polietileno, y se infundió a través de una bomba de infusión contínua (Brown Infusion Apparatus, modelo Unita 1); este sistema para infusiones intrarrenales se colocó distal al medidor de flujo y se mantuvo permeable con solución 0.9% NaCl a 0.2 ml/min.

Treinta minutos después de la cirugía, los experimentos se comenzaron. Se infundió Bradiquinina (Sandoz Pharmaceutical, Basilea, Suiza) disuelta en 0.9% NaCl a 0.2 ml/min. Puesto que los efectos vasodilatador, diurético y natriurético de BQ sólo se observaron durante la infusión del nonapéptido, se pudieron infundir varias dosis del agente en el mismo animal, alternando períodos de infusión de BQ con solución salina isotónica (30 minutos c/u).

Se hicieron dos grupos de experimentos. Grupo A: en nueve perros se infundió Bradiquinina (10, 20, 50, 100 y 200 ng/Kg/min) en la arteria renal derecha por períodos de 10 minutos cada dosis, y se determinó el contenido de quininas en la sangre venosa renal en muestras obtenidas en la mitad del período de infusión; este dato se utilizó para calcular la sobrevida de BQ en su paso a través del riñón. Además se midieron las concentraciones de sodio, potasio y quininas en la orina colectada en el período experimental. Grupo B: en seis perros se infundió el péptido inhibidor de quininasas y potenciador de bradiquinina, BPP_{gα} (Fig. 1) (Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro), extraído de veneno de serpientes^(10, 15) (SQ 20881, Squibb, Princeton, New Jersey, USA) disuelto en 0.9% NaCl e inyectado IV (300 μg/Kg) seguido por una infusión contínua del mismo compuesto de 10 μg/Kg/min en 0.5 ml de 0.9% ClNa hasta que el experimento fué terminado, midiéndose el contenido de quininas en orina y sangre venosa renal antes y 30 minutos después de la administración del péptido inhibidor de quininasas (Tabla I). Esto fué seguido por infusiones intrarrenales de Bradiquinina a 3 diferentes dosis (5, 10 y 20 ng/Kg/min) por períodos de 10 minutos cada uno, midiéndose los niveles de quinina en el efluente venoso renal y luego se calculó la sobrevida de bradiquinina en su paso a través de la circulación renal en la mitad del período de infusión. En las muestras de orina se midieron concentraciones de sodio, potasio y quininas.

Se permitieron intervalos de 30 minutos entre cada infusión de BK. En ambos grupos de animales, las mediciones de quininas sanguíneas y

urinarias durante infusiones de BQ se compararon con valores obtenidos durante un período control obtenido al principio de los experimentos (Grupo A) ó 30 minutos después que el BPP_{g α} fué infundido (Grupo B). Todos los otros parámetros fueron comparados con controles obtenidos inmediatamente antes de cada infusión de BQ.

Técnicas analíticas.

El contenido de quininas de la sangre venosa renal se determinó por el método de Binia, Fasciolo y Carretero (4). Todo el material de vidrio usado en el proceso de purificación fué siliconizado. La sangre (50 ml) se colectó rápidamente en frascos de Erlenmeyer que contenían 4 volúmenes de etanol 95% para evitar tanto la formación como la destrucción *in vitro* de quininas. Después de filtración, evaporación, acidificación a pH 1.0 y extracción con 200 ml de éter, la fase acuosa fué evaporada y el pH se ajustó a 7-7.4. Una vez centrifugadas las muestras, las quininas presentes en el sobrenadante se purificaron por extracciones con butanol, se liofilizó la muestra y se disolvió en 1 ml de 0.15 M NaCl y se procedió al bioensayo. La recuperación de BQ agregada (0.2, 0.5 y 1 ng/ml fué $67 \pm 4\%$ ($n = 10$) y no se modificaron cuando se agregó BPP_{g α} a la muestra de sangre (4 μ g/ml). Los resultados fueron corregidos para las pérdidas y expresadas como nanogramos equivalentes de bradiquinina por mililitro de sangre (ng/ml). Este procedimiento (4) fué adaptado también para determinar el contenido de quininas en orina y expresadas de igual manera.

Las muestras de orina se colectaron en tubos plásticos sumergidos en baños de hielo y conteniendo 0.2 ml de 5N HCl para obtener pH 2 a 3, previniendo así la destrucción de quininas por quininasas urinarias presentes. Después de ajustar el volumen a 10 ml con 0.15 M NaCl, el pH se reajustó a 1.0 y se extrajo la muestra con 20 ml de éter, y luego la fase acuosa se purificó 2 veces por extracciones con 10 ml de butanol. La fase acuosa fué descartada y la fase butanol-soluble se extrajo 3 veces con 10 ml de 0.001 N HCl; la fase acuosa se liofilizó y las muestras fueron disueltas en 0.15 M NaCl (2 ml), el pH ajustado a 7.4 y se procedió al bioensayo. La recuperación de BQ agregada (50 ng) fué de $75 \pm 7\%$ ($n = 10$) y no se aumentó cuando se agregó BPP_{g α} (4 μ g). Los resultados fueron corregidos para las pérdidas y fueron expresados como nanogramos de bradiquinina equivalentes por ml de orina (ng/ml). La tasa excretoria de quinina se calculó multiplicando la concentración urinaria de quinina por el flujo de orina y se expresó como nanogramos equivalentes de BQ excretados por minuto (ng/min.).

El bioensayo utilizado para determinar el contenido de quininas en sangre y orina ha sido descrito previamente (26) y es basado en la compara-

ción de la respuesta vasodilatadora a las inyecciones de muestra en la arteria femoral del perro anestesiado, con aquellas producidas por dos inyecciones de BQ sintética estandard (Bradykinin, Sandoz Pharmaceutical, Basilea, Suiza). La sensibilidad de este bioensayo permite detectar 0.05 ng de BQ/ml de sangre cuando se procesan 50 ml de sangre como se ha descrito (4). La diferencia entre las estimaciones de duplicados fué 8.79 ± 1.18% (n = 46, rango 0-25%). La especificidad del bioensayo fué comprobada en muestras seleccionadas por la demostración de que al incubar la muestra (37°C, 15 minutos a pH 7.4) con Carboxipeptidasa B (1 unidad) y quimotripsina (1 mg) abolieron la actividad vasodilatadora presente en las muestras de sangre y orina, así como también la acción de BQ sintética, pero no cuando se incubaron con tripsina (1 mg). Además, alícuotas tanto de sangre como de orina contrajeron tiras aisladas de yeyuno de gato superfundidas en serie con solución de Krebs, de acuerdo con el método de Ferreira y Vane (12). Esta respuesta, que es característica de las quininas, provee soporte adicional de que los extractos purificados de sangre y orina contenían quininas (12).

Las concentraciones de sodio y potasio en orina se midieron por fotometría se llama (Flame Photometer, modelo 510, G-K Turner Associates, Palo Alto, California, USA).

La sobrevida de bradiquinina en su paso a través del riñón fué calculada usando la siguiente fórmula:

$$\text{Sobrevida de Bradiquinina (\%)} = \frac{(K_e \cdot \text{FSR}_e) - (K_c \cdot \text{FSR}_c)}{\text{BK}_i} \times 100$$

donde:

K_e = Concentración de quininas en sangre venosa renal durante la infusión de BQ (experimental), en ng/ml.

FSR_e = Flujo sanguíneo renal al momento de obtener la muestra de sangre experimental, en ng/ml.

K_c = Concentración de quininas en sangre venosa renal durante el período control, en ng/ml.

FSR_c = Flujo sanguíneo renal al momento de obtener la muestra de sangre control, en ml/min.

BK_i = Cantidad de Bradiquinina infundida, en ng/min.

Esta fórmula es adecuada para calcular la sobrevida de BQ en su paso a través del riñón, puesto que las mediciones simultáneas de quininas en sangre de la arteria braquial (0.1 ± 0.02 ng/ml) y vena renal (0.13 ± 0.04 ng/

ml) de perros control ($n = 4$) no mostraron diferencia arterio-venosa significativa; además la concentración de quininas en la sangre arterial braquial de 4 perros antes (0.1 ± 0.02 ng/ml) y durante (0.15 ± 0.04 ng/ml) infusiones intrarrenales de BQ (200 ng/Kg/min) no fué significativamente diferente, sugiriendo que el péptido no recirculó.

Todos los resultados fueron expresados como Media \pm Error Standard de la Media ($M \pm ES$). La significación estadística fué determinada por el test de t de Student basado en observaciones pareadas o no pareadas cuando fué apropiado. Un valor P de 0.05 ó menos fué considerado estadísticamente como significativo. Los análisis estadísticos fueron hechos de acuerdo con los métodos descritos por Steel y Torrie (32).

RESULTADOS

Sobrevida de bradiquinina en su paso a través del riñón.

En nueve perros, el promedio de FSR y PAMA en el comienzo de los experimentos fueron 169 ± 18 ml/min (3.13 ml/g de tejido húmedo) y 111 ± 6 mm Hg respectivamente. Al final de los experimentos ni FSR ni PAMA fueron diferentes del control (159 ± 19 ml/min y 108 ± 6 mm Hg respectivamente). La infusión de BQ en la arteria renal causó aumento rápido y sostenido de FSR, flujo de orina y excreción de sodio, mientras que la presión arterial sistémica no se modificó aún a dosis de 200 ng/Kg/min. En 3 experimentos en los cuales estos parámetros fueron medidos en el riñón contralateral no hubo ninguna alteración durante las infusiones intrarrenales de BQ. Estos cambios en FSR, flujo urinario y excreción de sodio provocados por BQ fueron relacionados con la dosis (Fig. 2). Por el contrario, los efectos de BQ sobre la excreción de potasio no fueron relacionados con la dosis, aunque usualmente se observó kaliuresis (Fig. 2).

Todas las variables medidas retornaron a valores de preinfusión de BQ durante los 5 ó 10 minutos después de haber terminado la infusión del péptido. La concentración de quininas en la sangre venosa renal durante el período control fué de 0.16 ± 0.03 ng/ml; las infusiones intra-arteriales de BQ resultaron en aumentos en la concentración de quininas en la sangre venosa renal relacionados con la dosis (Fig. 3). No obstante, en toda instancia menos del 25% del péptido infundido apareció en el efluente venoso renal, indicando que más del 75% de BQ fué removida ó inactivada dentro del riñón (Fig. 3). No estuvo relacionado con la concentración de quininas en la sangre arterial renal, puesto que durante las infusiones de BQ a tasas de 20 y 200 ng/Kg/min los porcentajes de sobrevivencia del péptido en su paso a través de la circulación renal fueron $12.72 \pm 1.64\%$ y $12.59 \pm 2.24\%$

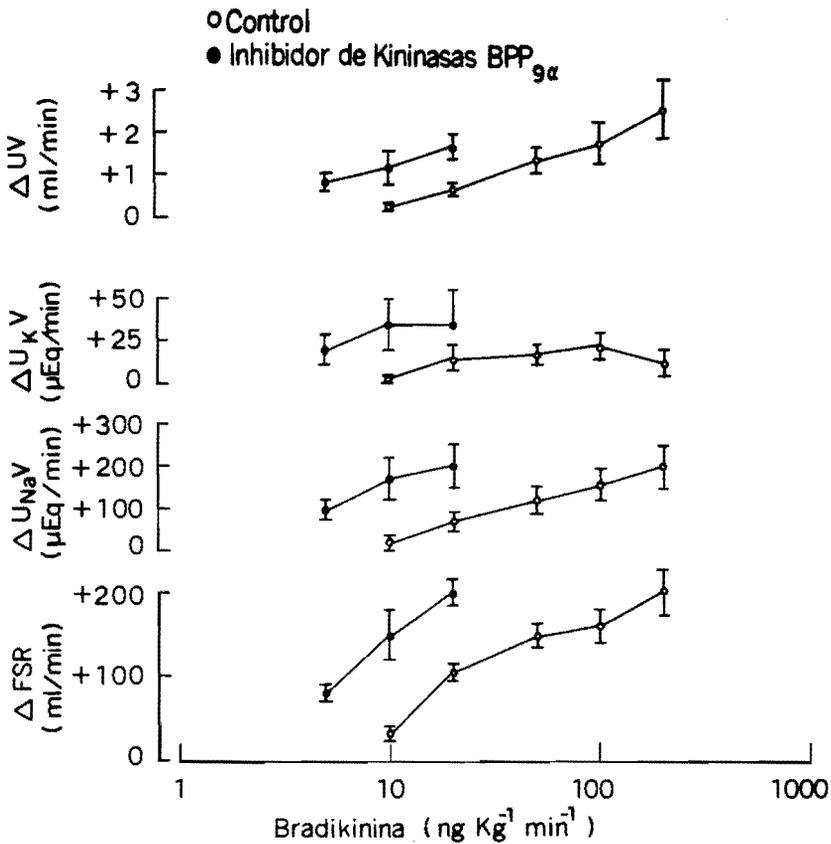


Fig. 2.— Cambios en flujo sanguíneo renal (FSR), excreción de sodio (U_{NaV}), excreción de potasio (U_{KV}) y flujo urinario (UV) durante la infusión ipsilateral de bradiquinina en la arteria renal de perros normales (Control) y tratados con inhibidor de quininasas BPP_{9α}. Cada punto representa la media de las diferencias en por lo menos 4 experimentos, entre los valores controles y obtenidos durante la infusión de bradiquinina. Las barras verticales indican Error Standard de la media.

respectivamente (Fig. 3). La tasa de excreción de quininas por la orina durante el período control fué 2.70 ± 1.09 ng/min y no fué alterada por las infusiones de BQ a 20 y 50 ng/Kg/min, mientras que una dosis más alta (200 ng/Kg/min) causó aumento del doble en la excreción del péptido ($P < 0.01$) (Fig. 3).

Efectos de la inhibición de quininas sobre la sobrevida de bradiquinina en su paso a través del riñón.

Después de la administración IV del compuesto inhibidor de quininas BPP_{9α} (10, 15), FSR aumentó 16% ($P < 0.01$) y PAMA disminuyó desde

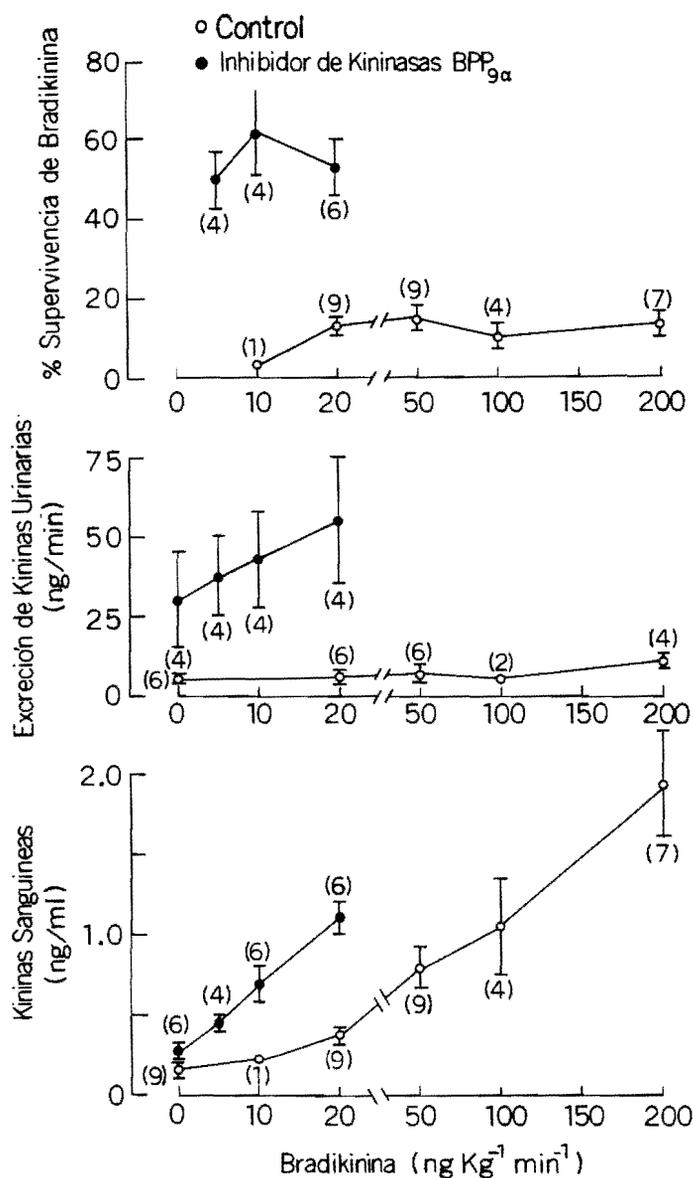


Fig. 3.— Efectos del inhibidor de quininas BPP_{9α} sobre el contenido de quininas en la sangre venosa renal, excreción urinaria de quininas y la sobrevivencia de quininas en su paso a través del riñón del perro durante infusiones intra-arteriales de bradiquinina. Los números entre paréntesis indican el número de experimentos, y las barras verticales indican el Error Standard de la media.

104 hasta 96 mm Hg ($P < 0.02$) (Tabla I). Simultáneamente, el flujo de orina y excreciones de sodio y potasio fueron aumentadas hasta 115%, 167% y 40% respectivamente (Tabla I). Treinta minutos después de la administración de $BPP_{9\alpha}$ la concentración media de quininas en la sangre venosa renal aumentó desde 0.11 ± 0.03 hasta 0.2 ± 0.05 ng/ml ($P < 0.005$, Tabla I). Así mismo, la concentración y excreción de quininas urinarias aumentaron de 14.6 ± 3.2 ng/ml y 4.4 ± 1.1 ng/min hasta 53.7 ± 13.6 ng/ml ($P < 0.02$) y 38.5 ± 12.2 ng/min ($P < 0.02$) respectivamente (Tabla I).

TABLA I
EFECTOS DE $BPP_{9\alpha}$ SOBRE FUNCION RENAL, QUININAS SANGUINEAS Y LA EXCRECIÓN DE QUININAS URINARIAS EN EL RIÑON DE PERRO ANESTESIADO

Tratamiento	Presión aórtica media mm Hg	Flujo sanguíneo renal ml/min	Excreción de sodio μ Eq/min	Excreción de potasio μ Eq/min	Flujo urinario ml/min	Excreción de quininas sanguíneas ng/ml	Excreción de quininas urinarias ng/min
Control (n = 6)	104 \pm 3	158 \pm 24	36.8 \pm 10.1	24 \pm 3.2	0.29 \pm 0.06	0.11 \pm 0.03	4.4 \pm 1.1
$BPP_{9\alpha}$ (n = 6)	96 \pm 2	184 \pm 29	98.4 \pm 26.6	33.8 \pm 5.5	0.64 \pm 0.12	0.24 \pm 0.05	38.5 \pm 12.2
P	<0.02	<0.01	<0.02	<0.05	<0.005	<0.005	<0.005

Los niveles de quininas en la sangre venosa renal antes y después de administrar $BPP_{9\alpha}$ fueron correlacionadas positivamente con el FSR ($r = 0.77$, $P < 0.01$), excreción de sodio ($r = 0.82$, $P < 0.01$) y flujo urinario ($r = 0.85$, $P < 0.01$). Así mismo, la excreción urinaria de quininas fué correlacionada positivamente con FSR ($r = 0.65$, $P < 0.05$), excreción de sodio ($r = 0.92$, $P < 0.01$) y flujo urinario ($r = 0.82$, $P < 0.01$). En contraste, ni la excreción urinaria de quininas ni los niveles de quininas en la sangre venosa renal fueron correlacionados con la excreción de potasio ($r = 0.39$ y $r = 0.09$ respectivamente).

Después de la administración de $BPP_{9\alpha}$ las acciones renales de BQ infundida intrarrenalmente fueron potenciadas (Fig. 2). A 20 ng/Kg/min los incrementos en FSR, flujo urinario y excreción de sodio causados por BQ fueron aumentados en 90% ($P < 0.01$), 173% ($P < 0.01$) y 146% ($P < 0.05$) respectivamente. Las curvas de dosis-respuesta de BQ fueron desviadas a la izquierda de manera paralela y en ningún momento la PAMA fué alterada por las infusiones de la quinina.

La concentración de quininas en la sangre venosa renal aumentó varias veces durante la infusión de BQ; los niveles fueron 3 veces más altos que aquellos encontrados durante la infusión de la misma dosis (20 ng/Kg/min) de BQ en la ausencia de BPP_{9α} ($P < 0.001$) (Fig. 3). De la misma manera, la sobrecarga de BQ en su paso a través de la circulación renal del perro fue aumentada por BPP_{9α} de $12.72 \pm 1.7\%$ hasta $53.92 \pm 7.48\%$ ($P < 0.001$) (Fig. 2). Los aumentos en FSR, flujo urinario y excreción de sodio producidos por BQ antes y después de la administración de BPP_{9α} fueron correlacionados positivamente con la sobrecarga de BQ (Fig. 4). Variaciones en la tasa de infusión de BQ no influenciaron la sobrecarga del péptido (Fig. 3). Por último, la excreción urinaria de quininas no aumentó significativamente durante la administración intrarrenal de bradiquinina (Fig. 4).

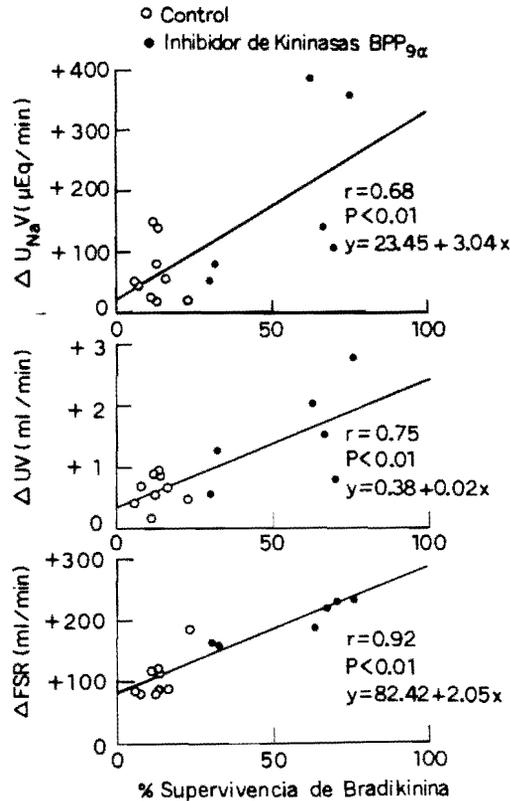


Fig. 4.— Relación entre supervivencia de bradiquinina en su paso a través del riñón y los cambios en flujo sanguíneo renal (FSR), flujo urinario (UV) y excreción de sodio ($U_{Na}V$) provocados por las infusiones de bradiquinina en la arteria renal (20 ng/Kg/min) en perros normales (Control) y pretratados con el inhibidor de quininasas BPP_{9α}.

DISCUSION

Cuando bradiquinina se infundió en la arteria renal de perros anestesiados, un poco más del 10% del nonapéptido fué recuperado en el efluente venoso renal. Esto sugiere que casi el 90% de la quinina fué inactivada ó excretada en su paso a través del riñón. La estimación de la sobrevida de BQ, aunque fué menor que la de Ferreira y Vane en gastos (11) usando la técnica de superfusión de órganos con sangre, es comparable. La desaparición de quininas en su paso a través de la circulación renal pudo ser debida a: a) excreción urinaria del péptido (5) ó b) inactivación por las quininasas sanguíneas y renales.

La primera posibilidad es remota, puesto que durante las infusiones de BQ a 200 ng/Kg/min la excreción urinaria del péptido aumentó sólo el doble, y esta diferencia representa apenas un 0.1% de la cantidad infundida (5 µg). Aunque la destrucción de BQ por quininasas sanguíneas es una posibilidad cierta, no parece ser la responsable de la tasa de desaparición tan alta encontrada aquí, puesto que la media vida de BQ en sangre es de 17 segundos (11, 21) y el tiempo promedio de tránsito sanguíneo renal es de cerca de 6 segundos (31). De tal manera que la desaparición de más del 17% puede indicar participación del tejido renal (quininasas tisulares renales) en el proceso de remover ó destruir las quininas. En soporte de esta afirmación hemos demostrado que el riñón aislado del conejo perfundido con solución Krebs-Bicarbonato inactivó más del 99% de BQ infundida (7). La abundancia de quininasas renales ha sido bien establecida (9) y pueden ser responsables en gran parte por la desaparición de BQ en su paso a través de la circulación renal. La observación de que el nonapéptido inhibidor de quininasas BPP_{gα} (10, 15) aumentó en 4 veces la sobrevida de BQ infundida intrarrenalmente soporta fuertemente esta interpretación.

Después de la administración de BPP_{gα} las acciones vasodilatadora renal, diurética y natriurética de BQ fueron potenciadas. Esta potenciación puede ser atribuída a inactivación disminuída de la quinina dentro del riñón, resultando en aumento de la concentración del péptido en su(s) sitio(s) de acción. Aunque el ó los sitios de inactivación de BQ son desconocidos, la correlación positiva entre los efectos de BQ y su sobrevida sugiere que tales sitios y los de acción son distales.

Las infusiones intrarrenales de BQ a 20 y 50 ng/Kg/min fueron incapaces de aumentar la excreción urinaria de quininas. Aumentando la dosis de manera de establecer niveles de quininas en sangre arterial por lo menos 100 veces más altos que los normales se obtuvo apenas un aumento de 2 veces en la excreción de quininas, lo cual fué equivalente a 0.1% de la cantidad de quininas infundidas. Estas observaciones, las cuales no fueron

modificadas después de la inhibición de las quininas son consistentes con la idea de que las quininas urinarias se originan intrarrenalmente (37).

La observación descrita en el presente trabajo de que la inhibición de la actividad de quininas con $BPPg_{\alpha}$ aumenta la excreción de quininas urinarias (10 veces), sugiere fuertemente que la degradación intrarrenal está envuelta en la regulación de los niveles de quininas dentro del riñón. Puesto que las quininas urinarias es casi seguro que se originan en el riñón, su excreción aumentada en respuesta a inyección de $BPPg_{\alpha}$ sugiere una actividad aumentada del Sistema Calicreína-Quinina dentro del riñón.

El bloqueo de la actividad de quininas estuvo asociado con vasodilatación renal (aumento en FSR), diuresis (aumento en el flujo urinario) y natriuresis (aumento en la excreción de sodio). Puesto que BQ produjo efectos similares, corroborando hallazgos anteriores (36), las acciones renales de $BPPg_{\alpha}$ pueden ser atribuidas a un aumento en los niveles de quininas. Esta interpretación no toma en cuenta dos hechos: a) la incapacidad de $BPPg_{\alpha}$ para inhibir la enzima convertidora de Angiotensina I a II (2, 8) y b) las acciones vasoconstrictora renal, antidiurética y anti-natriurética de Angiotensina II (16). De manera que $BPPg_{\alpha}$ también pudo producir vasodilatación renal, diuresis y natriuresis a través del mecanismo de inhibir la conversión intrarrenal y extrarrenal de Angiotensina I a Angiotensina II; sin embargo, esta posibilidad es remota, basados en los hallazgos de incapacidad de un antagonista competitivo de Angiotensina II en afectar el FSR y la excreción de sodio en perros normales (13). Similarmente, la posibilidad de un efecto de $BPPg_{\alpha}$ sobre la función renal también es remota ya que este agente fue incapaz de producir vasodilatación renal en el riñón aislado de rata perfundido con un medio artificial depletado de quinínogeno (17), la proteína precursora de las quininas.

La participación del Sistema Calicreína-Quinina en la regulación de la función renal y la homeostasis del sodio y agua fue sugerida por estudios que demostraron excreción aumentada de calicreínas urinarias en estados caracterizados por exceso de mineralocorticoides (1, 6, 14, 18) y que después de una sobrecarga salina hubo reducción del quinínogeno plasmático en la rata (25), aumento en la excreción urinaria de calicreína (1) y aumento en la concentración sanguínea de un material semejante a quininas de origen renal (20). El presente estudio provee evidencia para soportar este concepto; la inhibición de la actividad de quininas con $BPPg_{\alpha}$ resultó en vasodilatación, diuresis y natriuresis. Además los niveles de quininas en la sangre venosa renal y la excreción urinaria de quininas fueron correlacionadas positivamente con FSR, flujo urinario y excreción de sodio (Fig. 4). Estas observaciones que son indicativas de un papel de las quininas como mediadoras de la vasodilatación renal y natriuresis, son consistentes con la

demostración reciente de que anticuerpos contra bradiquinina atenúan la respuesta natriurética a una carga salina en ratas (19). Sin embargo, son difíciles de concordar con las observaciones de aumento en la excreción urinaria de caliceínas en estados de depleción de sodio (14, 18), una condición en la cual la excreción de sodio está suprimida.

Aunque estos resultados no permiten la asignación definitiva de un papel fisiológico del Sistema Caliceína-Quinina renal, ellos sugieren que las quininas generadas intrarrenalmente, bien sea actuando solas o en conexión con otros sistemas intrarrenales como las Prostaglandinas (7, 22), juegan un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo renal y la excreción de sodio y agua por el riñón.

Agradecimientos

A Cheri L. Fry y Jo Anne Early por la asistencia técnica. A la Srta. Annabell Castillo por la transcripción del manuscrito. Al Dr. F.F. Giarusso del Squibb Institute, Princeton, New Jersey U.S.A. por la generosa donación del producto SQ 20881 (BPP_{9α}).

ABSTRACT

Potential of the renal effects of bradykinin and blockade of its disappearance in the renal circulation by inhibition of kininases in the anesthetized dog. Colina-Chourio J. (Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Cátedra de Fisiología, Maracaibo, Venezuela), Nasjletti A., and McGiff J.C. *Invest Clín* 21(1): 3-21, 1980.— In morphine-chloralose anesthetized dogs, the hypothesis that the capacity of the kidney to inactivate kinins may be a major factor determinant of the intrarenal activity of the Kallikrein-Kinin System was investigated by studying the disappearance of bradykinin on passage across the renal circulation. Bradykinin was infused into a renal artery at various doses, producing an increase related with the dose on renal blood flow, urinary flow, sodium excretion and kinin content of the renal venous blood. Simultaneous intravenous administration of a peptide kininase inhibitor (BPP_{9α}) potentiated the renal vasodilator, diuretic and natriuretic actions of bradykinin and augmented the survival of the kinin on passage through the kidney. Furthermore, the values of nonapeptide survival were positively correlated with the increases in renal blood flow, urine flow and sodium excretion. BPP_{9α} by itself increased renal blood flow, urine flow, sodium excretion, the concentration of kinin in renal venous blood and the excretion or urinary kinins. These results suggest that kinins generated intrarenally play a role in the regulation of renal blood flow and salt-water excretion, and that variations in the capacity of the kidney to inactivate kinins may be a determinant of the intrarenal activity of the kallikrein-kinin system.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ADETUYIBI A, MILLS IH: Relation between urinary kallikrein and renal function, hypertension and excretion of sodium and water in man. *Lancet* 2 (7770): 203-207, 1972.
- 2- BAKHLE YS: Inhibition of converting enzyme by venom peptidases. In: *Hypertension '72*, Genest J, Koiv E, ed, p. 541, Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- 3- BERALDO WT: Substance U - a depressor and smooth muscle stimulating principle present in urine. *Am J Physiol* 171 (2): 371-377, 1952.
- 4- BINIA A, FASCIOLO JC, CARRETERO OA: A method for the estimation of bradykinin in blood. *Acta Physiol Latinoamer* 13: 101-109, 1963.
- 5- BUMPUS FM, SMEBY RR, PAGE IH, KHAIRALLAH PA: Distribution and metabolic fate of angiotensin II and various derivatives. *Canad Med Ass J* 90 (4): 190-193, 1964.
- 6- COLINA-CHOURIO J, MCGIFF JC, NASJLETTI A: Effects of corticosteroids on urinary kallikrein excretion. *Clin Res* 32 (4): 623A, 1974.
- 7- COLINA-CHOURIO J, MCGIFF JC, MILLER MP, NASJLETTI A: Possible influence of intrarenal generation of kinins on Prostaglandin release from the rabbit perfused kidney. *Brit J Pharmacol* 58 (2): 165-172, 1976.
- 8- CUSHAM DW, CHEUNG HS: Studies in vitro of angiotensin converting enzyme of lung and other tissues. In: *Hypertension '72*, Genest J, Koiv E, ed, p. 532, Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- 9- ERDÖS EG, YANG HYT: Inactivation and potentiation on the effects of bradykinin. In: *Hypotensive Peptides*, Erdős EG, Back N, Sicuteri F, eds, p. 235, Springer-Verlag, New York, 1966.
- 10- FERREIRA SH: A Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops Jararaca*. *Brit J Pharmacol Chemother* 24 (1): 163-169, 1965.
- 11- FERREIRA SH, VANE JR: The disappearance of bradykinin and eleodoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Brit J Pharmacol Chemother* 30 (2): 417-424, 1967.

- 12- FERREIRA SH, VANE JR: The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood. *Brit J Pharmacol Chemother* 29 (3): 367-377, 1967.
- 13- FREEMAN RH, DAVIES JO, VITALE SJ, JOHNSON JA: Intrarenal role of angiotensin II. *Circ Res* 32 (3): 692-698, 1973.
- 14- GELLER RG, MARGOLIUS HS, PISANO JJ, KEISER HR: Effects of mineralocorticoids, altered sodium intake and adrenalectomy on urinary kallikrein in rats. *Circ Res* 31 (6): 857-861, 1972.
- 15- GREEN LJ, CAMARGO ACM, KRIEGER EM, STEWART JM, FERREIRA SH: Inhibition of the conversion of angiotensin I to II and potentiation of bradykinin by small peptides present in *Bothrops Jararaca* venom. *Circ Res* 31 (Suppl II): 62-71, 1972.
- 16- HEALY JK, BARCENA C, O'CONNEL JMB, SCHREINER GE: Renal and pressor action of angiotensin in the normal dog. *Am J Physiol* 208 (6): 1093-1098, 1965.
- 17- HOFBAUER KG, ZSCHIEDRICH H, RAUH W, GROSS F: Conversion of angiotensin I into angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *Clin Sci* 44 (5): 447-456, 1973.
- 18- MARGOLIUS HS, HORWITZ D, GELLER RD, ALEXANDER RW, GILL JR, PISANO JJ, KEISER HR: Urinary kallikrein excretion in normal man: relationships to sodium intake and sodium-retaining steroids. *Circ Res* 35 (6): 812-819, 1974.
- 19- MARIN-GREZ M: The influence of antibodies against Bradykinin on isotonic saline diuresis in the rat. Evidence for kinin involvement in renal function. *Pflügers Arch* 350 (3): 231-239, 1974.
- 20- MARIN-GREZ M, COTTONE P, CARRETERO OA: Evidence for an involvement of kinins in regulation of sodium excretion. *Am J Physiol* 223 (4): 794-796, 1972.
- 21- McCARTHY DA, POTTER DE, NICOLAIDES ED: An *in vivo* estimation of the potencies and half-lives of synthetic bradykinin and kallidin. *J Pharmac Exp Ther* 148 (1): 117-122, 1965.
- 22- McGIFF JC, TERRAGNO N, MALIK KU, LONIGRO AJ: Release of a Prostaglandin E-like substance from canine kidney by bradykinin. *Circ Res* 31 (1): 36-43, 1972.
- 23- MELMON KL, CLINE MJ, HUGHES T, NIES AS: Kinins: possible mediators of neonatal circulatory changes in man. *J Clin Invest* 47 (6): 1295-1302, 1968.

- 24- MIWA I, ERDÖS EG, SEKI T: Presence of three peptides in urinary kinin (Substance Z) preparations. *Life Sci* 7 (24): 1339-1343, 1968.
- 25- NASJLETTI A, AZZAM ME: Variations of plasma kininogen due to high sodium intake in rats. *Experientia* 26 (3): 280-281, 1970.
- 26- NASJLETTI A, COLINA-CHOURIO J, McGIFF JC: Assay of kinins by their effects on canine femoral blood flow. *Proc Soc Expt Biol Med* 150 (2): 493-497, 1975.
- 27- NUSTAD K: The relationship between kidney and urinary kininogenase. *Brit J Pharmacol* 39 (1): 73-86, 1970.
- 28- OATES JA, MELMON KL: Biochemical and physiological studies of the kinins in Carcinoid Syndrome. In: *Hypotensive Peptides*, Erdős EG, Back N, Sicuteri F, ed, p. 565, Springer-Verlag, New York, 1966.
- 29- REPORT OF THE COMMITTEE ON NOMENCLEATURE FOR HYPOTENSIVE PEPTIDES, compiled by WEBSTER ME. In: *Hypotensive Peptides*, Erdős EG, Back N, Sicuteri F, ed, p. 648, Springer-Verlag, New York, 1966.
- 30- ROCHA e SILVA M, BERALDO WT, ROSENFELD G: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 156 (2): 261-273, 1949.
- 31- SPECTOR WS: *Handbook of biological data*. p. 285, W.B. Saunders, Philadelphia, 1956.
- 32- STEEL RGD, TORRIE JH: *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill, New York, 1960.
- 33- SUZUKI T, IWANAGA S: Snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. XXV. Bradykin, Kallidin and Kallikrein, Erdős EG, ed, p. 193, Springer-Verlag, Berlin, 1970.
- 34- TRAUTSCHOLD I: Enzyme und inhibitoren der bildung und des abbaues gefäßaktiver polypeptide (kinine). (Doctoral Thesis, Munich 1965). In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. XXV. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, Erdős EG, ed, p. 303, Springer-Verlag, Berlin 1970.
- 35- WHILHELM DL: Kinins in human disease. *Ann Rev Med* 22: 63-84, 1971.

- 36- WILLIS LR, LUDENS JH, HOOK JB, WILLIAMSON HE: Mechanism of natriuretic action of bradykinin. *Am J Physiol* 217 (1): 1-5, 1969.
- 37- YOSHINAGA K, ABE K, MIWA I, FURUYAMA T, SUZUKI Ch: Evidence for the renal origin of urinary kinin. *Experientia* 20 (7): 396-397, 1964.
-