

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE FARMACOLOGIA**

**EFFECTO DEL MOFETIL MICOFENOLATO SOBRE EL SISTEMA CALICREÍNA-  
CININAS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS  
DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATAS CON L-NAME.**

**Memoria de Título presentada como parte  
de los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO.**

**DINA DANIELA OJEDA PAREDES**

**VALDIVIA – CHILE**

**2003**

**PROFESOR PATROCINANTE** : Dr. Frédérick Ahumada M. \_\_\_\_\_

**PROFESOR COPATROCINANTE** : Dr. Leopoldo Ardiles G. \_\_\_\_\_

**PROFESOR COLABORADOR** : Dr. Marcos Moreira E. \_\_\_\_\_

**PROFESORES CALIFICADORES** : Dr. Ricardo Castillo D. \_\_\_\_\_

: Dr. Fernando Wittwer M. \_\_\_\_\_

**FECHA DE APROBACIÓN** : 13 de Agosto de 2003.

A mis padres: por su amor y apoyo incondicional,  
A Mauricio: por su confianza y entrega,  
A Vicente: por ser el motivo y el sol de mi vida.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS.....	34
AGRADECIMIENTOS.....	44

## **EFFECTO DEL MOFETIL MICOFENOLATO SOBRE EL SISTEMA CALICREINA-CININAS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE OXIDO NITRICO EN RATAS CON L-NAME.**

### **1. RESUMEN.**

El Sistema Calicreína- Cininas renal es un complejo enzimático albergado en el espacio tubulointersticial cuyos principales componentes son la enzima calicreína y su sustrato cininógeno para producir cininas que poseen una potente actividad vasodilatadora directa o a través de la liberación de óxido nítrico. El óxido nítrico (factor relajante endotelial) es un factor vasodilatador de cardinal importancia y su reducción se asocia al desarrollo de hipertensión y daño renal isquémico-hipertensivo el que puede involucrar estructural y/o funcionalmente al Sistema Calicreína- Cininas.

Este estudio pretende probar que la terapia con Mofetil micofenolato (MMF), agente con reconocidas propiedades protectoras del daño tubulointersticial renal, mejoraría el daño del Sistema Calicreína- Cininas generado por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico inducida con L-NAME, logrando además un efecto sobre la presión arterial.

Se utilizaron 42 ratas machos cepa Sprague Dawley, con pesos promedio de 300 gramos, las cuales bebieron agua con NaCl al 1% por 4 semanas previas y durante las 4 semanas que duró el estudio. Se distribuyeron al azar en 3 series: la serie HS (control); serie HSLN (tratada con L-NAME) y serie HSLN+M (tratada con L-NAME y MMF). L-NAME fue administrado a través del agua de bebida en dosis de 50mg /Kg. y el MMF a través de sonda bucoesofágica en dosis de 30 mg/ Kg. La presión arterial sistólica fue medida basal y semanalmente mediante sonda de ultrasonido Doppler. Igualmente se obtuvieron muestras de orina semanales para la determinación de calicreína urinaria a través del método amidásico.

Ambas series tratadas con L-NAME mostraron un aumento significativo de la presión arterial sistólica a la semana de tratamiento y durante todo el estudio. Para la actividad de calicreína urinaria se observó en las dos últimas semanas un aumento significativo en la serie tratada con MMF comparado con las otras series.

Del análisis de los resultados es posible concluir que la terapia con MMF puede ser capaz de proteger del daño renal inducido por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico manifestado en un aumento de la actividad enzimática de calicreína, una enzima de origen tubulointersticial renal exclusivo. La imposibilidad de lograr un efecto sobre la presión arterial es explicable porque la carencia de la síntesis de ON, importante mediador del Sistema Calicreína-Cininas no fue modificada con esta terapia.

Palabras claves: **Sistema Calicreína- Cininas**, calicreína urinaria, óxido nítrico, L-NAME, Mofetil micofenolato (MMF), presión arterial.

## **EFFECT OF MYCOPHENOLATE MOFETIL ON KALLIKREIN-KININ SYSTEM IN THE RAT EXPERIMENTAL MODEL OF NITRIC INHIBITION WITH L-NAME.**

### **2. SUMMARY.**

The renal Kallikrein-Kinin System (KKS) is a multienzymatic complex located in the renal tubulointerstitial space, with their principal components the enzyme kallikrein and its substrate kininogen co-located to produce kinins with intense (direct or nitric oxide mediated) vasodilator activity. Nitric oxide (endothelial relaxant factor) is an important vasodilator and its reduction is associated with the development of hypertension and ischemic-hypertensive renal damage may that involve KKS structures and its activity.

This study was designed to evaluate the hypothesis that a therapy with Mycophenolate mofetil (MMF), a recognized unspecific tubulointerstitial protector, might improve the damage of the KKS induced by the blockage of the synthesis of nitric oxide by L-NAME, thus obtaining an effect of blood pressure.

Forty two male Sprague-Dawley rats with 300 grams body weight were hydrated with hypersodic water (1% NaCl) for the 4 previous weeks and during the 4 week of the experiment, and they were randomly separated in 3 groups: HS (controls), HSLN (L-NAME treated) and HSLN+M (L-NAME and MMF treated). L-NAME was administrated daily in tap water in a dose of 50 mg/Kg and MMF by gavage in a dose of 30 mg/Kg, both during 4 weeks. Systolic blood pressure measured by Doppler plethysmography and urine collections were performed basal and weekly. Enzymatic urinary activity of kallikrein was estimated by amidasic method. Both groups treated with L-NAME showed elevation of blood pressure since the first week and all along the experiment. On the other hand, a significant increase in urinary activity of kallikrein was observed in the MMF treated group.

These results suggest that MMF therapy may protect from renal damage induced by nitric oxide inhibition, as evidenced by the increase in urinary activity of kallikrein, an enzyme produced exclusively in the renal tubulointerstitium. The effect on blood pressure may be explained by the fact that the decrease in NO lack of synthesis is not modified by the therapy.

**Key words.** **Kallikrein-Kinin System**, urinary kallikrein, nitric oxide, L-NAME, Mycophenolate mofetil, blood pressure.

### 3. INTRODUCCIÓN.

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra la pared arterial y se expresa a través de las diferentes técnicas de medición como presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Con frecuencia se señala que la presión arterial es igual al producto del gasto cardíaco por la resistencia periférica total y ambos la controlan (Ganong, 1998; Guyton, 1994). En cierto sentido este planteamiento es correcto, sin embargo, ninguno de ellos la controla de manera absoluta porque a su vez estos dependen de muchos otros factores fisiológicos como la actividad nerviosa central y periférica autónoma, la reserva corporal de sodio y líquido extracelular, el sistema renina-angiotensina y hormonas como las prostaglandinas, cininas, factor natriurético y otros péptidos. Se sabe también que el endotelio tiene una importante participación en la regulación de vasoconstricción y vasodilatación arterial (Alcasena y col, 1999).

En condiciones normales existe un equilibrio entre los sistemas que regulan la presión arterial normal y se encuentran tan integrados que si por alguna razón la presión se incrementa, inmediatamente aparece un mecanismo para corregirla. Cuando la presión se mantiene alta es porque existe una disfunción o hay una falla en la interacción de los mecanismos vasculares, cardiogénicos, renales o endocrinos (Cabrera, 1997).

Existe un sistema integrado de múltiples facetas para la regulación de la presión arterial y son las siguientes (Guyton, 1997):

3.1) Los mecanismos de acción rápida en segundos o minutos: Casi en su totalidad corresponden a respuestas nerviosas y son el sistema de retroacción de los barorreceptores, el mecanismo isquémico del SNC y el mecanismo quimiorreceptor. Estos mecanismos ante un alza aguda de la presión se combinan para: a) causar una dilatación de las venas y disminuir la carga de sangre al corazón; b) causar una disminución de la frecuencia y contractibilidad cardíaca, dándole al corazón una menor capacidad de bombeo, y c) causar una dilatación de las arteriolas para facilitar que la sangre salga de las arterias. Estos mecanismos actúan casi instantáneamente y si la presión arterial cae bruscamente reaccionan en la dirección opuesta devolviendo la presión al rango normal.

3.2) Los mecanismos de tipo intermedio: Estos corresponden al sistema vasoconstrictor de la renina-angiotensina, la relajación de estrés de la vascularización y el desplazamiento de líquido a través de las paredes de los capilares dentro y fuera de la circulación para reajustar el volumen sanguíneo según necesidad. Estos mecanismos se activan entre 30 minutos y varias horas, durando su efecto largos períodos de días en caso necesario.

3.3) Los mecanismos de control a largo plazo: Estos corresponden al mecanismo renal de regulación del volumen de los líquidos corporales con interacciones entre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema nervioso y varios otros factores que confieren capacidades de control especiales para finalidades especiales. Este mecanismo ha demostrado que necesita unas pocas horas para mostrar una respuesta significativa.

El sistema cardiovascular posee gran importancia en el control de la presión arterial y los factores que conforman este sistema de regulación se clasifican según McPhee y col., (2000) en:

#### Factores Vasoconstrictores:

Factores locales:

- disminución local de la temperatura.
- autorregulación
- serotonina liberada localmente por las plaquetas.

Factores producidos por las células endoteliales:

- endotelina - 1

Hormonas:

- noradrenalina
- adrenalina (excepto músculo esquelético e hígado)
- arginina vasopresina
- angiotensina II
- inhibidor circulante de la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa
- neuropéptido Y

Control neural:

- aumento de la carga de los nervios vasomotores noradrenérgicos.

#### Factores Vasodilatadores:

Factores locales:

- aumento de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{K}^+$ , adenosina, lactato
- disminución del  $\text{O}_2$
- aumento de la temperatura local
- productos de células endoteliales
- **óxido nítrico (ON)**

### Hormonas:

- péptido intestinal vasoactivo
- CGRP $\alpha$  (péptido relacionado con el gen de la calcitonina en su variante  $\alpha$ )
- sustancia P
- histamina
- **cininas**
- péptido natriurético auricular (ANP)
- adrenalina en el músculo esquelético y en el hígado

### Control nervioso:

- activación de fibras colinérgicas dilatadoras hacia el músculo esquelético.
- disminución de descarga de los nervios vasomotores noradrenérgicos.

Dentro de los factores vasodilatadores se encuentran las cininas que integran un sistema denominado Sistema Calicreína- Cininas (SCC). Existen dos SCC uno *plasmático* y otro *glandular* que difieren tanto en sus propiedades físico-químicas como en el tipo de cininas que liberan, así como también en la susceptibilidad a su inhibidor natural (Elghozi, 1988 a). Las calicreínas glandulares (producidas en órganos como páncreas, riñón y glándulas salivales) presentan una semejanza química e inmunológica, diferenciándose de la calicreína plasmática porque ésta última ofrece una estructura muy diversa y un tamaño molecular muy superior, encontrándose principalmente en forma de precursor inactivo (precalicreína plasmática) y actúa sobre un sustrato que corresponde al cininógeno de alto peso molecular. Además está involucrada en el proceso de coagulación sanguínea, inflamación, conversión de plasminógeno en plasmina, etc. El tipo de cininas que libera la calicreína plasmática es la bradisinina y la glandular libera calidina.

Se conoce al SCC renal como un complejo enzimático albergado en el espacio tubulointersticial, cuyos principales componentes son la calicreína, el sustrato cininógeno, sustancias efectoras o cininas (lisil bradisinina y bradisinina), enzimas metabolizadoras (varias cininasas, entre ellas la Cininasa II o enzima convertidora de angiotensina) y un sin-número aún no determinado de activadores e inhibidores de calicreína y cininasas (Vio y col., 1992). En el SCC renal la síntesis ocurre a partir de la pre-calicreína, la cual se activa y forma la calicreína que actuando sobre el cininógeno de bajo peso molecular (CBPM) lo convierte en calidina y sobre el de alto peso molecular (CAPM) en bradisinina, además la acción de aminopeptidasas sobre la calidina la convierte también en bradisinina. Ambos, la calidina y la bradisinina son inactivados por las cininasas I y II, en péptidos inactivos (Elghozi, 1988 b).

La producción de calicreína renal se localiza en el túbulo de conexión, ubicable en la corteza renal, y el cininógeno es producido en células de los túbulos colectores renales, distalmente en la nefrona (Figueroa y col., 1988). Estudios en riñón de perro y rata indican que >90% de la enzima calicreína se ubica en la corteza renal y que la localización primaria es en los túbulos (Bhoola y col., 1992). La vecindad de la localización de ambos componentes hace

posible la acción de las cininas a nivel luminal del túbulo colector, como también hacia el espacio peritubular, afectando de estas dos formas la función renal (Vio y col., 1992) (Anexo N° 1).

Las cininas inducen (Croxato, 1981):

1. un intenso efecto vasodilatador que aumenta en forma apreciable el flujo sanguíneo renal;
2. un incremento en la excreción de sodio (natriuresis), y,
3. un fuerte estímulo de la síntesis local de prostaglandinas).

Las cininas en el plasma son potentes vasodilatadoras, aumentan la permeabilidad capilar, aumentan la liberación de histamina por los mastocitos, disminuyen la resistencia periférica total y la presión arterial por la dilatación de las arteriolas sistémicas (Elghozi, 1988a).

Numerosos estudios han encontrado que la bradicinina puede causar relajación del endotelio de los vasos sanguíneos, cuyo efecto puede ser reducido por inhibidores de la síntesis de ON. Por esto se ha propuesto que las cininas causan la vasodilatación principalmente a través de la liberación de ON de células endoteliales (Zhang y col., 1997).

Existen evidencias de la participación del SCC en la patogénesis de la hipertensión arterial esencial en humanos caracterizándose por presentar bajos niveles de renina, normales de aldosterona y una reducción en la excreción de caliceína urinaria (Balsano, 1991). La eliminación de caliceína está reducida tanto en la hipertensión arterial primaria como secundaria (Alcasena y col., 1999). Existen opiniones que la reducción de la actividad del sistema Caliceína-Cinina renal puede ser un marcador de una agresividad de la hipertensión arterial esencial (Campese, 1994).

En 1934 fue reportado que la excreción urinaria de caliceína es significativamente reducida en individuos hipertensos. Estudios epidemiológicos extensivos han documentado una relación inversa entre los niveles urinarios de caliceína y la elevación de la presión sanguínea en pacientes con hipertensión esencial. Igualmente, ha sido demostrado que existe una gran influencia de la raza y de la ingesta de sodio en la excreción de caliceína en pacientes hipertensos (Chao y col., 1997).

Cabe señalar que en muchos modelos experimentales de hipertensión, como es el caso del modelo de hipertensión renovascular Goldblatt, se ha demostrado la reducción de caliceína tisular en orina. En ratas Dahl sal sensibles se muestran bajos niveles de caliceína en orina comparados con ratas sal resistentes (Bhoola y col., 1992).

Existen varios métodos para medir caliceína los que se diferencian considerablemente en especificidad y sensibilidad. Para la cuantificación en orina o saliva, se recomiendan los análisis de actividad usando los substratos sintéticos o los que miden la cantidad a través de radioinmunoensayos (RIA) fotométricos. Las muestras del jugo pancreático y duodenal tienen que ser analizadas con el RIA o el análisis biológico después de la activación y adición de

inhibidores de tripsina. Hasta el momento, las muestras del plasma se pueden analizar solamente con el RIA (Colowick y col., 1981).

Además de las cininas, el óxido nítrico (ON) juega un rol fundamental en la regulación de la presión arterial. Su síntesis se produce a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS) y actúa en las células musculares vecinas produciendo relajación. Fisiológicamente el ON es el principal regulador del tono vascular y la presencia de sustancias como acetilcolina, bradicinina y la sustancia P incrementan su producción (Alcasena y col., 1999; Tafur, 1998). El ON sintetizado, se difunde a las células musculares lisas y, en interacción con la guanilato-ciclasa soluble, incrementa los niveles de GMPc produciendo la fosforilación proteica que lleva a la relajación de las células musculares lisas. De manera tal que la inhibición de la síntesis de ON producirá vasoconstricción y por lo tanto, incremento de la presión arterial (Tafur, 1998).

El ON desempeña un papel muy importante en la regulación de la función renal. Su importancia en la hemodinámica renal ha sido demostrada en situación basal, en respuesta a vasodilatadores endotelio- dependientes (bradicinina y acetilcolina), la disminución de ON provoca una vasoconstricción de las arteriolas aferente y eferente. El ON tiene importancia en la regulación de la reabsorción tubular de sodio y agua, disminuyendo la reabsorción de sodio en varios segmentos tubulares, sin embargo, un efecto directo sólo parece tener lugar en los túbulos colectores medulares, donde se encuentra la mayor actividad de la enzima ONS. El ON está implicado en la regulación de la eliminación de sodio durante las elevaciones de la presión arterial y del volumen extracelular. El descenso del ON aumentaría la secreción de renina y angiotensina II intrarrenal (Tresguerres y col., 1999).

El ON antagoniza la vasoconstricción fisiológica de los mediadores vasoconstrictores de la pared vascular (endotelina, tromboxano A<sub>2</sub>, angiotensina II, prostaglandina H<sub>2</sub> y anión superóxido) (Steven y col., 1997; CYTED, 1998; Tafur, 1998). Además de ser un vasodilatador, es también un potente inhibidor de la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular. También desempeña alguna función en la inflamación aguda y crónica, ya que induce permeabilidad vascular y edema (Katzung, 1998).

Cuando hay una disfunción en el endotelio, lo primero que sucede es una pérdida de la capacidad de producción de ON y obviamente que la consecuencia será el predominio de sustancias vasoconstrictoras. Investigaciones realizadas tanto en animales como en humanos, han encontrado que la administración de inhibidores de la enzima ONS produce vasoconstricción y una elevación de la presión arterial sistémica (Cárcamo, 2000). La inhibición crónica del ONS produce un bloqueo de ON, además reduce la tasa de filtración glomerular, disminuye la excreción de sodio urinario y produce un incremento de la actividad de renina plasmática (Steven y col., 1997) lo que produce una hipertensión arterial progresiva asociada a proteinuria y a un severo daño vascular, intersticial y glomerular en riñón<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> <http://www.gbsystems.com/paper/general/c07297.htm>

Observaciones por Chen y Sanders (1991) indican que el incremento de la síntesis de ON puede constituir un mecanismo adaptativo esencial para la excreción de sodio cuando la ingesta de este ion está muy aumentada. Cuando esta adaptación es prevenida por el bloqueo de síntesis del ON, hipertensión e injuria renal serían posibles consecuencias de la disminución en la excreción de sodio. Las extensas anomalías en la estructura renal que ocurriría en estas circunstancias, promoverían a agravar la retención de sodio (Fujihara y col., 1994).

La inhibición del ON intensifica la adhesión y migración leucocitaria, la expresión de moléculas de adhesión y colágeno tipo I, en consecuencia estimula la proliferación celular e infiltración macrófaga, por lo tanto la inhibición crónica del ON puede favorecer al desarrollo de la inflamación renal (Fujihara y col., 2001). El bloqueo del ON entonces está asociado con el desarrollo de injuria renal focal, caracterizada por glomerulosclerosis, fibrosis intersticial, lesión arterial y arteriolar e infiltración celular en áreas tubulointersticiales del riñón (Quiroz y col., 2001).

Previas observaciones han dejado en evidencia que el tratamiento crónico con N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)\*, un análogo de L-arginina, está asociado al desarrollo de glomerulosclerosis de modesta extensión, proceso que es exacerbado por la administración concomitante de una dieta alta en sal (Fujihara y col., 1994). Existen revisiones sobre el papel que tiene la ingesta de sal en enfermedades del riñón, particularmente en lo referente a la hemodinámica renal, a la excreción renal de proteínas, cambios morfológicos renales y progresión de la falla renal crónica. Estudios experimentales han demostrado un efecto directo del alto consumo de sal sobre el riñón, independiente de su capacidad de aumentar la presión arterial, induciendo la hipertrofia, fibrosis y la disminución de sitios aniónicos de la membrana glomerular (Boero y col., 2002).

Estudios de Salas y col., (1999) han demostrado que ratas tratadas con inhibidores del ON presentan un marcado incremento en el número de anomalías glomerulares, observándose infiltración macrófaga que ha sido asociado con progresión de injuria glomerular y tubulointersticial. Estos autores, utilizando un modelo de inhibición de la síntesis del ON en ratas preñadas, observaron elevada presión arterial, reducción de la actividad plasmática de renina y reducción significativa de la actividad de calicreína urinaria y calicreína tisular asociada con anomalías morfológicas renales.

Recientes comunicaciones han demostrado que, la infiltración linfocítica intersticial fue fuertemente atenuada en ratas a las que se les administró una dieta alta en sal y L-NAME y que fueron tratadas con Mofetil micofenolato (MMF)\*, agente con reconocidas propiedades protectoras del daño tubulointersticial. Éste último puede haber limitado la inflamación por la interrupción de la interacción entre linfocitos y macrófagos reduciendo así la infiltración macrófaga en el intersticio renal. En resumen se observó que el tratamiento con MMF atenúa la injuria renal en ratas sometidas a la inhibición crónica del ON por un mecanismo no

---

\* L-NAME, Cat # N 5751, Sigma Chemical Co.

\* Cellcept, Laboratorios Roche.

hemodinámico, asociado con una acción anti-inflamatoria. La inflamación renal puede ser crucial para el desarrollo de la injuria renal en este modelo (Fujihara y col., 2001).

El MMF es un agente inmunosupresor específico, clasificado dentro de los agentes citotóxicos y es el profármaco 2 morfolino etil éster del ácido micofenólico. Este profármaco debe ser hidrolizado por las estereasas hepáticas para liberar el producto activo, el ácido micofenólico, producto natural obtenido por fermentación de varias especies de *Penicillium* y aislado en 1986 del *Penicillium brevicompactum* (Flórez y col., 1997).

El MMF es un nuevo agente inmunosupresivo el cual bloquea la síntesis de novo de los ribonucleicos de guanina, que es el camino esencial para la síntesis de purina de linfocitos T y B, bloqueando la división celular específica para linfocitos con un pequeño efecto en la división celular de otro tipo de células. Suprime la proliferación de linfocitos y la formación de anticuerpos por las células B. También puede inhibir el reclutamiento de linfocitos en sitios de inflamación al agotar los nucleótidos de guanina de estas células al inhibir la glucosilación de sus glucoproteínas que intervienen en la adherencia a células endoteliales. Entonces la eficacia inmunosupresora del ácido micofenólico se basa en la inhibición de la proliferación de linfocitos T y B activados (Goodman y Gilman, 1996).

El MMF se absorbe rápidamente por la vía oral y es hidrolizado para originar el ácido micofenólico libre. Tras su absorción es rápidamente hidrolizado, no detectándose concentraciones de MMF en el plasma. En promedio el 90% del compuesto administrado se elimina en orina en la forma de glucorónido del ácido micofenólico (Flórez y col., 1997; Goodman y Gilman, 1996). Ha sido investigado como antineoplásico, antibacteriano, antifúngico y antivírico y recientemente se ha explorado su potencial como inmunosupresor en el trasplante de órganos (Flórez y col., 1997).

En general el MMF se tolera bien. Los efectos adversos más frecuentes son los gastrointestinales como dispepsia, náuseas, vómitos, diarrea o estreñimiento que suelen desaparecer reduciendo la dosis; esta droga no ha sido descrita como particularmente nefrotóxica (Flórez y col., 1997).

El MMF ha sido usado primariamente en los recientes años como inmunosupresor en el tratamiento de procesos inmunomediados tales como rechazo a trasplante. Recientes evidencias clínicas experimentales sugieren que la terapia con MMF retarda la progresión de nefropatías crónicas de naturaleza no inmunológicas o en combinación con supresores del sistema renina-angiotensina. El mecanismo básico para mediar este efecto benéfico es una inhibición selectiva de la proliferación linfocítica (Fujihara y col., 2001).

Este estudio fue orientado a analizar la funcionalidad del Sistema Calicreína-Cininas (SCC) en un modelo de inhibición de la síntesis de óxido nítrico (ON) por L-NAME. Para esto se midió la actividad de calicreína urinaria, enzima fundamental del sistema. En este modelo se produce un daño tubulointersticial, daño que incluye al SCC, el que podría ser potencialmente corregible mediante el uso de Mofetil micofenolato (MMF) ya que éste, al proteger al riñón de la inflamación, podría mejorar la actividad de este sistema vasodilatador.

El MMF fue seleccionado por observaciones previas que muestran que puede reducir la injuria renal en modelos animales en los que ocurre acumulación de macrófagos y células T, tal como en el modelo de riñón remanente entre otros (Quiroz y col., 2001).

Con lo anteriormente expuesto se postula como hipótesis de trabajo que la administración de Mofetil micofenolato favorece la recuperación del Sistema Calicreína-Cininas en el modelo de inhibición de la síntesis del óxido nítrico con L-NAME reflejado en un aumento de la actividad enzimática de calicreína en orina, además de lograr un efecto sobre la presión arterial.

Los objetivos de este trabajo son evaluar la variación de la actividad del Sistema Calicreína-Cinina renal durante el estudio, demostrar la reducción de la actividad de calicreína urinaria en este modelo y evaluar el efecto potencialmente protector de la administración de Mofetil micofenolato sobre la actividad de calicreína urinaria y sobre la presión arterial en el modelo de inhibición de la síntesis del óxido nítrico con L-NAME.

## 4. MATERIAL Y MÉTODO.

### 4.1 MATERIAL.

#### 4.1.1 Material biológico:

Se utilizaron como animales de experimentación 42 ratas blancas, machos, cepa Sprague Dawley, con un peso corporal inicial de 300 g aproximadamente, procedentes del bioterio de animales de experimentación del Instituto de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile (Anexo N° 2).

#### 4.1.2 Material farmacológico:

- N-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME).
- Mofetil micofenolato (Cell Cept®) (Anexo N° 3)
- Éter.
- Agua bidestilada.
- Buffer Amidasa 0.2 TRIS- HCl (pH 8,2; 0,2M)
- Inhibidor enzimático SBTI-EDTA
- Sustrato dVal-Leu-Arg pNitroamilide (0,1 mM)
- Ácido acético (50% v/v)

#### 4.1.3 Material para medir presión arterial:

- Equipo ultrasonido Doppler<sup>2</sup>
- Esfingomanómetro y manguito inflable.
- Gel para ultrasonido.
- Cubículo de inmovilización.
- Fuentes de calor.

#### 4.1.4 Materiales para determinación de calicreína:

- Espectrofotómetro
- Cubetas para reacción.
- Horno para incubación.
- Micropipetas.
- Centrífuga refrigerada.

#### 4.1.5 Materiales para recolección de orina:

- Cajas metabólicas.
- Frascos recolectores.
- Papel filtro.

---

<sup>2</sup> Ultrasonic Doppler Detector Model 811-B

#### 4.1.6 Otros materiales:

- Balanza Söehnle.
- Jeringas.
- Sondas.
- Tubos Eppendorf.
- Sal.

## 4.2 MÉTODOS.

### 4.2.1 Grupos experimentales.

Se constituyeron 3 series experimentales, con 14 individuos cada una, asignados al azar.

**Serie HS:** (Serie control, ratas sin bloqueo del óxido nítrico). Recibieron agua bidestilada como placebo vía sonda bucoesofágica en el mismo volumen del vehículo de dilución del MMF, es decir, 0,5 mL por individuo por 4 semanas.

**Serie HSLN:** (Serie L-NAME). El L-NAME fue administrado en el agua de bebida en concentración de 1mM (269 mg /L) obteniendo una dosis aproximada de 50 mg/Kg./día por 4 semanas. Además se le administró vía sonda bucoesofágica agua bidestilada en un volumen de 0,5 mL por individuo por 4 semanas, mismo volumen del vehículo de dilución del MMF.

**Serie HSLN+M:** (Serie L-NAME+MMF). El MMF fue administrado vía sonda bucoesofágica en dosis de 30 mg/Kg./día en volumen de 0,5 mL por individuo por 4 semanas. Además se le administró diariamente en el agua de bebida L-NAME en la misma dosis que para la serie HSLN y por el mismo tiempo.

Los animales se mantuvieron en el bioterio en jaulas colectivas con 4 ó 5 ratas cada una, con acceso libre al agua y alimento, manteniendo el ciclo circadiano y con la menor perturbación posible.

Las ratas que ingresaron a las cajas metabólicas no fueron alimentadas a fin de disminuir la contaminación por deposiciones.

Se les excluyó la dosis de MMF o vehículo correspondiente a ese día. Las ratas que ingresaron a las cajas metabólicas la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semanas fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia.

#### 4.2.1.1 Consumo de agua hiperosmótica al 1%

Todas las ratas fueron sometidas a la ingesta de agua de bebida con 1% de NaCl, 4 semanas previas al inicio del experimento y durante las 4 semanas que duró éste. El agua de bebida se renovó diariamente agregando L-NAME según correspondía.

#### 4.2.2 **Peso corporal.**

El pesaje de las ratas se realizó cada vez que se inició el trabajo con una de ellas, para esto se utilizó una balanza Söehnle, con un rango de discriminación de 0,1 g. El peso se expresó en gramos.

#### 4.2.3 **Inhibición de la síntesis de óxido nítrico.**

Para producir la inhibición de la síntesis de óxido nítrico se administró a las series, HSLN (L-NAME) y HSLN+M (L-NAME + MMF), N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) en el agua de bebida a una concentración de 1 mM lo que permitió obtener una dosis diaria aproximada de 50 mg/Kg. (Pereira y col., 2001) durante las 4 semanas que duró el experimento.

#### 4.2.4 **Registros de Presión Arterial (Anexo N° 4).**

La presión arterial sistólica fue medida, en ratas concientes, en la cola a través de un procedimiento no invasivo, el cual utiliza un esfigmomanómetro y un equipo de ultrasonido Doppler, que permite medir la velocidad de la corriente sanguínea a través de señales que envía por un cristal ubicado en la punta del transductor. La frecuencia de la señal se modifica según la velocidad de la sangre, en los casos en que es más alto el tono del sonido es mayor la velocidad del flujo de la sangre que se acerca o aleja el transductor, y este cambio en la frecuencia se convierte en una señal audible y amplificadora (Gallardo, 2001).

La medición y registro de la presión arterial sistólica se realizó en todas las ratas de cada serie el día 1 y las semanas 1, 2, 3 y 4 del experimento.

La toma de presión se hizo en un ambiente templado. Además las ratas fueron puestas en una superficie temperada y la cola se comprimió intermitentemente previo a la medición con el fin de producir una adecuada vasodilatación por calor e hipoxia. Se midió 5 veces la presión en cada rata obteniéndose un promedio, el que fue registrado como presión arterial sistólica.

#### 4.2.5 **Evaluación del daño del Sistema Calicreína-Cininas (SCC).**

Para evaluar al SCC se realizó la determinación de la actividad enzimática de calicreína urinaria.

##### 4.2.5.1 Obtención de muestras de orina (Anexo N° 5).

Después de registrar la presión arterial sistólica, las ratas, previamente seleccionadas al azar, ingresaron a cajas metabólicas individuales las semanas 1, 2, 3 y 4 del experimento en número de 7 ratas por serie, para la obtención de muestras de orina, manteniéndose por un tiempo de 24 horas, período durante el cual sólo recibieron ingesta de agua hipersódica al 1% y L-NAME según correspondía. La orina se recogió en contenedores identificados, con embudos provistos de filtro para evitar la contaminación por deposiciones. Luego de transcurrido el tiempo de recolección se procedió a medir el volumen de orina de cada rata y las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Nefrología del Hospital Regional de Valdivia.

Cada muestra de orina fue medida en su volumen y dividida en alícuotas en tubos Eppendorf y luego congeladas para el posterior análisis.

#### 4.2.5.2 Medición de la actividad enzimática de calicreína urinaria (Anexo N° 6).

Las muestras antes de ser analizadas se centrifugaron a 1200 RPM por 30 minutos a 2 °C para depurar sedimentos que pudieran interferir con la reacción colorimétrica. Para la medición de la actividad enzimática de calicreína urinaria se utilizó el método enzimático amidásico que utiliza un sustrato sintético que corresponde al dVal-Leu-Arg pNitroamilide (Colowick y col., 1981), el que, en presencia de la enzima contenida en la muestra de orina, genera un producto cuya concentración es expresión de la actividad enzimática de la muestra y que es medible colorimétricamente en un espectrofotómetro a 405 nm.

#### 4.2.6 **Terapia protectora al Sistema Calicreína-Cininas renal con Mofetil micofenolato.**

Como manera de proteger al tejido tubulointersticial renal y al SCC se le administró a la serie HSLN+M, además de L-NAME un agente inmunosupresor denominado **Mofetil micofenolato (MMF)** por vía oral a través de una sonda bucoesofágica, para lo cual se empleó una *suspensión* en agua bidestilada para administrar una dosis diaria de 30mg/Kg. (en volumen de 0,5 mL por dosis para cada rata). Para establecer el control del uso de MMF, las ratas de las series HS (Control) y HSLN (L-NAME), recibieron igual volumen de agua bidestilada por sonda bucoesofágica.

### 4.3 **PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO.**

Los datos obtenidos en este estudio se expresaron como medias aritméticas y su error típico. Se utilizó como nivel de significancia 0,05; siendo significativo un  $p \leq 0,05$  y como no significativo un  $p > 0,05$ . Además se realizaron pruebas inferenciales intra e intergrupos, paramétricas y no paramétricas. La metodología estadística aplicada en el análisis de los valores obtenidos fue la siguiente:

- Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, utilizada con el fin de comprobar la normalidad de los datos (Sokal y Rohlf, 1981).
- Prueba de homocedasticidad de Bartlett aplicada con el fin de comprobar que las varianzas entre las series fueran homogéneas (Sokal y Rohlf, 1981).
- Prueba de t de Student de datos no pareados y Prueba de Mann Withney, usada para evaluar si dos grupos difieren entre sí de manera significativa (Siegel, 1996). En este trabajo se utilizó al hacer comparaciones interseries.
- Corrección de Welch, aplicada en aquellos casos en que en la prueba t de Student de datos no pareados no cumplía con los requisitos de homocedasticidad de las varianzas.

- Análisis de varianza paramétrico (Andeva) de una vía, cuyo objetivo fue comprobar promedios de tres o más grupos de datos (Zar, 1999; Hernández y col., 1996). En este trabajo se aplicó en las comparaciones intragrupo.
- Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usado en los casos en que el Andeva paramétrico resultó significativo (Zar, 1999).
- Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, que fue utilizado en casos de no cumplirse los requisitos de normalidad y/o homocedasticidad de los datos (Siegel, 1996).
- Prueba de comparaciones múltiples no paramétrico de Dunn, esta prueba fue aplicada en los casos en que la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativa (Rosner, 2000).

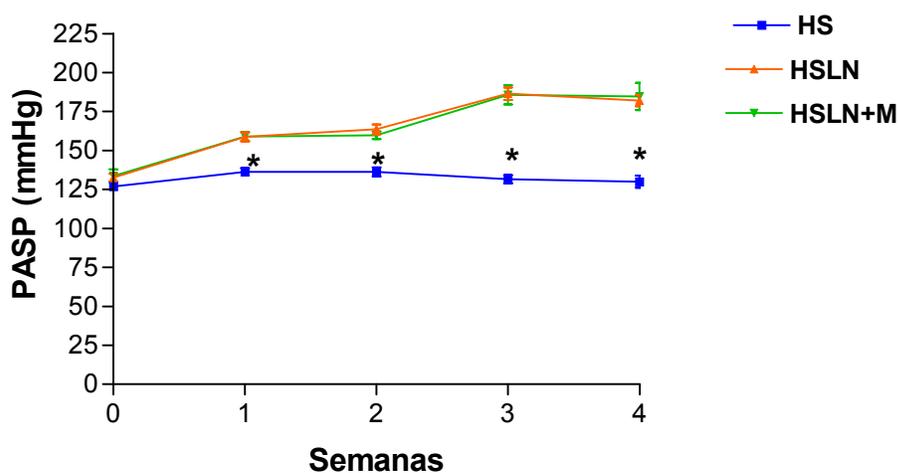
Para el análisis de la información obtenida se utilizó el programa computacional de análisis Prism de Graph Pad (versión 2.0).

## 5. RESULTADOS.

### 5.1 PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA.

**5.1.1. Análisis interserie.** Se comparó la presión arterial sistólica promedio (PASP) de cada serie en las diferentes etapas del experimento.

Se observaron diferencias ( $p \leq 0,05$ ) entre la serie control y las series tratadas con L-NAME con o sin MMF, las que presentaron una elevación de la presión arterial desde la primera semana, aumento que se mantuvo durante todo el experimento (Gráfico N° 1; Anex0 N° 7).

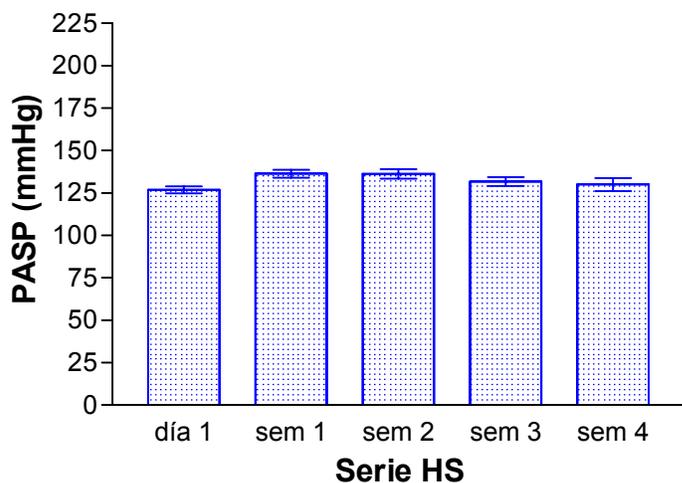


\* indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

**Gráfico N° 1.** Presión arterial sistólica promedio (PASP) en ratas control (HS) y tratadas con L-NAME (HSLN) y L-NAME más MMF (HSLN+M) durante 4 semanas.

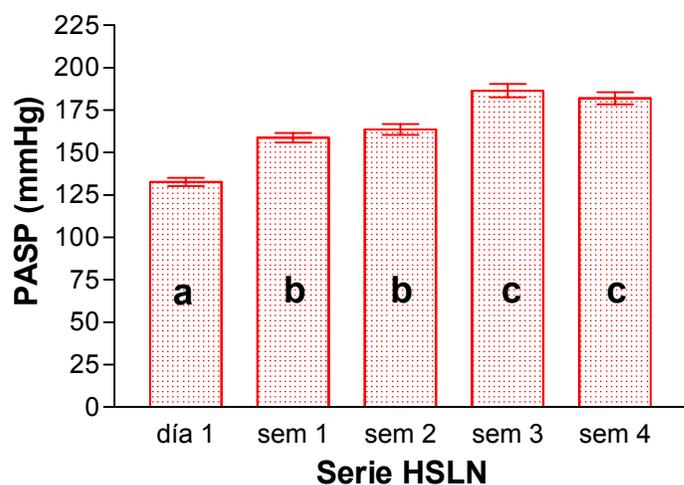
**5.1.2. Análisis intraserie.** Se comparó la presión arterial sistólica promedio (PASP), considerando todo el período experimental dentro de cada serie en estudio.

La PASP en la Serie HS se mantuvo entre los 126,9 y los 136,4 mmHg no presentando diferencias ( $p > 0,05$ ) durante el experimento (Gráfico N° 2; Anexo N° 7).



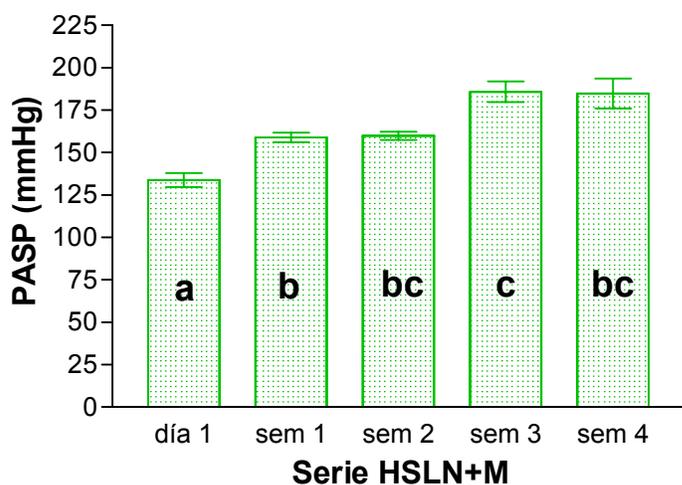
**Gráfico N° 2.** Presión arterial sistólica promedio  $\pm$  EE de 14 ratas de la serie control (HS) obtenidas semanalmente durante un período experimental de 4 semanas ( $p > 0,05$ ).

La Serie HSLN evidenció una elevación de la presión arterial a partir de la primera semana de tratamiento con L-NAME, aumento que se mantuvo durante todo el estudio, observándose diferencias ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al día 1. Además se observó diferencia ( $p \leq 0,05$ ) entre la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> semana con respecto a la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana del experimento (Gráfico N° 3; Anexo N° 7).



**Gráfico N° 3.** Presión arterial sistólica promedio (PASP), en ratas conscientes, durante todo el período experimental expresado en mmHg con su error estándar (EE), para la serie HSLN. Letras distintas indican diferencias entre períodos ( $p \leq 0,05$ ).

Lo observado en la Serie HSLN+M durante todo el período es similar a lo ocurrido en la serie HSLN ya que la presión arterial se mostró elevada a la primera semana del estudio y se mantuvo así durante todo el experimento, observándose diferencias ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al día 1. Además se observó diferencias entre la 1ª y 3ª semana (Gráfico N° 4; Anexo N° 7).

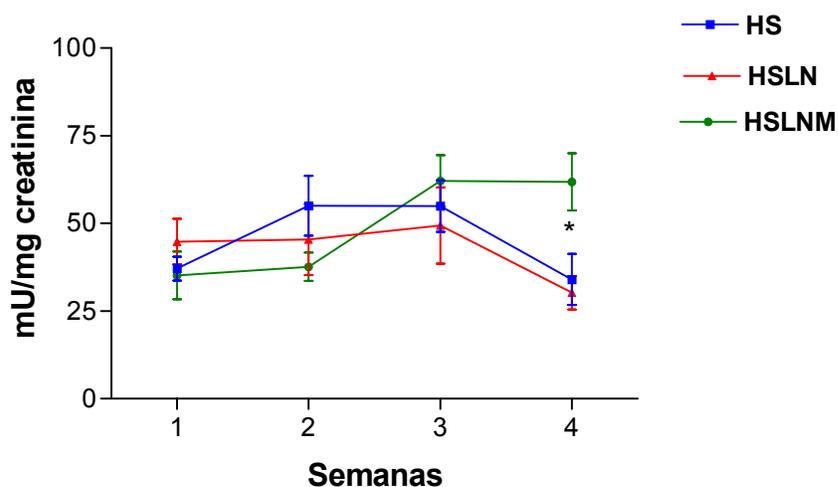


**Gráfico N° 4.** Presión arterial sistólica promedio (PASP), en ratas conscientes, durante todo el período experimental expresado en mmHg, con su error estándar (EE), para la serie HSLN+M. Letras distintas indican diferencias entre períodos ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.2 CALICREÍNA URINARIA.

### 5.2.1. Análisis interserie.

La actividad de calicreína urinaria no presentó diferencias ( $p > 0,05$ ) entre las tres series durante las primeras tres semanas del experimento. Durante la cuarta semana se observó un aumento de su actividad en la serie HSLN+M con respecto a las series HS y HSLN ( Gráfico N° 5; Anexo N° 8).



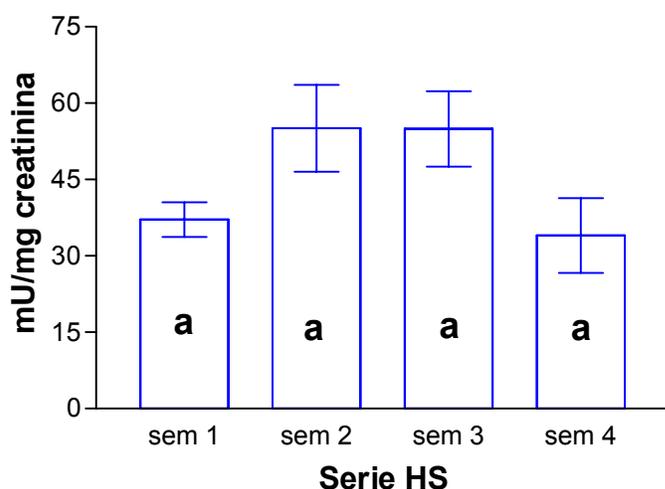
\* indica diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Gráfico N° 5.** Actividad enzimática promedio de calicreína urinaria expresada en miliunidades por miligramos de creatinina (mU/mg creatinina) y su error estándar (EE) en las series HS, HSLN y HSLN+M durante los días de medición.

### 5.1.2 Análisis intraserie.

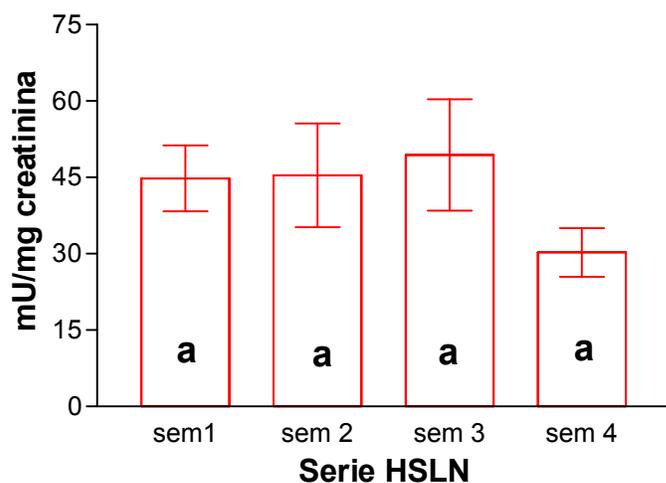
A continuación se detalla el análisis estadístico intraserie en el cual se compararon los valores obtenidos en cada serie a lo largo de todo el período experimental.

Se observa que la serie HS presenta variaciones en los valores obtenidos durante el estudio pero que no logran ser significativos. En la segunda semana del experimento se produce un aumento del valor promedio respecto a la primera semana. Este aumento se mantiene durante la tercera semana pero decae nuevamente en la cuarta semana a valores promedio de actividad enzimática de caliceína de  $34,01 \pm 7,32$  mU/ creatinina (Gráfico N° 6; Anexos N° 8 y N° 9).



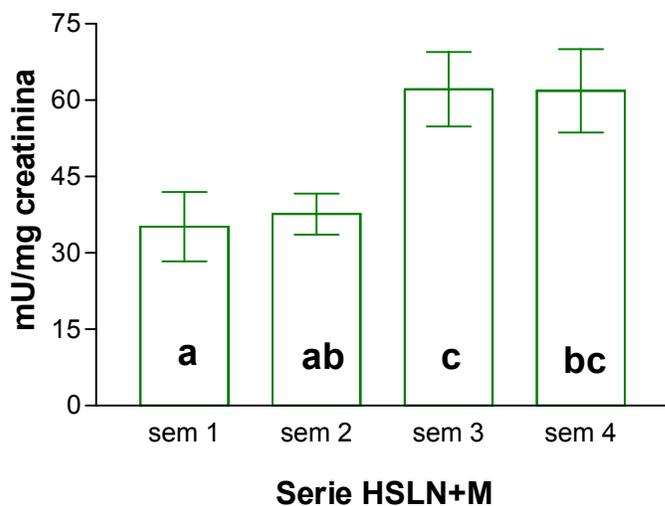
**Gráfico N° 6.** Actividad enzimática de caliceína urinaria promedio expresado en miliunidades por miligramos de creatinina (mU/mg creatinina) con su error estándar (EE) para la serie HS. Letras iguales indican que no hay diferencias entre períodos ( $p > 0,05$ ).

En la serie HSLN se ve que durante el experimento se matuvieron constantes los valores promedio de actividad enzimática de calicreína, no presentándose diferencias ( $p > 0,05$ ) entre las mediciones (Gráfico N° 7; Anexos N° 8 y N° 10).



**Gráfico N° 7.** Actividad enzimática de calicreína urinaria promedio expresado en miliunidades por miligramos de creatinina (mU/mg creatinina) con su error estándar (EE) para la serie HSLN. Letras iguales indican que no hay diferencias entre períodos ( $p > 0,05$ ).

Dentro de la serie HSLN+M se observa que los valores promedio de actividad enzimática de calicreína urinaria presentan variaciones en las dos últimas mediciones. En las dos primeras semanas los valores registrados fueron de  $35,16 \pm 6,82$  y  $37,65 \pm 4,03$  mU/mg creatinina y en las dos últimas semanas del experimento se observan valores  $62,15 \pm 7,31$  y  $61,84 \pm 8,17$  mU/mg creatinina lo que provocó diferencias ( $p \leq 0,05$ ) (Gráfico N° 8 Anexos N° 8 y N° 11).



**Gráfico N° 8.** Actividad enzimática de calicreína urinaria promedio expresado en miliunidades por miligramos de creatinina (mU/mg creatinina) con su error estándar (EE) para la serie HSLN+M. Letras distintas indican que hay diferencias entre períodos ( $p \leq 0,05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 PRESION ARTERIAL SISTÓLICA (PAS).

El modelo de inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico (ON) induce vasoconstricción renal y con esto injuria renal microvascular y tubulointersticial (Johnson y col., 2002) lo que lleva a la inflamación renal, efecto esperado por la conocida función del ON como agente endógeno anti-inflamatorio por inhibir la proliferación celular, adhesión de leucocitos, expresión de adhesión de moléculas y adhesión plaquetaria. La inflamación se considera como un elemento inseparable de daño, jugando un rol central en la patogénesis de nefropatías progresivas de origen no inmune (Fuhijara y col., 2001). De modo que no sólo se produce una elevación de la presión arterial sino que también un daño vascular y parenquimal del riñón (Ribeiro y col., 1992; Lahera y col., 1997). Por lo tanto, a través de la administración de L-NAME se generará daño en el tejido tubulointersticial del riñón y con esto daño al Sistema Calicreína-Cininas.

Al realizar un análisis comparativo entre las series en estudio se observó que durante el día 1 del experimento no existieron diferencias ( $p > 0,05$ ), esto debido a que se trata del primer registro de presión arterial sistólica (registro basal), en donde los animales estaban recibiendo agua con NaCl al 1% y no habían sido expuestos a la administración de L-NAME y/o MMF, dando valores de PAS similares para las tres series.

A la semana de tratamiento se observaron diferencias ( $p \leq 0,05$ ) entre la serie control (HS) y las series tratadas con L-NAME con o sin MMF, diferencias que se mantuvieron durante las 4 semanas que duró el estudio. Se observaron aumentos significativos de la PASP en las series HSLN y HSLN+M con respecto a los obtenidos en la serie HS, lo que estaría dado por el efecto de la administración de L-NAME que, al inhibir la síntesis del ON, inhibe el efecto vasodilatador. El análisis de los siguientes registros de PAS se enfocó a observar si existieron diferencias ( $p \leq 0,05$ ) entre las series HSLN y HSLN+M. Ambas series presentaron presiones arteriales elevadas desde la primera semana y se mantuvieron así durante todo el experimento, no presentándose diferencias ( $p > 0,05$ ), demostrando que la terapia con MMF no fue capaz de lograr un efecto en la presión arterial en este modelo, hecho observado en estudios previos (Fuhijara y col., 2001; Quiroz y col., 2001; Salas y col., 1999).

Al realizar el análisis intraserie se pudo observar que en la serie HS se presentaron valores de PASP que fluctuaron entre los 126,0 a 134,4 mmHg, no presentándose diferencias ( $p > 0,05$ ) en el tiempo. Esto afirma que el consumo de agua con NaCl al 1% a que fueron expuestos los animales no fue suficiente para generar un aumento en la presión arterial, hecho que se ha comprobado en estudios anteriores en los cuales ratas controles han sido sometidas a la ingesta de agua con NaCl al 1% (Katki y col., 2002; Supowit y col., 2001; Nolly y col., 1994).

En la serie HSLN se observó un aumento de la PASP con valores de 158,7 a 186,5 mmHg, obteniéndose valores individuales de hasta 230,0 mmHg a la 3ª semana del experimento. Se presentaron diferencias ( $p \leq 0,05$ ) entre el día 1 y el resto de las mediciones debido a que la primera medición estaba sin influencia de L-NAME. En la 1ª y la 2ª semana del estudio se mantuvieron más o menos constantes los valores para el grupo, del mismo modo ocurrió entre las semanas 3 y 4. Se han reportado, en otros estudios, aumentos de la presión arterial sistólica en ratas posterior a la administración de L-NAME en diferentes dosis y por distintos períodos de tiempo. En dosis de 30 mg/ Kg. día y por un período de 4 semanas, Mendizabal (1999) obtuvo un registro de PAS de 171,1 mmHg indicando una presión basal de 115,1 mmHg para su estudio. Fuhijara y col., (1994) reportaron valores de presión arterial de  $162,0 \pm 4$  mmHg en ratas a la que se les administró una dosis de 70 mg/ Kg. día de L-NAME y una dieta alta en sal por 15 días. Yamada y col., (1996), usando una dosis de 25 mg/Kg. día de L-NAME y una dieta alta en sal (3,2 % sodio) por un período de 6 semanas, registraron valores de presión de  $170,0 \pm 10$  mmHg.

En el instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile se han realizado varios estudios de inducción de hipertensión arterial con L-NAME en ratas conscientes en las cuales se midió la PAS a través del método no invasivo Doppler. En ellos se muestra un aumento de la presión arterial sistólica desde el tercer día de la administración de L-NAME con respecto a sus controles (Cárcamo, 2000; Pantanalli, 2001; Yutronic, 2001; Torres, 2002).

En la serie HSLN+M se observaron valores elevados de PASP ya desde la primera semana del estudio que fluctuaron entre los 158,9 y 185,8 mmHg, manteniéndose aumentados durante todo el experimento al igual que para la serie HSLN. El aumento de la PASP provocado por la inhibición de la síntesis del óxido nítrico por L-NAME no se ve modificado por el tratamiento paralelo con MMF en esta serie. Fuhijara y col., (2001) observaron que las ratas hipertensas L-NAME y tratadas con MMF, en dosis de 10 mg/Kg., no disminuyeron su presión arterial elevada con el tratamiento respecto a las ratas hipertensas sin tratamiento. Romero y col., (1999), utilizando dosis de 30 mg/Kg. de MMF en ratas sometidas al modelo de ablación renal 5/6, demostrando que es una dosis farmacológicamente activa en la prevención del daño tubulointersticial, reportaron que animales hipertensos tratados y no tratados siguieron con la presión arterial elevada con respecto a sus controles. Así también Quiroz y col., (2001) mostraron que el MMF, en igual dosis, no protegió a los animales de la aguda hipertensión inducida durante la administración de L-NAME.

## 6.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CALICREÍNA URINARIA.

En estudios realizados en el Instituto de Nefrología de la Universidad Austral de Chile sobre determinación de calicreína urinaria a través del método amidásico se han obtenido valores basales promedio de calicreína urinaria de 21,6 U/L con un error estándar (EE) de 2,7 y un valor de 32,3 mU/mg creatinina en ratas normales cepa Sprague Dawley con alimentación normosódica\*.

Extensos estudios epidemiológicos han documentado una relación inversa entre niveles de calicreína urinaria y elevación de la presión arterial en pacientes hipertensos. Puesto que la calicreína urinaria se origina en el riñón sus niveles decrecen con el deterioro de la función renal (Chao y col., 1997).

Al hacer el análisis comparativo entre las series en estudio se observó que entre las series HS y HSLN no existieron diferencias ( $p > 0,05$ ) durante las 4 semanas que duró el experimento. Al analizar las series HSLN y HSLN+M se pudo observar que durante las primeras 3 semanas no se presentaron diferencias ( $p > 0,05$ ), pero en la cuarta semana la serie HSLN+M mostró un aumento notorio de la actividad enzimática de calicreína, lo que podría deberse a que el tejido funcional remanente presentó una sobreactividad lo que se traduciría en un aumento exacerbado de la excreción de calicreína urinaria.

El análisis comparativo intraseries muestra que la serie HS no presentó diferencias ( $p > 0,05$ ) en el tiempo. Se observó una tendencia a ser más elevadas en la segunda y tercera semana, aumentos que podrían ser explicados por la ingesta aumentada de sal, ya que se ha observado que existe una correlación positiva entre sodio urinario, agua y calicreína en ratas que recibieron diferentes concentraciones de sal. Existen además experimentos animales en que es posible demostrar que incluso una carga aguda de sodio es capaz de inducir un incremento de la excreción de calicreína urinaria (Katori y col., 2003).

En la serie HSLN se observó que no se presentaron diferencias ( $p > 0,05$ ) durante el estudio. Cabe destacar que los valores obtenidos en esta serie estuvieron dentro de los rangos de normalidad para la cepa, no demostrándose la reducción de la excreción de calicreína, lo que podría deberse a una hiperactividad compensatoria del tejido funcional remanente ante el estado hipertensivo. Estos hallazgos resultan divergentes de lo descrito por Salas y col., (1999) quienes observaron que la inhibición de la síntesis de ON por 26 días en ratas preñadas produce una reducción significativa en la actividad de calicreína urinaria y calicreína tisular asociada con anomalías morfológicas del tejido renal, elevada presión arterial, reducción de niveles plasmáticos de renina y reducido peso fetal. Sin embargo es importante destacar que el estado de preñez introduce una variable independiente diferente al análisis. En el modelo hipertensivo de reducción de masa renal, Shimamoto y col., (1995) mostraron una reducción en la excreción de calicreína urinaria que estuvo correlacionado con un incremento en la presión arterial indicando que la inflamación tubulointersticial puede ser responsable de

---

\* Comunicación personal del Dr. Leopoldo Ardiles, Instituto de Nefrología de la Universidad Austral de Chile.

una deficiente actividad del SCC. Esto sugiere que los bajos niveles de calicreína encontrados en la orina se deben a una reducción en el contenido de la enzima en el riñón.

Dentro de los hallazgos más interesantes de esta investigación, está el alza en la excreción de calicreína que presentó la serie HSLN+M durante las últimas dos semanas del experimento. Estos valores notoriamente aumentados con respecto a las demás series podrían deberse a la acción protectora del MMF sobre las estructuras productoras de calicreína alojadas en el espacio tubulointersticial. Esta protección estructural podría permitir la sobreexpresión funcional del tejido remanente sobre-estimulado por el estado hipertensivo. En el modelo usado por Shimamoto y col., (1995), caracterizado por progresivo daño tubulointersticial con inflamación, fibrosis y desarrollo de hipertensión, Ardiles y col., (2002), presentaron reducción en el contenido de calicreína en células del túbulo de conexión en animales nefrectomizados, siendo el tratamiento con MMF capaz de reducir el daño tubulointersticial y al mismo tiempo mejorar la expresión tisular de calicreína y presión arterial.

El MMF ha sido usado en varios modelos experimentales, como en modelos de ablación renal y modelos de inhibición crónica del ON con L-NAME en los cuales se ha comprobado que previene la injuria renal, teniendo un rol protector del compartimento tubulointersticial (Badid y col., 2000; Fuhijara y col., 2001). En un modelo experimental de diabetes, el MMF no mostró efectos sobre la presión arterial pero sí se observaron efectos renoprotectores que fueron asociados a propiedades anti-inflamatorias, la que incluye restricción de proliferación de linfocitos y macrófagos y limitación de la expresión de moléculas de adhesión (Utamura y col., 2003).

A partir de evidencias clínicas y experimentales de la acción anti-inflamatorias del MMF, éste puede ser usado beneficiosamente para detener injurias progresivas renales inmuno y no inmunomediadas (Zatz y col., 2002).

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo no descartan la eventual utilidad de MMF como droga protectora del tubulointersticio y de la estructura y función del SCC en el daño renal experimental. De los resultados y lo descrito en la literatura, se confirma que es muy posible que el intenso estado vasoconstrictor inducido por la inhibición de la síntesis de ON no sea superable con la sola mejoría del daño tubulointersticial que puede producir el MMF.

## 7. CONCLUSIONES.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental, después de administrar Mofetil micofenolato en dosis de 30 mg/Kg. día, vía sonda bucoesofágica en un volumen de 0,5 mL por individuo, en ratas con inhibición de la síntesis de óxido nítrico con L-NAME, se concluye que:

- ✓ La administración de Mofetil micofenolato en ratas aumenta la actividad enzimática de calicreína a la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana.
  
- ✓ La administración de Mofetil micofenolato no manifestó efecto sobre la presión arterial en ratas tratadas con L-NAME.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- ALCASENA, M. S., J. MARTINEZ., J. ROMERO. 1999. Hipertensión arterial sistémica: fisiopatología. En: ANALES DEL SISTEMA SANITARIO DE NAVARRA, Vol. 21. Edit. Departamento de Salud del Gobierno de Navarra. Navarra, España.
- ARDILES, L., P. EHRENFELD., Y. QUIROZ., B. RODRIGUEZ-ITURBE., J. HERRERA-ACOSTA., S. MEZZANO., C. D. FIGUEROA. 2002. Effect of mycophenolate mofetil on kallikrein expression in the kidney of 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Blood Press.* 25: 289-95.
- BADID, C., M. VINCENT., B. MCGREGOR., M. MELIN., A. HADJ-AISSA., C. VEYSSEYRE., D. J. HARTMANN., A. DESMOULIERE., M. LAVILLE. 2000. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int.* 58: 51-61.
- BALSANO, F. 1991. The kidney and essential hypertension. *Ann Ital Med Int.* 6: Pt 2. 93-106.
- BHOOLA, K. D., C. D. FIGUEROA., K. WORTHY. 1992. Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacol Reviews.* 44: 4-60.
- BOERO, R., A. PIGNATARO., F. QUARELLO. 2002. Salt intake and kidney disease. *J Nephrol.* May-Jun: 15: 225-229
- CABRERA, W. 1997. Fisiología, genética, medio ambiente e historia natural de la hipertensión arterial. *Rev Perú Cardiol.* H 23: 9-21.
- CAMPESE, V. M. 1994. Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications [clinical conference]. *Hypertension.* 23: 531-550.
- CÁRCAMO, N. 2000. Efecto de los extractos etanólico y acuoso de *Allium ampeloprasum* (ajo chilote) sobre la presión arterial, administrados por vía oral en ratas hipertensas inducidas por L-NAME. Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- COLOWICK, S., N. O. KAPLAN. 1981. Methods in enzymology. Editor Lorand L., Vol 80 Part C. New York.
- CROXATO, H. 1981. Calicreína renal y presión sanguínea. *Revista Médica de Chile.* 109: 143-152.

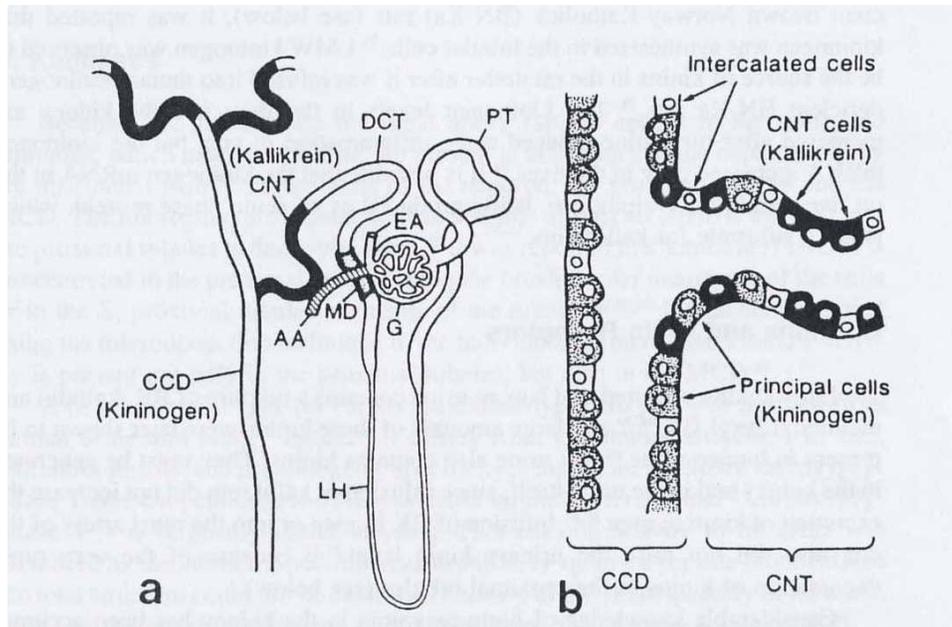
- CYTED, 1998. Obtenção de medicamentos inovadores com atividade anti-hipertensiva e vasodilatadora através da validação de plantas medicinais iberoamericanas. Recife, Brasil.
- CHAO, J., L. CHAO. 1997. New experimental evidence for a role of tissue kallikrein in hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 12: 1569-1574.
- CHEN, P. Y., P. W. SANDERS. 1991. L-Arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl Rapp rats. *Clin Invest*. 88: 1559-1567.
- ELGHOZI, J. L. 1988 a. Electrolytes, hormones and blood pressure. *Kidney*. September Vol. 33: 557.
- ELGHOZI, J. L. 1988 b. Antihormones and blood pressure. *Kidney*. October Vol. 34: 552.
- FIGUEROA, C. D., A. G MacIVER., I. C MacKENZIE., K. D. BHOOLA. 1988. Localization of immunoreactive kininogen and tissue in the human nephron. *Histochemistry*. 89: 437-442.
- FLÓREZ, J., J. A. ARMIJO., A. MEDIAVILLA. 1997. Farmacología humana. 3ª ed. Masson S.A. Barcelona.
- FUHIJARA, C. K., S. M. MICHELLAZZO., G. De NUCCI., R. ZATZ. 1994. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am J Physiol*. 266: F697-F705.
- FUHIJARA, C. K., I. NORONHA., R. ZATZ., G. De NUCCI., D. M. AVANCINI. 2001. Mycophenolate mofetil reduces renal injury in the chronic nitric oxide synthase inhibition model. *Hypertension*. 37: 170-175.
- GALLARDO, S. 2001. Valoración del efecto sobre la presión arterial del extracto etanólico de *Allium ampeloprasum* (ajo chilote), administrado por vía oral en ratas hipertensas renovasculares. Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- GANONG, W. 1998. Fisiología Médica. 10ª ed., Editorial El Manual Moderno. S.A. Ciudad de México.
- GOODMAN, L. S., A. GILMAN. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. Interamericana McGraw Hill. Ciudad de México.
- GUYTON, A. 1994. Fisiología y Fisiopatología. 5ª ed., Interamericana- McGraw Hill. Ciudad de México.
- GUYTON, A. 1997. Tratado de Fisiología Médica. 9ª ed., McGraw Hill. Ciudad de México.

- HERNÁNDEZ, R., C. FERNANDEZ y P. BAPTISTA. 1996. Metodología de la Investigación. Interamericana-McGraw Hill. Ciudad de México.
- JOHNSON, R., J. HERRERA-ACOSTA., G. SCHREINER., B. RODRIGUEZ-ITURBE. 2002. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med.* 346: 913-923.
- KATKI, K. A., S. C. SUPOWIT., D. J. DiPETTE. 2002. Substance P in subtotal nephrectomy-salt hypertension. *Hypertension.* 39: 389-393.
- KATORI, M., M. MAJIMA. 2003. The renal kallikrein-kinin system: Its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. *Crit Res Clin Lab Sci.* 40: 43-115.
- KATZUNG, B. G. 1998. Basic and Clinical Pharmacology. 7<sup>a</sup> ed. Stamford. Connecticut.
- LAHERA, V., J. NAVARRO-CID., V. CACHOFEIRO., J. GARCÍA-ESTAN., L. M. RUILOPE. 1997. Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am J Hypertens.* Jan: 10: 129-140.
- McPHEE, S., W. GANONG., V. LINGAPPA., J. LANGE. 2000. Fisiopatología Médica: Una introducción a la medicina clínica. 2<sup>a</sup> ed. Editorial El Manual Moderno. México.
- MEDIZABAL, V. 1999. Effects of the chronic in vivo administration of L-NAME on the response of rat perfused mesenteric bed. *J Auton Pharmacol.* 19: 241-248.
- NOLLY, H., O. A. CARRETERO., M. C. LAMA., R. MIATELLO., A. G. SCICLI. 1994. Vascular kallikrein in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 23: I185-I188
- PANTANALLI, M. 2001. Valoración del efecto antihipertensivo del extracto liofilizado de hojas de *Stachytarpheta cayennensis* sobre ratas con hipertensión inducida con L-NAME. Tesis, M. V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- PEREIRA, L. M., C. A. MANDARIM de LACERDA. 2001. Glomerular profile numerical density per area mean glomerular volume in rats subnitted to nitric oxide synthase blockade. *Histopathol.* 16: 15-20.
- QUIROZ, Y., H. PONS., K. GORDON., J. RINCÓN., M. CHÁVEZ., G. PARRA., J. HERRERA-ACOSTA., D. GÓMEZ-GARDE., R. LARGO., J. EGIDO., R. JOHNSON., B. RODRIGUEZ-ITURBE. 2001. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281: F38-F47.

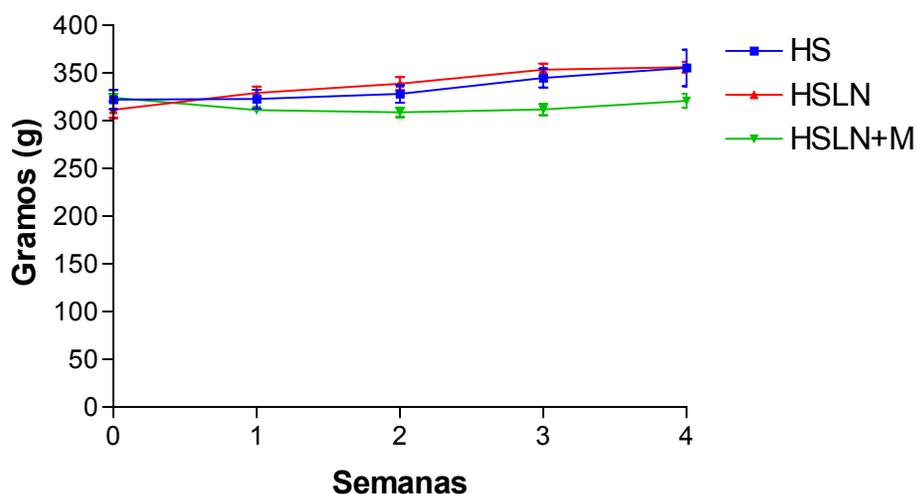
- RIBEIRO, M., E. ANTUNES., G. De NUCCI., S. M. LOVISOLO., R. ZATZ. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 20: 298-303.
- ROMERO, F., B. RODRIGUEZ-ITURBE., G. PARRA., L. GONZALEZ., J. HERRERA-ACOSTA., E TAPIA. 1999. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int*. 55: 945-955.
- ROSNER, 2000. Fundamentals of Biostatistics 5<sup>a</sup> ed., Editorial Duxbury, USA.
- SALAS, S., J. F. VULETIN., A. GIACAMAN., P. ROSSO., C. P. VIO. 1999. Long-term nitric oxide synthase inhibition in rat pregnancy reduces renal kallikrein. *Hypertension*. 34: 865-871.
- SHIMAMOTO, K., N. URA., T. ICHIGURO., N. NAKAGAWA., O. IIMURA. 1995. The role of renal natriuretic depressor system on hypertensive mechanisms in reduced renal mass hypertensive rats. *Hypertens Res*. 18: S53-S57.
- SIEGEL, S. 1996. Metodología de la Investigación. Interamericana-McGraw Hill. Ciudad de México.
- SOKAL, R. R. y J. F. ROHLF. 1981. Biometry. 2<sup>nd</sup> ed. Freeman. San Francisco.
- STEVEN, C., P. N. HOPKINS., R. W. WILLIAMS. 1997. Aspectos genéticos y mecanismos. En: FUSTER, V., R. ROSS., E. J. TOPOL. Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Springer, Barcelona. Vol.1.
- SUPOWIT, S. C., H. ZHAO., D. H. WANG., D. J. DiPETTE. 2001. Omapratilat in subtotal nephrectomy-salt hypertension role of calcitonin generelated peptide. *Hypertension*. 38: 389-393.
- TAFUR, E. 1998. El endotelio normal y disfunción, formación y desarrollo de la placa ateromatosa. Disponible en: [www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia.htm](http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia.htm)
- TORRES, L. 2002. Evaluación del efecto antihipertensivo del extracto n- butanólico de ramas de *Tristerix (Phrygilanthus) tetrandus* en ratas con hipertensión inducida con L-NAME. Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- TRESGUERRES, J., E. AGUILAR., M. V. CACHOFEIRO., D. CARDINALI., P. GIL.; V. LAHERA., J. A. MARTINEZ., F. MORA., R. RODRIGUEZ., M. ROMANO., J. TAMARGO., P. ZARCO. 1999. Fisiología Médica. 2<sup>a</sup> ed., Editorial McGraw Hill. Interamericana. España.

- UTIMURA, R., C. K. FUHIJARA., A. L. MATTAR., D. M. MALHEIROS., I. L. NORONHA., R. ZATZ. 2003. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 63: 209- 216.
- VIO, C. P., S. LOYOLA., V. VELARDE. 1992. Localization of componentes of the kallikrein-kinin system in the kidney: Relation to Renal function. State of the Art. Lecture. *Hypertension.* Suppl II 19: 10-16.
- YAMADA, S. S., A. L. SASSAKI., C. K. FUHIJARA, D. M. MALHEIROS., G. DENUCCI., R. ZATZ. 1996. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension.* 27: 1165-1172.
- YUTRONIC, V. 2001. Evaluación del efecto antihipertensivo de extracto sin K<sup>+</sup>, acuoso y n-butanólico, de raíz de *Muehlenbeckia hastulata* en ratas hipertensas L-NAME. Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- ZATZ, R., I. L. NORONHA., C. K. FUHIJARA. 2002. Experimental and clinical rationale for use of MMF in nontransplant progressive nephropathies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283: F1167-1175.
- ZAR, H. 1999. Bioestadistical Analysis 4<sup>th</sup> ed. Plentice-Hall Inc. New Jersey. USA.
- ZHANG, X., G. A. SCICLI., X. XU., A. NASJLETTI., T. H. HINTZE. 1997. Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension.* 30: 1105-1111.

## 9. ANEXOS.

Anexo N° 1

**Fig1. (a) Diagrama de la localización inmunohistoquímica de calicreína y cininógeno en la nefrona humana y (b) representación esquemática de las células de segmento de conexión (intercaladas y células de conexión).**

**Anexo N° 2.**

**Gráfico N° 9.** Peso corporal promedio (PCP) y su error estándar (EE), para las series en estudio, Serie HS (control), Serie HSLN (L-NAME) y Serie HSLN+M (L-NAME + MMF) durante los días de medición de presión arterial del experimento expresado en gramos.

**Tabla N° 1:** Peso corporal promedio (PCP) y su error estándar (EE), para las series en estudio, Serie HS (control), Serie HSLN (L-NAME) y Serie HSLN+M (L-NAME + MMF) durante los días de medición de presión arterial del experimento expresado en gramos.

Tiempo	HS (Control)		HSLN (L-NAME)		HSLN+M (L-NAME+MMF)	
	PCP	EE	PCP	EE	PCP	EE
Día 1	322,1	10,1	311,6	8,81	324,1	3,97
Sem 1	322,7	9,73	329,2	6,63	311,3	3,47
Sem 2	328	9,16	338,9	7,04	308,8	5,06
Sem 3	344,9	9,94	353,4	6,62	311,7	5,85
Sem 4	355,4	19,2	356,1	5,52	320,7	7,36

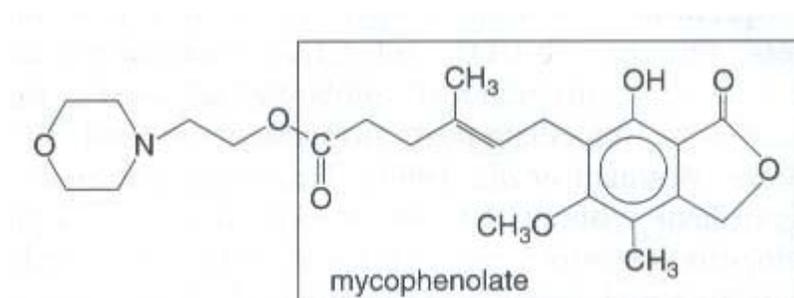
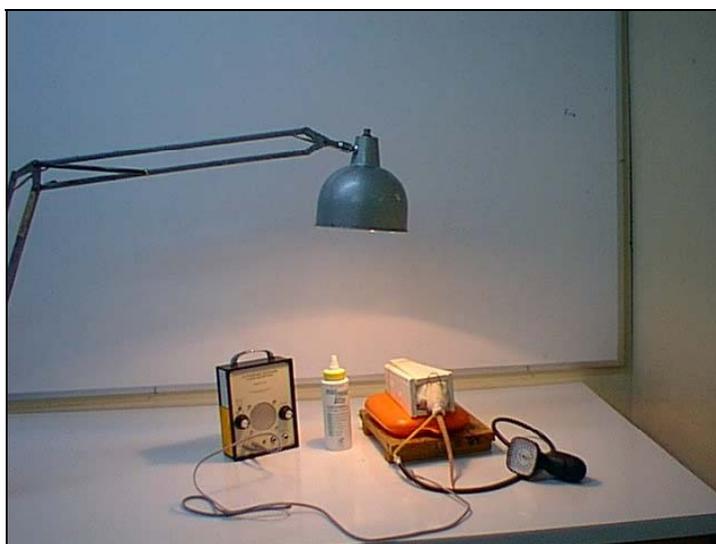
**Anexo N° 3.**

Fig 2. Estructura química del Mofetil micofenolato.

**Anexo N° 4**

**Foto N° 1.** Equipo de ultrasonido Doppler y materiales necesarios para la medición de presión arterial sistólica tales como esfigmomanómetro, manguito inflable, gel para ultrasonido, cubículo de inmovilización y fuentes de calor.

**Anexo N° 5**

**Foto N° 2.** Caja metabólica y accesorios necesarios para la obtención de muestras de orina.

**Anexo N° 6**

El procedimiento para la medición de la actividad enzimática de calicreína urinaria es el siguiente:

- Dilución de las muestras:

Considerando la curva de actividad y saturación de la reacción enzimática, las muestras de orina de una rata normal se deben diluir 50 veces, por lo tanto primero se diluyen 160  $\mu\text{L}$  de muestra problema en 640  $\mu\text{L}$  de buffer y de esta dilución se extraen 80  $\mu\text{L}$  que se diluyen en 720  $\mu\text{L}$  de buffer para obtener la dilución deseada de 1:50

- Identificación de las muestras:

Se rotulan las cubetas de reacción, incluyendo para cada muestra un blanco y la determinación en duplicado.

- Medición:

-A cada cubeta se incluyen 400  $\mu\text{L}$  de buffer amidasa y se agregan 100  $\mu\text{L}$  de muestra de orina diluida 1:50 se incuban por 15 minutos a 37° C

-Se agregan 400  $\mu\text{L}$  de inhibidor enzimático SBTI-EDTA (inhibe otras enzimas excepto calicreína) y se incuban por 30 minutos a 37° C.

-Se agregan 100  $\mu\text{L}$  de sustrato a cada cubeta incluido el blanco y se incuban por 30 minutos a 37° C.

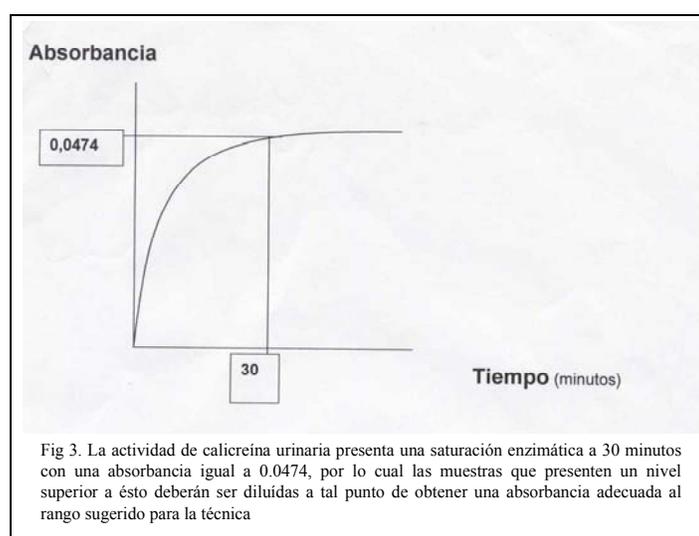
-Se agregan 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético 50% v/v para detener la reacción.

-Leer a 405 nm. Esta lectura arrojará las absorbancias de cada cubeta. Para obtener la absorbancia por muestra se debe sacar un promedio de las absorbancias de las dos cubetas de la muestra problema y restarle la absorbancia del blanco.

-Obtenidas las absorbancias de cada muestra se deberán multiplicar por factores para así calcular la actividad de caliceína en la muestra en U/L pudiendo también obtener las concentraciones de acuerdo a la diuresis de la rata, o sea, U/24 horas.

-Conversión: con el fin de homogenizar las muestras y poder hacerlas comparables a diferentes volúmenes de orina, se expresó el valor de actividad enzimática de caliceína en razón al valor de creatininuria.

### Curva de saturación de actividad de caliceína urinaria:



### Fórmulas:

$$U/Lts = \text{Absorbancia} * 38$$

$$U/24 h = \text{Absorbancia} * 38 * \text{Diuresis (Lts)}$$

**Anexo N° 7.**

**Tabla N° 2.** Presión arterial sistólica promedio (PASP) y su error estándar (EE) para las series en estudio HS, HSLN y HSLN+M expresado en mmHg.

Tiempo	HS (Control)		HSLN (L-NAME)		HSLN+M (L-NAME+MMF)	
	PASP	EE	PASP	EE	PASP	EE
Día 1	126,9	2,043	132,6	2,489	133,7	4,104
Sem1	136,4	2,355	158,7	2,877	158,9	2,827
Sem2	136,2	2,867	163,6	3,17	159,8	2,43
Sem3	131,6	2,607	186,5	3,991	185,8	6,126
Sem4	130	3,848	182	3,619	184,7	8,817

**Anexo N° 8.**

**Tabla N° 3.** Promedios de actividad enzimática de caliceína urinaria expresado en miliunidades por miligramo de creatinina (mU/mg creatinina) con su error estándar (EE) para las series HS (control), HSLN (L-NAME) y HSLN+M (L-NAME + MMF) obtenidos durante el experimento.

Semanas	HS (Control)		HSLN (L-NAME)		HSLN+M (L-NAME+MMF)	
	Promedio	EE	Promedio	EE	Promedio	EE
1	37,13	3,42	44,8	6,49	35,16	6,82
2	55,07	8,52	45,4	10,18	37,65	4,02
3	54,94	7,39	49,42	10,92	62,15	7,31
4	34,01	7,32	30,26	4,77	61,84	8,17

**Anexo N° 9.**

**Tabla N° 4.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HS durante la semana 1.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HS 1	6	0,013	24,7	1015	24,33
HS 2	28	0,007	12,3	365	33,70
HS 3	19	0,015	27,5	580	47,41
HS 4	12	0,014	21,3	445	47,87
HS 10	9	0,022	32,7	1160	28,19
HS 11	14	0,015	22,8	610	37,38
HS 13	8	0,019	28,1	685	41,02

**Tabla N° 5.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HS durante la semana 2.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HS 3	27	0,014	21,3	365	58,36
HS 5	19	0,014	26,6	370	71,89
HS 6	40	0,013	24,7	255	96,86
HS 9	23	0,009	17,1	430	39,77
HS 10	28	0,013	19	525	36,19
HS 12	25	0,013	19,8	535	37,01
HS 14	25	0,013	19,8	435	45,52

**Tabla N° 6.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HS durante la semana 3.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HS 1	8	0,011	20,9	990	21,11
HS 2	38	0,011	20,9	285	73,33
HS 5	20	0,012	21,8	340	64,12
HS 6	41	0,009	16,1	280	57,50
HS 9	32	0,016	23,6	310	76,13
HS 11	14	0,014	25,6	665	38,50
HS 12	17	0,021	39,9	740	53,92

**Tabla N° 7.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HS durante la semana 4.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HS 3	28	0,01	19	365	52,05
HS 4	6	0,013	24,7	730	33,84
HS 7	6	0,008	15,2	1170	12,99
HS 8	10	0,01	18,5	890	20,79
HS 10	13	0,012	21,8	795	27,42
HS 13	14	0,008	14,2	615	23,09
HS 14	28	0,01	19	280	67,86

**Anexo N° 10.****Tabla N° 8.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de calicreína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN durante semana 1.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Calicreína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLN 2	29	-0,003	5,7	280	20,32
HSLN 3	43	0,007	13,3	255	52,16
HSLN 7	10	0,026	48,4	1030	46,99
HSLN 9	21	0,011	19,9	475	41,89
HSLN 10	14	0,013	23,7	310	76,45
HSLN 11	13	0,021	39,9	1015	39,31
HSLN 12	8	0,023	42,7	1170	36,50

**Tabla N° 9.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de calicreína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN semana 2.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Calicreína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLN 3	62	0,002	3,8	240	15,83
HSLN 5	13	0,027	50,3	660	76,21
HSLN 11	23	0,007	13,3	530	25,09
HSLN 12	18	0,011	19,9	640	31,09
HSLN 13	17	0,021	39,9	1610	24,78
HSLN 14	5	0,018	34,2	450	76,00
HSLN 15	20	0,017	31,3	455	68,79

**Tabla N° 10.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de calicreína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN durante semana 3.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Calicreína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLN 2	75	0,008	15,2	170	89,41
HSLN 3	27	0,016	23,6	295	80,00
HSLN 5	9	0,014	25,6	1050	24,38
HSLN 7	16	0,009	17,1	785	21,78
HSLN 13	11	0,015	27,5	1045	26,32
HSLN 15	30	0,009	17,1	250	68,40
HSLN 16	11	0,018	34,2	960	35,63

**Tabla N° 11.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN durante semana 4.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLN 9	32	0,009	13,7	425	32,24
HSLN 10	29	0,006	11,4	475	24,00
HSLN 11	3	0,031	57,9	2580	22,44
HSLN 12	19	0,018	34,2	600	57,00
HSLN 14	10	0,019	36,1	1215	29,71
HSLN 17	15	0,01	19	1000	19,00
HSLN 18	20	0,007	13,3	485	27,42

### Anexo N° 11.

**Tabla N° 12.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN+M durante semana 1.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLNM 1	6	0,013	23,7	930	25,48
HSLNM 2	8	0,017	31,3	835	37,49
HSLNM 5	14	0,022	41,8	775	53,94
HSLNM 8	5	0,011	19,9	860	23,14
HSLNM 9	8	0,01	19	820	23,17
HSLNM 10	4	0,01	19	1075	17,67
HSLNM 11	24	0,011	19,9	305	65,25

**Tabla N° 13.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN+M durante semana 2.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLNM 2	15	0,007	12,3	560	21,96
HSLNM 3	10	0,017	32,3	770	41,95
HSLNM 4	62	0,003	3,8	135	28,15
HSLNM 8	8	0,02	37	960	38,54
HSLNM 12	3	0,025	46,5	960	48,44
HSLNM 13	29	0,01	19	370	51,35
HSLNM 14	7	0,015	28,5	860	33,14

**Tabla N° 14.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN+M durante semana 3.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLNM 1	58	0,009	16,1	200	80,50
HSLNM 2	44	0,01	19	265	71,70
HSLNM 3	22	0,018	34,2	530	64,53
HSLNM 4	61	0,009	16,1	185	87,03
HSLNM 5	20	0,014	25,6	525	48,76
HSLNM 9	8	0,015	27,5	835	32,93
HSLNM 14	8	0,029	54,1	1090	49,63

**Tabla N° 15.** Planilla de registros del ensayo de cálculo de caliceína urinaria y valores de creatininuria para la serie HSLN+M durante semana 4.

Identificación muestras	Diuresis ml/ 24 hrs	Absorbancias	Caliceína U/lt	Creatininuria mg/lt	mU/mgcreatinina
HSLNM 8	34	0,009	16,1	330	48,79
HSLNM 10	39	0,012	22,8	340	67,06
HSLNM 11	43	0,011	20,9	250	83,60
HSLNM 12	54	0,007	13,3	175	76,00
HSLNM 13	5	0,027	51,3	1245	41,20
HSLNM 15	20	0,007	13,3	430	30,93
HSLNM 16	20	0,022	41,8	490	85,31

## 10. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera ayudaron a ser realidad este trabajo, en especial a:

- Dr. Frederick Ahumada, por su buena disposición y apoyo.
- Dr. Leopoldo Ardiles, por toda la ayuda prestada y por su preocupación constante.
- Dr. Marcos Moreira, por ser un importante apoyo en todo momento y por su compañía.
- Dr. Luis Améstica, por ser un gran amigo y por su desinteresada cooperación.
- Fernando Loyola, por prestarme la ayuda necesaria en la realización de la parte experimental de este trabajo y por su amistad.
- Srta. Juanita, por estar siempre dispuesta a ayudarme.
- Sr. Manuel del bioterio del Instituto de Histología, por hacerme muy grata la estadía en ese instituto y por su ayuda.
- A mis padres, Alcibiades e Iris y hermanos, Mauricio, Eduardo y Karina por creer en mí y brindarme todo su amor y apoyo.
- A mi esposo Mauricio por ser el amor de mi vida.
- A mi hijo Vicente por ser lo más maravilloso de mi existencia.
- A todos mis amigos en especial a Mónica y Jaime, por su ayuda incondicional y cariño entregado y a Carolina Barría por su cooperación, ayuda y amistad infinita.