

Especificidad de la determinación de la actividad calicreína urinaria mediante un ensayo amidolítico

J. Camps, J. Costa, R. M. Pérez-Ayuso, A. Rimola, V. Arroyo y J. Gaya

Unidad de Hepatología
y Laboratorio Hormonal
Hospital Clínico y Provincial.
Universidad de Barcelona

(Recibido el 28 de diciembre de 1982)

J. CAMPS, J. COSTA, R. M. PEREZ-AYUSO, A. RIMOLA, V. ARROYO and J. GAYA- *Specificity of the Urinary Kallikrein Activity Determination with an Amidolytic Assay.* Rev. esp. Fisiol., 39, 225-230. 1983.

The specificity of a method for the determination of the urinary kallikrein activity based on the amidolytic hydrolysis of the synthetic substrate H-D-valyl-leucyl-arginine-*p*-nitroanilide has been studied. Results show a good specificity for kallikrein. The amidolytic activity was totally inhibited by aprotinin. The urinary amidolytic activity showed identical dependence on changes in the ionic strength and pH of the incubation medium as the highly purified kallikrein. The sensitivity of the assay was 0.6 nkat/l. The intra-assay coefficient of variation was 4% and the inter-assay coefficient of variation was 10%. The percentage of recovery was between 100 and 110% indicating that no activators or inhibitors of the kallikrein activity on this substrate were present in the urinary samples. Values obtained in presumably healthy subjects were 0.14 ± 0.08 pkat/s in man (range: 0.05 - 0.27 pkat/s) and 0.49 ± 0.11 pkat/s in rat (range: 0.35 - 0.58 pkat/s).

La calicreína es una enzima que cataliza la formación de los péptidos vasodiladores bradisinina y lisilbradisinina (calidina) a partir de un sustrato, el cininógeno (8). Existen dos tipos de calicreína, plasmática y glandular, que difieren en sus mecanismos de activación, identidad inmunológica, propiedades físico-químicas, velocidades de reacción con sustratos naturales o sintéticos y grado de inhibición por determinados antagonistas

(9, 19, 22). La calicreína producida en el riñón se excreta, en parte, por la orina (6, 18). En el momento actual se asume que la medición de la calicreína urinaria estima la producción renal de esta enzima (5). Existen evidencias de que la calicreína renal participa en el metabolismo renal del agua y del sodio (16, 17) y en la regulación del flujo sanguíneo renal (4, 15). Se han descrito varios métodos para valorar la calicreína urinaria, como la medición de la concentración de la calicreína por radioinmunoanálisis (21) o la determinación de la actividad calicreína urinaria a través de la producción de bradisinina (1, 23) o la ruptura esterolítica de sustratos sintéticos (7, 11, 14). Los ensayos es-

Dirección para correspondencia: J. Camps. Unidad de Hepatología. Hospital Clínico y Provincial. Barcelona - 36.

terolíticos son más accesibles a la mayoría de los laboratorios por su simplicidad; sin embargo, los substratos empleados no son suficientemente específicos ya que las reacciones de hidrólisis son fácilmente influenciadas por inhibidores o activadores de la actividad caliceína presentes en la orina. Actualmente se dispone de un substrato sintético cromogénico, H-D-valil-leucilarginina-*p*-nitroanilida (S-2266, Kabi Diagnostica, Suecia) con el que se mide la actividad amidolítica de la caliceína. Aunque se han descrito ya algunos ensayos empleando este substrato (2,3) no existen estudios completos de su especificidad y de la sensibilidad del ensayo a interferencias de activadores o inhibidores. En el presente estudio se investiga la especificidad de un método para la determinación de la actividad caliceína urinaria utilizando este substrato, así como otros criterios de validez. El estudio se realizó en la orina de sujetos sanos y de ratas normales.

Material y métodos

Obtención de las muestras de orina. El presente trabajo se llevó a cabo en 15 sujetos (9 varones y 6 mujeres) entre 25 y 46 años de edad, en los que se recogió la orina de ocho horas (8-16 h) y en 10 ratas Wistar de 200 a 300 g de peso en las que se recolectó la orina de 24 horas manteniendo a los animales en jaulas metabólicas individuales con libre acceso a comida y bebida y después de una semana de adaptación. En todas las muestras se midió el volumen urinario y una parte alícuota se congeló a -20°C hasta la realización del ensayo; un estudio previo (Camps, J., observaciones no publicadas) demostró que no existían pérdidas en la actividad caliceína en muestras conservadas hasta seis meses a -20°C . El día del ensayo la orina se descongeló y se centrifugó a $2.000 \times g$, después de lo cual la actividad caliceína se determinó en el

sobrenadante sin diluir o diluido en el tampón que se describe más adelante.

Determinación de la actividad caliceína. 400 μl de orina o de patrón de caliceína (Calbiochem-Behring Corp., USA) se incubaron a 37°C con 500 μl de tampón tris-HCl 0,2 mol/l ($\text{pH} = 9,0$) y 100 μl de substrato 1,5 mmol/l durante 60 min exactamente. La reacción se detuvo por la adición de 100 μl de aprotinina (Trasylo[®], Bayer, RFA) 100.000 KIU/l, potente inhibidor de la actividad caliceína. Los problemas se determinaron por duplicado, junto con un blanco para cada problema en el que el tampón contenía 20.000 KIU/l de aprotinina. La reacción colorimétrica se basa en la liberación del cromóforo *p*-nitroanilina, que absorbe la luz de una longitud de onda de 405 nm, por la acción de la caliceína urinaria. La absorbancia media de cada problema se transformó en nkat/l multiplicándola por un factor de 76 (12). La actividad caliceína urinaria se expresó como excreción en pkat/s.

La posibilidad de la existencia de hidrólisis espontánea del substrato se estudió valorando la absorbancia de una solución del mismo, frente a agua destilada a distintos tiempos de incubación a 37°C . La existencia de actividad amidolítica inespecífica en las muestras de orina se estudió valorando la absorbancia, frente a agua destilada, a distintos tiempos de incubación, de orina a la que se añadieron 100.000 KIU/l de aprotinina. Además se comparó la sensibilidad a las condiciones físico-químicas del medio de incubación de la actividad amidolítica presente en la orina y la de una solución de caliceína glandular altamente purificada. La existencia de activadores o inhibidores de la actividad caliceína en las muestras de orina se investigó incubando cantidades conocidas de caliceína patrón con orina y calculando el porcentaje de recuperación (20). Se estudió también la sensibilidad y la precisión del método.

Resultados

Dentro del margen estudiado, la curva patrón de calicreína es lineal (fig. 1). La concentración mínima de aprotinina que produce una total inhibición de la actividad calicreína es de 10,000 KIU/l (fig. 2).

Del estudio de la hidrólisis inespecífica del sustrato (tabla I) se desprende que la incubación de éste durante 1 hora a 37° C no produce ningún aumento de la absorbancia, indicando que no existe hidrólisis espontánea del grupo cromógeno, ni hidrólisis cuando el sustrato se incubaba con orina y 100,000 KIU/l de aprotinina. En la figura 3 se representa la dependencia de la actividad calicreína hacia las condiciones físico-químicas del medio de incubación. La fuerza iónica del tampón no influye en esta actividad entre un margen de 0,10 y 0,50 mol/l tanto con calicreína purificada como con muestras de orina. El pH, en cambio, influye en gran medida en ambas actividades enzimáticas. La actividad amidolítica urinaria demostró la misma dependencia hacia las condiciones del

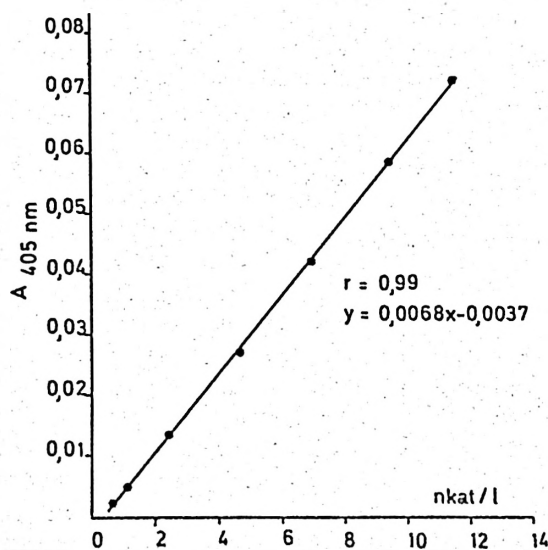


Fig. 1. Curva patrón de actividad calicreína urinaria. r es el coeficiente de correlación de la recta de regresión de Y sobre X .

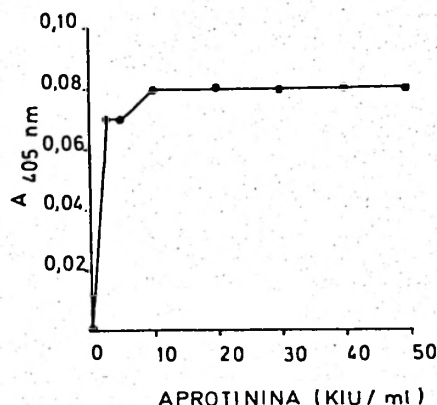


Fig. 2. Optimización de la concentración de aprotinina en el blanco.

medio de incubación que la calicreína altamente purificada. La figura 4 muestra las curvas de dilución de orinas de hombre y de rata; estas curvas fueron lineales en el hombre a todas las diluciones estudiadas; en cambio, en la rata se encontró una actividad calicreína urinaria superior y que no cumplía diluciones hasta, aproximadamente, la dilución 1/32; por esta causa la actividad calicreína se determinó en la rata en muestras diluidas 1/150.

Las curvas de cinética enzimática con orinas de hombre y de rata, muestran que la reacción fue lineal hasta los 90 minutos (fig. 5). La sensibilidad del método, definida como la mínima actividad enzimática que pudo distinguirse de dos desviaciones estándar del blanco, fue de 0,6 nkat/l. El coeficiente de variación in-

Tabla I. Hidrólisis inespecífica del sustrato. I) Absorbancia del sustrato disuelto en tampón frente a agua destilada, a distintos tiempos de incubación. II) Absorbancia del sustrato incubado a distintos tiempos de incubación con 400 μ l de orina con aprotinina, leído frente a agua destilada.

	Tiempo (min)						
	0	10	20	30	40	50	60
I	0,009	0,014	0,012	0,012	0,013	0,009	0,012
II	0,260	0,260	0,265	0,266	0,270	0,266	0,265

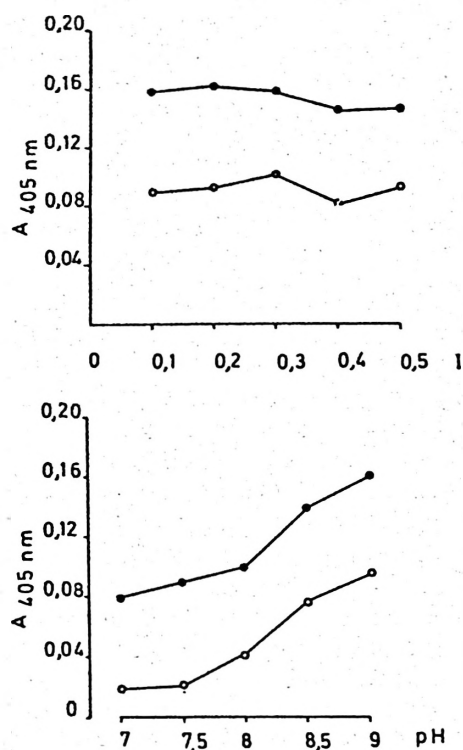


Fig. 3. Dependencia de la actividad amidolítica respecto a la fuerza iónica y el pH.
(—●—) calicreína glandular altamente purificada.
(—○—) orina.

traensayo fue del 4% (media $\pm$ DS de los controles: $11,4 \pm 0,5$ nkat/l; $n = 10$) y el coeficiente de variación interensayo fue del 10% (media $\pm$ DS de los controles: $15,2 \pm 1,5$ nkat/l; $n = 10$). La exactitud del método, medida por el porcentaje de recuperación, se expresa en la tabla II.

Tabla II. Porcentajes de recuperación (R) a distintas actividades de calicreína glandular altamente purificada (A_{CAL}).

A_{CAL} (nkat/l)	R (%)
40	103
30	110
20	107
15	106
10	100
2	102

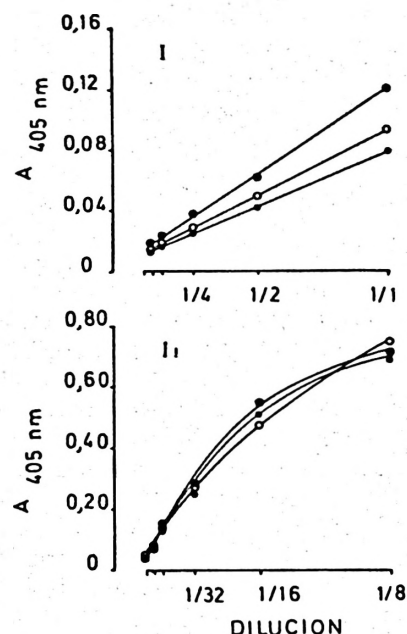


Fig. 4. Curvas de diluciones de orina humana (I) y de rata (II).

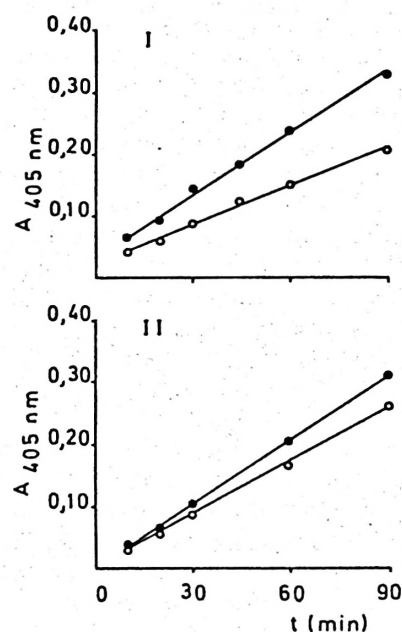


Fig. 5. Curvas de cinética de orina humana (I) y de rata (II).

Los valores de actividad calicreína urinaria que se observaron en el grupo presuntamente sano fueron de $0,14 \pm 0,08$ pkat/s (rango 0,05 - 0,27 pkat/s) en el hombre y de $0,49 \pm 0,11$ pkat/s (rango: 0,35 - 0,58 pkat/s) en la rata.

Discusión

Los ensayos que miden la actividad esterolítica de la calicreína sobre sustratos sintéticos son los más simples metodológicamente, pero carecen de especificidad ya que otras enzimas urinarias, como la uroquinasa, pueden hidrolizar también estos sustratos (13). Por otro lado, la reacción esterolítica es interferida fácilmente por activadores o inhibidores presentes en la orina. Los métodos de radioinmunoanálisis no presentan este inconveniente pero son métodos sofisticados que requieren laboratorios con capacidad para producir anticuerpos y, a menudo, tratamientos complejos de las muestras de orina antes de ser sometidas a radioinmunoanálisis (1). El presente estudio indica que el ensayo amidolítico empleando el S-2266 es específico de la actividad calicreína urinaria. El ensayo no valora la ruptura del sustrato por la uroquinasa, ya que esta enzima no es inhibida por la aprotinina (3) y los resultados muestran que no existe actividad amidolítica no inhibida por la aprotinina. El estudio de la sensibilidad de la actividad amidolítica urinaria a las condiciones físico-químicas del medio de incubación muestra que esta actividad es idéntica a la de la calicreína altamente purificada, lo que constituye una evidencia adicional a favor de que el ensayo no mide la actividad de ninguna enzima distinta a la calicreína. El buen porcentaje de recuperación obtenido al incubar calicreína altamente purificada con muestras de orina indica que la hidrólisis del sustrato no es activada, ni inhibida, por ningún compuesto presente en la orina.

La sensibilidad y precisión del método es similar a la obtenida con otros ensayos amidolíticos (2, 3) o esterolíticos (11, 14) y suficiente para detectar la actividad calicreína en orinas de hombre o de rata. Los valores de actividad calicreína obtenidos en orinas normales son similares a los de otros autores que usan ensayos amidolíticos y que se han demostrado bien correlacionados con los obtenidos por radioinmunoanálisis (3); son también sensiblemente inferiores a los obtenidos por ensayos esterolíticos (10) en los que la especificidad de la reacción colorimétrica está cuestionada.

Resumen

Se estudia la especificidad de un método para la determinación de la actividad calicreína en orina basado en la hidrólisis amidolítica del sustrato H-D-valil-leucil-arginina-*p*-nitroanilida. Los resultados obtenidos muestran una buena especificidad para la calicreína urinaria. No existe ninguna actividad amidolítica que no sea inhibida por la aprotinina. La actividad amidolítica urinaria muestra la misma dependencia que la calicreína altamente purificada, a los cambios de fuerza iónica y pH. La sensibilidad del método es de 0,6 nkat/l. El coeficiente de variación intraensayo es del 4% y el interensayo del 10%. El porcentaje de recuperación es del 100 al 110% lo que demuestra la ausencia de activadores o inhibidores de la actividad calicreína sobre este sustrato, en las muestras de orina. Los valores obtenidos en sujetos presuntamente sanos fueron de $0,14 \pm 0,08$ pkat/s (rango 0,05 - 0,27 pkat/s) en el hombre y de $0,49 \pm 0,11$ pkat/s (rango: 0,35 - 0,58 pkat/s) en la rata.

Bibliografía

1. ALHENC-GELAS, F., MARCHETTI, J., ALLEGRI, J., CORVOL, P. y MENARD, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 677, 477-488, 1981.
2. AMUNDSEN, E., PUTTER, J., FRIBERGER, P., KNOS, M., LARSBRATEN, M. y CLAESON, G.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 120A, 83-95, 1979.
3. BONNER, G., y MARIN-GREZ, M.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 19, 165-168, 1981.
4. CARRETERO, O. A., MIYAZAKI, S. y SCICLI, A. G.: *Hypertension*, 3, 18-22, 1981.

5. CARRETERO, O. A. y SCICLI, A. G.: *Am. J. Physiol.*, **238**, F247-F255, 1980.
6. CARRETERO, O. A. y SCICLI, A. G.: *Fed. Proc.*, **35**, 194-198, 1976.
7. CLAESON, G., FRIBERGER, P. KNOS, M. y EMICSON, E.: *Haemostasis*, **7**, 76-79, 1978.
8. COLMAN, R. W.: *N. Engl. J. Med.*, **291**, 509-515, 1974.
9. ERDOS, E. G.: *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1563-1569, 1976.
10. GLORIOSO, N., MADEDDU, P., DESSI-FULGHIERI, P., MELONI, F., TONOLO, G. C. y RAPELLI, A.: *IRCS Med. Sci.*, **10**, 331-332, 1982.
11. HITOMI, Y., NIMBLE, M. y FUJIL, S.: *Clin. Chim. Acta.*, **100**, 275-283, 1980.
12. ITO, R. y STATLAND, B. E.: *Clin. Chem.*, **27**, 586-593, 1981.
13. MANN, K., GORING, W., LIPP, W., KEIPERT, B. y KARL, H. J.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **18**, 395-401, 1980.
14. MARGOLIUS, H. S., HORWITZ, D., GELLER, R. G., ALEXANDER, R. W., GILL, J. R., PISANO, J. J. y KEISER, H. R.: *Circulation Res.*, **35**, 812-825, 1974.
15. MARGOLIUS, H. S., HORWITZ, D., y PISANO, J. J.: *Fed. Proc.*, **35**, 203-206, 1976.
16. MARIN-GREZ, M., COTTONE, P. y CARRETERO, O. A.: *Am. J. Physiol.*, **223**, 794-796, 1972.
17. MILLS, I. H. y WARD, P. E.: *J. Physiol.*, **246**, 695-707, 1975.
18. NUSTAD, K. y VAAJE, K.: *Br. J. Pharmacol.*, **53**, 229-234, 1975.
19. PISANO, J. J.: *Proteases and Biological Control*. Vol. 2. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor, 1975, p. 199-222.
20. RAPHAEL, S. S.: *Medical Laboratory Technology*. Vol. 1. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1976, p. 56-58.
21. SHIMAMOTO, K., MARGOLIUS, H. S., CHAO, J. y CROSWELL, A. R.: *J. Lab. Clin. Med.*, **94**, 172-179, 1979.
22. SPRAGG, J. y AUSTEN, K. F.: En «Immunopharmacology» (J. W. Hadden, R. G. Coffey y F. Spreafico, eds.) Plenum Publishing Corp., Nueva York, 1977, p. 125-143.
23. VERMA, P. S., LORENZ, P. E. y SANDER, G. E.: *Clin. Chem.*, **26**, 429-432, 1980.