

Regulación del receptor de angiotensina tipo 1 y su expresión génica: papel en el crecimiento renal

DONNA H. WANG, YONG DU,* HUAWEI ZHAO, JOEY P. GRANGER,*

ROBERT C. SPETH y DONALD J. DIPETTE*

Departamento de Medicina Interna, Hipertensión y Laboratorios de Investigación Vascular, Rama Médica de la Universidad de Texas, Galveston, Texas; ¹Departamento de Fisiología y Biofísica, Centro Médico de la Universidad de Mississippi, Jackson, Mississippi; y Departamento de Anatomía Veterinaria y Comparada, Farmacología y Fisiología, Universidad Estatal de Washington, Pullman, Washington.

Resumen. Se ha demostrado que la ingesta baja de sodio regula al alza la expresión génica del receptor predominante de angiotensina II (Ang II) tipo 1 renal (AT1), el subtipo AT1A. El estudio presentado aquí pone a prueba la hipótesis de que la regulación al alza del ARNm de AT1 renal inducida por la depleción de sodio ocurre junto con una elevación del receptor AT1 que modula el crecimiento renal. Ratas Wistar macho de siete semanas de edad se dividieron en cuatro grupos y se trataron durante 2 semanas con dieta normal en sodio, dieta normal en sodio más 3 mg/kg/día de losartán, dieta baja en sodio o dieta baja en sodio más losartán. El peso corporal y el MAP no fueron significativamente diferentes entre los cuatro grupos. La actividad de la renina plasmática aumentó significativamente con el tratamiento con losartán, la baja ingesta de sal o una combinación de ambos, en comparación con la actividad de la renina plasmática de los controles. El análisis Northern blot indicó que los niveles renales de ARNm de AT1 aumentaron significativamente: 183 % por losartán, 212 % por la baja ingesta de sal y 227 % por la combinación de los dos, en comparación con sus niveles en los controles. Los ensayos de unión de radioligandos revelaron que los receptores AT1 aumentaron significativamente con la ingesta baja de sal, pero disminuyeron significativamente con el tratamiento con losartán. Renal

La unión al receptor AT1 en las ratas sometidas a depleción de sodio más losartán no difirió de la de las ratas de control. El peso de los riñones, la relación entre el peso de los riñones y el peso corporal, y el ADN y el contenido de proteínas renales no se vieron alterados por la depleción de sodio, pero se redujeron significativamente con el tratamiento con losartán con una ingesta de sodio normal y baja, en comparación con los controles. La relación proteína/ADN no fue significativamente diferente entre los cuatro grupos. Se encontró que el bloqueo de los receptores AT1 renales con losartán retrasa el crecimiento renal normal, lo que indica que se requiere Ang II para el desarrollo renal normal. Se encontró que la ingesta baja de sodio aumenta el ARNm y la expresión del receptor renal AT1 pero no tiene efecto sobre el crecimiento renal, lo que sugiere que un aumento en la masa renal por encima de un nivel normal requiere la activación de múltiples factores. Se encontró que el bloqueo del receptor AT1 por parte de losartán regula positivamente el ARNm de AT1 pero regula negativamente el receptor AT1, lo que sugiere que los eventos intracelulares mediados por el receptor AT1 son necesarios para mantener la expresión funcional del receptor AT1 en el riñón. (J Am Soc Nephrol 8: 193-198, 1997)

El sistema renina-angiotensina (RAS) juega un papel importante en la regulación de la presión arterial, el equilibrio de electrolitos y el control del volumen de líquido extracelular. Los efectos de la angiotensina II (Ang II) están mediados por la unión a receptores específicos. Con el uso de un método de unión de ligando autoradiográfico *in vitro* competitivo, se ha demostrado que el receptor de Ang II tipo 1 (AT1) es el subtipo renal predominante (1-3). Recientemente, hemos demostrado que la expresión génica del receptor AT1A, que es el subtipo predominante de AT1 en el riñón, está regulada positivamente por una ingesta baja de sodio (4), lo que sugiere que la expresión del receptor AT1 en el riñón está relacionada con la sal y el agua homeostasis.

Curiosamente, la expresión del gen AT1 también está elevada en el riñón durante la vida fetal en comparación con su expresión en el adulto.

animal, lo que sugiere un papel para Ang II en el crecimiento y la maduración renal (5). En apoyo de este concepto, hemos informado anteriormente que el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), captopril, impide el crecimiento normal de los vasos sanguíneos en la rata (6). Además, la administración de captopril en un riñón, en ratas hipertensas con un clip, reduce la masa de la pared tanto de la aorta como de las arteriolas del músculo esquelético (7). Estos efectos inhibidores del crecimiento de la inhibición de la ECA son independientes de los cambios hemodinámicos concomitantes (6,7).

Faltaba evidencia directa de un efecto de Ang II sobre el crecimiento renal normal hasta el informe reciente de Tufro-McReddie et al. (8). Este estudio mostró que el bloqueador selectivo de AT1, losartán, inhibe el crecimiento renal y somático normal en ratas. Estos resultados plantearon la intrigante pregunta de si la activación de la expresión del gen AT1 por una ingesta baja de sodio induce un crecimiento renal anormal. Si el gen AT1 está relacionado con el crecimiento renal anormal, el conocimiento de este vínculo podría proporcionar una mayor comprensión de la relevancia de los receptores AT1 en los estados de enfermedad renal y de hipertensión. Por ejemplo, se ha observado que el crecimiento renal compensatorio puede resultar en el desarrollo de glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial asociada con la pérdida irreversible de nefronas funcionales (9), y la última

Recibido el 28 de diciembre de 1995. Aceptado el 9 de septiembre de 1996.

Correspondencia a la Dra. Donna H. Wang, Departamento de Medicina Interna, Hipertensión y Laboratorios de Investigación Vascular, 8.104 Edificio de Investigación Médica, Rama Médica de la Universidad de Texas, Galveston, TX 77555-1065.

1046-6673/96/02-0193\$03.00/0

Revista de la Sociedad Americana de Nefrología

Copyright © 1997 de la Sociedad Americana de Nefrología

el resultado de la pérdida de nefronas en el riñón es la enfermedad renal en etapa terminal, por ejemplo, insuficiencia renal. Además, las observaciones clínicas indican que la hipertensión sistémica se encuentra prácticamente en todos los sujetos con menos de $0,8 \times 10^6$ glomérulos por riñón (10). Por lo tanto, es importante determinar los mecanismos subyacentes al crecimiento renal. En el estudio presentado aquí, utilizamos el análisis de transferencia Northern combinado con la unión de radioligandos para probar la hipótesis de que el aumento de la expresión del gen AT1 mediante la restricción de sodio da como resultado un aumento en la densidad del receptor AT1 que, en consecuencia, modula el crecimiento renal.

Grupos de tratamiento de materiales y métodos

Ratas Wistar macho jóvenes de 7 semanas de edad que pesaban 179 ± 4 g (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (N 13 en cada grupo) y se trataron durante 2 semanas con una dieta normal de sodio (0,5 %), dieta normal en sodio más losartán, dieta baja en sodio (0,07%) o dieta baja en sodio más losartán. El alimento para ratas se adquirió de Harlan Teklad Diets (Madison, WI). Losartán (3 mg/kg/día) se disolvió en 0,5-1 ml de agua y se administró por sonda oral. Se eligió esta dosis de losartán porque se ha demostrado previamente que proporciona antagonismo de la angiotensina II sin disminuir la presión arterial (comunicación personal con el Dr. Pancras C. Wong, DuPont Merck Pharmaceutical Company, Wilmington, DE). Se administró una cantidad igual de agua por sonda oral tanto a las ratas NS como a las LS. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas del Instituto Nacional de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Actividad de renina plasmática

Al final de los tratamientos de dieta de 2 semanas, todas las ratas se anestesiaron con una única inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de tiopental sódico. Se cateterizó la arteria carótida derecha para medir la presión arterial media (PAM) con un transductor de presión Statham 231 D (Gould Inc., Cleveland, OH) acoplado a un registrador Gould 2400S (Gould Inc.). Las ratas se heparinizaron (1 unidad/g) y se recogieron muestras de plasma (3 ml) de la arteria carótida y se colocaron en tubos enfriados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La actividad de renina plasmática (PRA) se determinó utilizando un kit de radioinmunoensayo comercialmente disponible para angiotensina I (Instar Co., Stillwater, MN).

Preparación de tejidos y medición de ADN y Contenido de proteína

Para obtener tejido para el análisis de transferencia Northern, se realizó una incisión en la línea media del abdomen. El riñón izquierdo fue removido rápidamente, pesados, congelados en nitrógeno líquido y procesados para la extracción de ARN. Para obtener tejido para el estudio de unión y la medición del contenido de ADN y proteína, el riñón derecho se dividió en tres partes, se pesó y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Debido a que la cantidad de ADN por célula es constante en las células euploidías de cada especie, el contenido de ADN de los tejidos sólidos es una medida indirecta del número de células (11). El contenido de proteína es un indicador aceptado del tamaño celular (11). Por lo tanto, el contenido de ADN se analizó con el compuesto fluorescente Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (F-4500, Hitachi Co., Tokio, Japón) (12). El contenido de proteínas se midió utilizando un procedimiento de unión de colorante Bradford modificado (Bio-Rad, Hercules, CA) (13). Los resultados se normalizaron a riñón completo por peso y se expresaron como ADN (mg/riñón) o proteína (mg)/riñón.

Sondas CDNA

El clon pUC19 que contiene 2,3 kb del receptor ATI de rata (una generosa donación del Dr. Tadashi Inagami, Facultad de Medicina de la Universidad de Vanderbilt, Nashville, TN) (14) se digirió con Kpn I y EcoR I para obtener un fragmento de 790 pb (-180 a +610). Este fragmento se usó como molde para fabricar sondas de cDNA de ATI. Las sondas de ADNc de ATI se marcaron con "p-dCTP usando un sistema de marcaje de ADN Multiprime (Amersham Co., Arlington, IL) a una actividad específica de 3×10^9 CPM/ug. Las sondas marcadas se separaron del nucleótido no incorporado utilizando columnas de centrifugación de purificación de ADN Mini-Spin G-50 (Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ).

Extracción de ARN y transferencias

Northern Se extrajo el ARN total de riñón usando el protocolo de extracción de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (15). La electroforesis de 30 ug de ARN desnaturizado de cada preparación se realizó en un gel de agarosa al 1% que contenía 2,2 mol/L formaldehido. El ARN se transfirió a una membrana de nailon cargada positivamente (Fisher Co., Houston, TX). La membrana se horneó a 80 °C durante 2 h en un horno de vacío (Fisher Co., Houston, TX) y se prehíbridaron durante 5 h a 42 °C en tampón de hibridación: formamida desionizada al 50%, solución de Denhardt 5x, citrato salino estándar 5x (SSC), dodecilsulfato de sodio al 0,5% (SDS) y 200 ug/ml. de ADN de esperma de salmón desnaturizado. La membrana se hibridó con las sondas marcadas con p en el tampón de hibridación durante 18-20 h a 42 °C. Luego se lavó sucesivamente en SSC 2X, 1X y 0,5x (dos veces, 10 min cada una) que contenía SDS al 0,1%. La rigurosidad de los lavados fue de 65°C. Las transferencias se expusieron a película de rayos X XAR-5 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) con pantalla intensificadora. Para corregir las diferencias en la carga de ARN. Las transferencias Northern se incubaron a 90 °C durante 10 min en 20 tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) HCl (pH 8,0) para eliminar las sondas de ADNc y se rehibridaron con sondas de ADNc de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) marcadas con 32p. Las señales autorradiográficas se escanearon con un densímetro láser (Ultrascan XI, Pharmacia). La expresión génica relativa se expresó como la relación entre el ARNm de ATI y el ARNm de GAPDH.

Ensayo de unión de ligandos

Los tejidos se homogeneizaron en tampón hipotónico (fosfato sódico 20 mM, pH 7,1-7,2). A continuación, los homogeneizados se centrifugaron a 48.000 durante 20 min a 4°C. Las membranas celulares se resuspendieron en tampón de ensayo (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, bacitracina 0,1 mM, pH 7,2) y se volvieron a centrifugar. La bacitracina y el EDTA se incluyen en el tampón de ensayo para inhibir la actividad de la peptidasa en la preparación del tejido. Después de la resuspensión en el tampón de ensayo, se usó una aliquota de la suspensión de la membrana celular para el ensayo de proteínas utilizando el procedimiento de unión de tinte de Bradford modificado (Bio-Rad, Hercules, CA) (13). Para medir los receptores de Ang II totales, se incubaron 100 g de proteína con 62,5 p.m. a mono 1-(Sar, Ble) Ang II 2 nM preparado como describen Speth et al (16) en un volumen final de 200 al. tampón de ensayo que contiene albúmina de suero bovino al 0,1 %. Se usó 21-(Sar, lle) Ang II como radioligando porque es un antagonista que no varía en su afinidad de unión a las conformaciones agonistas de alta y baja afinidad de los receptores de angiotensina, y es resistente a la actividad de peptidasa en virtud de la falta de un grupo amino amino terminal libre. Para medir la densidad del receptor ATI, se usó 1-(Sar, lle) Ang II en nmol/L en presencia o ausencia del antagonista específico de ATI losartan (1 umol/L). La unión no específica se midió en presencia de 1 jmol/L Ang II sin marcar. El ensayo de unión se realizó durante 120 min a temperatura ambiente y fue seguido de una filtración inmediata a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C, Hillsboro, OR). La radioactividad unida al filtro se contó en un espectrómetro gamma (Beckman, LS 3801, Irvine, CA). La afinidad del receptor y la concentración fueron calcu-

por análisis de Scatchard utilizando el programa de ajuste de curva computarizado Ligand (17).

Análisis estadísticos Los

resultados se expresaron como media \pm SEM. Los datos fueron analizados por análisis de varianza unidireccional seguido del múltiple de Tukey-Kramer Prueba de comparación. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas al nivel de $P <$

0,05.

Resultados No hubo cambios significativos en MAP entre los cuatro grupos (Tabla 1). La capacidad del tratamiento con baja ingesta de sal o losartán para modular el sistema renina angiotensina (RAS) se confirmó mediante la observación de PRA elevada en los tres grupos de tratamiento en comparación con la del grupo de control ($P < 0,05$, Tabla 1).

Aunque el peso corporal no fue significativamente diferente entre los cuatro grupos, el peso de los riñones y la relación entre el peso de los riñones y el peso corporal fueron menores en las ratas que recibieron losartán, ya sea solo o junto con una ingesta baja de sal, que en las ratas de control ($P < 0,05$, Tabla 2), lo que indica que el bloqueo de la unión de la Ang II endógena a los receptores ATI retrasa el crecimiento renal normal. Una ingesta baja de sal por si sola no alteró el peso del riñón o la relación peso del riñón/peso corporal (Tabla 2), lo que indica que la activación del RAS endógeno no necesariamente estimula el crecimiento renal.

Para determinar si el crecimiento renal alterado en las ratas tratadas con losartán se debió a cambios en el número de células o en el tamaño de las células, se determinó el contenido de proteína y ADN renal y la relación proteína a ADN (Tabla 2). El contenido de ADN y proteínas fue más bajo en ambos grupos de ratas tratadas con losartán que en las ratas de control ($P < 0,05$), lo que indica que el tratamiento con losartán resultó en una disminución del número de células renales. Además, la relación proteína/ADN no se vio alterada por losartán en comparación con la de las ratas de control, lo que indica que losartán no afecta el tamaño de las células. Por el contrario, el contenido renal de ADN y proteínas, y la relación proteína/ADN no se vieron alterados por una baja ingesta de sal, lo que indica que la deficiencia de sodio no cambia ni el número ni el tamaño de las células (Tabla 2).

El contenido de ARNm de ATI renal se determinó mediante análisis de transferencia Northern en cada uno de los cuatro grupos de ratas (Figura 1A). El análisis densitométrico (Figura 1B) indicó que la proporción de ARNm de ATI a ARNm de GADPH se elevó significativamente con el tratamiento con losartán ($0,94 \pm 0,07$), restricción de sodio ($1,08 \pm$

Cuadro I. MAP y PRA en cuatro grupos de ratas

| | PAM mm Hg (N=13 ratas/grupo) | PRA ng/mL (N=6 ratas/grupo) |
|----------|---------------------------------|--------------------------------|
| NS | 113 \pm 4 | 34 \pm 2 |
| NS + DUP | 115 \pm 6 | 57 \pm 8* |
| LS | 121 \pm 3 | 46 \pm 4* |
| LS + DUP | 113 \pm 3 | 67 \pm 4** |

*PAM, presión arterial media; PRA, actividad de renina plasmática, NS, ratas tratadas con una dieta normal en sodio; DUP, losartán; LS, ratas tratadas con una dieta baja en sodio. Los valores son medias

s * $P < 0,05$ frente a

NS ** $P < 0,05$ verur LS.

0,05), o la combinación de los dos ($1,16 \pm 0,05$) comparado con la relación encontrada en los controles ($0,51 \pm 0,06$, $P < 0,05$). La figura 2 muestra diagramas de Scatchard de la unión de Ang II a tejidos renales de los cuatro grupos experimentales. Las constantes máximas de unión (B_{max}) y disociación (K_d) calculadas de cada grupo se resumen en la Tabla 3. No hay una diferencia significativa en las constantes de unión entre las preparaciones renales de los cuatro grupos (Tabla 3). Sin embargo, el tratamiento con losartán disminuyó el número total de receptores (fmol/mg de proteína) en presencia o ausencia de restricción de sal ($P < 0,05$). La restricción de sodio sola tendió a aumentar el número total de receptores, aunque la diferencia con el control no fue estadísticamente significativa.

La figura 3 muestra la densidad del receptor AT1 en los riñones de cuatro grupos de ratas medida en presencia de 1 nmol/l de 125I-(Sar, Ile) Ang II. Hubo una disminución significativa en los sitios de unión del receptor AT1 (1 AM losartán desplazable) en las ratas tratadas con losartán ($6,2 \pm 0,5$ fmol/mg de proteína, $N = 5$), y un aumento significativo en las ratas que recibieron una dieta baja en sodio ($29,7 \pm 1,6$ fmol/mg de proteína, $N = 5$) en comparación con los controles ($18,4 \pm 0,4$ fmol/mg de proteína, $N = 5$). El losartán ($15,4 \pm 1,6$ fmol/mg de proteína, $N = 5$) evitó el aumento de los sitios de unión del receptor AT1 inducido por la restricción de sodio.

Para eliminar la posibilidad de que el losartán previamente unido inhibía la unión de 1-(Sar, Ile) Ang II a los receptores AT1, homogeneizamos y resuspendimos los tejidos en 50 mmol de acetato de sodio (pH 5) para disociar el losartán. Descubrimos que, cuando el tejido se expuso a un lavado ligeramente ácido para eliminar cualquier ligando residual, la unión específica de 11-(Sar, Ile) Ang II en ratas tratadas con losartán (8,1 y 10,0 fmol/mg de proteína, $N = 2$) fue aún sustancialmente más bajo que el de las ratas alimentadas con una dieta normal de sodio (23,2 y 20,8 fmol/mg de proteína, $N = 2$), lo que indica que es poco probable que la reducción en la densidad del receptor AT1 resulte del losartán previamente unido.

Discusión

Recientemente hemos demostrado que la ingesta baja de sodio aumenta la expresión génica del receptor AT1A en el riñón (4). El estudio presentado aquí fue diseñado para probar la hipótesis de que la activación del receptor AT1 resultante de los aumentos de Ang II inducidos por el agotamiento de sodio conduce a un aumento en la densidad del receptor AT1 que, en consecuencia, modula el crecimiento renal. Encontramos que el bloqueo de la unión de Ang II a los receptores AT1 por losartán disminuye la masa renal, lo que confirma el informe anterior de que Ang II media el crecimiento renal normal a través de los receptores AT1 (8). Sorprendentemente, sin embargo, la masa renal no se vio alterada por la restricción de sodio, a pesar de que la baja ingesta de sodio aumenta tanto el ARNm de AT1 renal como la densidad del receptor, lo que sugiere que los aumentos en la masa renal por encima de un cierto nivel normal requieren la activación de múltiples factores.

Losartán a una dosis de 3 mg/kg/día redujo el crecimiento renal pero no somático. El crecimiento renal reducido en las ratas tratadas con losartán no parece estar causado por hipoperfusión tisular porque losartán no disminuyó la PAM en el presente estudio. Tufro-McReddie et al. han demostrado que aunque 27 mg/kg/día de losartán redujeron significativamente la PAM, la PAM aún se encontraba dentro del rango de presiones de perfusión renal en las que se puede lograr la autorregulación del flujo sanguíneo renal (8). Por lo tanto, ellos también

Tabla 2. Relación BW, KW, KW/BW, contenido de proteína y ADN renal y relación proteína/ADN en cuatro grupos de ratas

| | Rata | B/N (g) | Kilovolts (g) | KW/BW (x10) | ADN (mg/riñón) | Proteína (mg/riñón) | Proteína/ADN (mg/mg) |
|----------|------|----------------|---------------|----------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|
| NS | 13 | 264 ± 7 | 1.05 0.02 | 4.03 0.05 | 7.203 | 120 ± 5 | 16.7 0.4 |
| NS + DUP | 13 | 259 ± 5 | 0.98 0.02 | 3.78 0.04 | 6.0±0.3 | 99 ± 3^b | 16.6 0.7 |
| LS | 13 | 265 ± 5 | 1.08 ± 0.02 | 4.07 0.05 | 7.4 ± 0.4 | 124 ± 5 | 17.00.8 |
| LS + DUP | 13 | 262 ± 6 | 0.99 0.03 | 3.80 ± 0.03 | 5.8±0.3 | 94 ± 4^{b,c} | 16.7 1.1 |

*BW, peso corporal; KW, peso de riñón, KW/BW, peso de riñón a peso corporal; NS, ratas tratadas con una dieta normal en sodio; DUP, losartán. LS, ratas tratadas con una dieta baja en sodio. Los valores son medios st. N número de ratas.

^aP<0.05 ver NS.

^bP < 0.05 significa LS.

A

NS

NS+DUP

LS LS+DUP

12345 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19,30

TUMROS

GAPDH

B

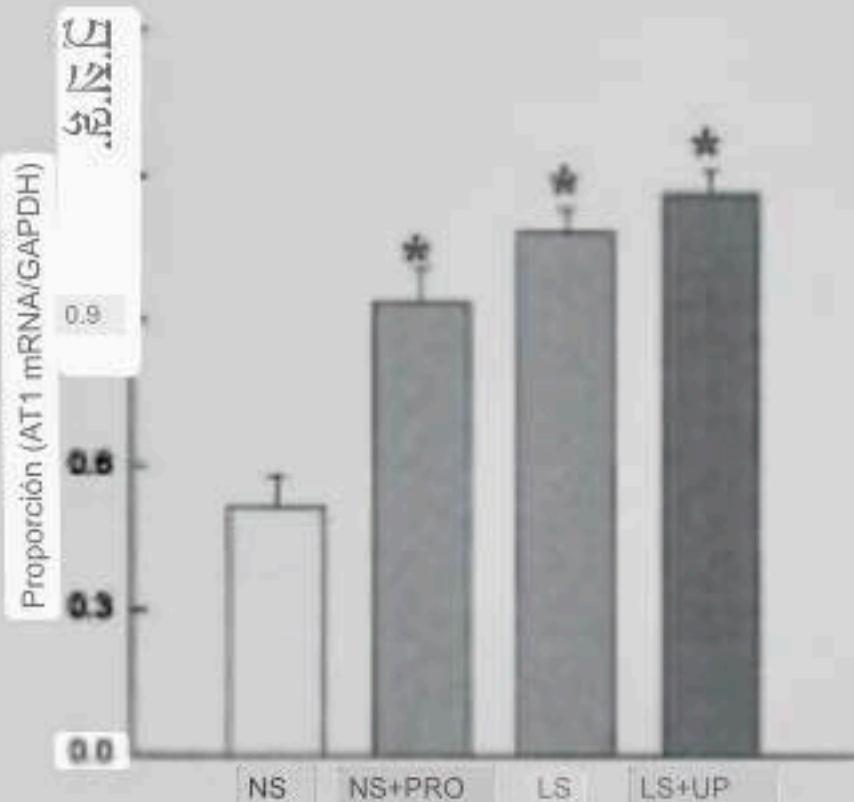


Figura 1. Northern blot utilizando 32 P-dCTP marcado AT1 cDNA (A, panel superior) para hibridar el ARN aislado de riñones de ratas tratadas con una dieta normal de sodio (NS, carril 1, 2, 3, 4, 5), NS + losartán (DUP, carril 6, 7, 8, 9, 10), dieta baja en sodio (LS, carril 11, 12, 13, 14, 15), LS + DUP (carril 16, 17, 18, 19, 20). Cada carril representa una rata (30 g de ARN renal total). Las transferencias se extrajeron y se rehibridaron con sondas de 32 ADNc de gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) marcadas con pdCTP (A. panel inferior). B es un análisis densitométrico de transferencia Northern en A corregido para GAPDH en cada blot. Los resultados representan la media \pm SE P < 0.05 versus NS.

sugirió que es poco probable que la hipoperfusión jugara un papel importante en la determinación del deterioro del crecimiento renal observado en ratas destetadas tratadas con losartán (8). Sus resultados, junto con nuestras observaciones, indican que Ang II estimula el crecimiento renal durante el desarrollo normal a través del receptor AT1. Descubrimos que tanto el contenido de ADN como el de proteína, pero no la proporción de proteína a ADN, eran más bajos en las ratas tratadas con losartán, lo que indica que el losartán reduce la proliferación celular sin afectar el tamaño celular. Estos resultados están de acuerdo con los informes de Tufro

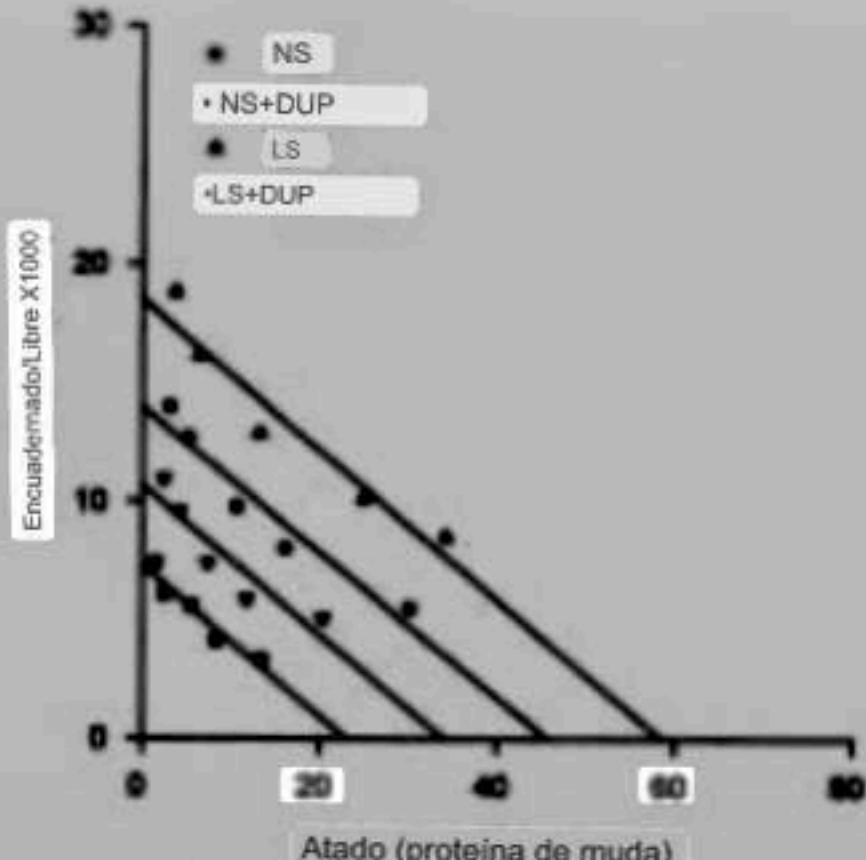


Figura 2. Gráfico de Scatchard de la unión de Ang II a los tejidos renales de ratas tratadas con dieta normal en sodio (NS, N= 4), NS losartán (DUP, N= 4), dieta baja en sodio (LS, N=4), LS+ DUP (N=3). Los resultados de la unión máxima (B_{max}) y las constantes de disociación (K_d) de cuatro grupos de ratas se resumen en la Tabla 3. Cada símbolo representa la media de la unión de Ang II de tres a cuatro animales en cada grupo a una concentración particular de Ang II.

Mc Reddie et al. demostrando que losartán disminuye el crecimiento hiperplástico en el riñón en desarrollo (8), así como con los de otros laboratorios demostrando que Ang II está involucrada en los procesos de crecimiento y que el crecimiento inducido por Ang II está mediado por el receptor AT1 (18-20).

Nuestro hallazgo de que losartán aumenta el ARNm de AT1, pero disminuye la densidad del receptor de AT1 es inesperado y merece un comentario. Esta observación sugiere que el tratamiento crónico con losartan induce una disociación entre la expresión de la proteína receptora AT1 y la expresión de su gen. Se desconoce el mecanismo por el cual losartán aumenta la expresión del ARNm de AT1. Se informó anteriormente que el ARNm del receptor AT1 en el riñón de rata se regula a la baja después de la coartación aórtica, lo que sugiere que los niveles altos de Ang II locales y/o circulantes modulan la expresión del gen del receptor AT1 mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (21). Es posible que el bloqueo de la unión de Ang II a su receptor por losartán elimine una señal de retroalimentación negativa y aumente la expresión de ARNm de AT1. Sin embargo, también se ha informado que la AT1 intrarrenal

Tabla 3. Cambios en la densidad del receptor de Ang II en respuesta a losartán y/o restricción de sodio

| | N | Bmax (fmol/mg proteína) | Kd (x10 ⁻⁷) |
|----------|---|----------------------------|----------------------------|
| NS | 4 | 45 ± 2 | 15:02 |
| DUP NS+ | 4 | 22:4 | 1,9 ± 0,2 |
| LS | 4 | 59 ± 5 ^a | 1,5 ± 0,2 |
| LS + DUP | 3 | 32 ± 6 ^b | 1,7 ± 0,3 |

^a Ang II, angiotensina II; Bmax, unión máxima calculada; Kd, constantes de disociación; NS, ratas tratadas con una dieta normal en sodio; DUP, losartán. LS, ratas tratadas con una dieta baja en sodio. Los valores son significativos. N número de ratas.

P < 0,05 frente a NS.

*P < 0,05 frente a NS + DUP.

^b P < 0,05 frente a LS.

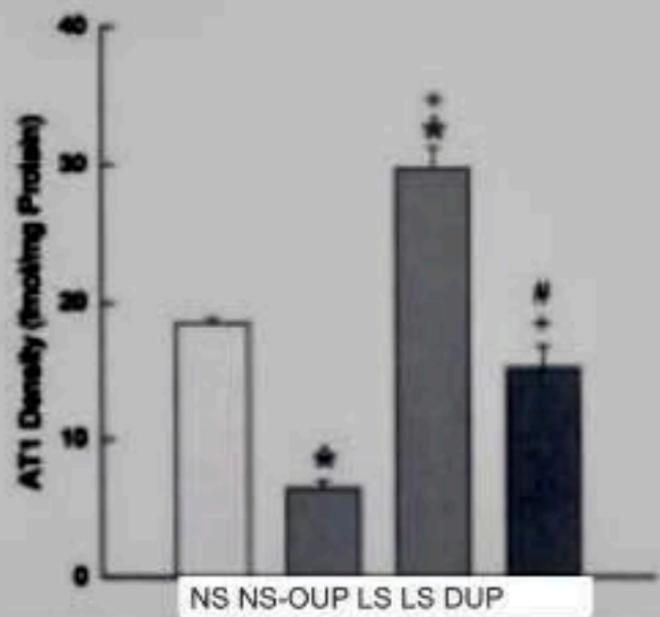


Figura 3. Gráfico de barras que muestra la densidad del receptor ATI en riñones de cuatro grupos de ratas medida en presencia de 1 nmol/L. 1-(Sar, *Be*) Ang II. Hay cinco ratas en cada grupo. NS, ratas tratadas con dieta normal en sodio, DUP, losartán; LS, ratas tratadas con dieta baja en sodio.

*P < 0,05 frente a NS. + P < 0,05 frente a NS + DUP. P < 0,05 frente a LS.

Los niveles de ARNm en ratas Sprague-Dawley no cambiaron después del tratamiento con losartán (27 mg/kg/día) durante 3 semanas (8). La inconsistencia podría ser el resultado de diferencias en la cepa de la rata estudiada, o la duración y la dosis de losartán administrada. En la actualidad, no tenemos información para distinguir entre estas posibilidades.

Aunque actualmente no está claro el mecanismo por el cual losartán disminuye la densidad del receptor ATI, se deben considerar varias posibilidades. Una es que el bloqueo del receptor renal ATI por parte de losartán puede interferir con los pasos intermedios, por ejemplo, eventos postranscripcionales, necesarios para transcribir el ARNm de ATI en proteína receptora funcional. Nuestro laboratorio, al igual que otros (22,23), ha demostrado la regulación de eventos postranscripcionales por agonistas, y puede contribuir a la regulación del receptor AT1 y su expresión génica en el riñón. Otro posible mecanismo por el cual losartan podría disminuir la unión del receptor AT1 es por la ocupación del receptor ATI. Esto no parece ser el caso

por dos razones: (1) el lavado ácido suave para eliminar el ligando previamente unido no alteró la disminución inducida por losartán en la unión de 1351-SI Ang II, y (2) no hubo una diferencia significativa en la afinidad de unión de 1251-SI Ang II en losartán riñones tratados frente a los de control, lo que ocurriría si un ligando competitivo se uniera a los receptores ATI.

De acuerdo con nuestro hallazgo anterior (4), la baja ingesta de sodio aumenta la expresión del ARNm del receptor AT1. De manera similar, el agotamiento de sodio aumenta la expresión del ARNm del receptor AT1 en la glándula suprarrenal (14,24). El mecanismo de esta regulación al alza no está claro. El aumento de PRA por depleción de sodio indica que el RAS circulante está activado. Por lo tanto, parece que los niveles elevados de Ang II también pueden modular la expresión del gen ATI mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Sin embargo, los niveles de ARNm de ATI en ratas alimentadas con una dieta baja en sodio también se elevan cuando losartán bloquea la unión de Ang II al receptor ATI, lo que indica que losartán tiene un efecto directo sobre la regulación de la expresión de ARNm de ATI o que existen otros mecanismos, p., efectos de la aldosterona u otras consecuencias del agotamiento del sodio. Estudios previos sobre la estructura genómica y la secuencia de la región promotora de ATI han demostrado que existen varios elementos sensibles a los glucocorticoides en la región reguladora 5' y explican la estimulación por la aldosterona (25,26). Es posible, por lo tanto, que la liberación de aldosterona inducida por una baja ingesta de sodio explique el aumento de la expresión de ARNm de ATI en el riñón. Este mecanismo queda por explorar.

Los cambios en la densidad del receptor ATI inducidos por la depleción de sodio son paralelos a los cambios en los niveles de ARNm de ATI, lo que sugiere que el aumento de los niveles de ARNm de ATI conduce a un aumento en sus productos de traducción: receptores ATI. En apoyo de esto, se ha demostrado que la densidad del receptor Ang II del túbulo proximal aumenta con la depleción de sodio y disminuye con la carga de sodio (27). Cuando a un animal se le da una dieta baja en sodio, el aumento de Ang II circulante o producido localmente se une a un mayor número de receptores para modular las funciones del túbulo proximal, lo que resulta en la retención de sodio. Está bien establecido que Ang II es un estimulador extremadamente potente del intercambio de Na-H⁺ y la reabsorción de bicarbonato en los primeros 51 segmentos del túbulo proximal (28-30). Los estudios de micropunción han demostrado que estos segmentos del túbulo proximal también contenían la mayor concentración del sitio de unión de Ang II (28,29).

Curiosamente, aunque la densidad del receptor AT1 en el riñón aumentó por la restricción de sodio, el peso del riñón, la relación peso del riñón/peso corporal y el contenido de ADN y proteína no se alteraron. Esto indica que la activación del SRA circulante y/o local no estimula el crecimiento renal. Este hallazgo intrigante nos ha llevado a proponer que el RAS desempeña funciones distintas en el desarrollo renal normal y las condiciones fisiológicas alteradas. Por ejemplo, se puede especular que un aumento en la masa renal por encima de un nivel normal necesita acciones sinérgicas de Ang II y otros factores, mientras que el desarrollo renal normal depende de Ang II.

En conclusión, hemos demostrado que el bloqueo de Ang II endógena por losartán da como resultado un retraso de la normal crecimiento renal. Aunque la restricción de sodio aumenta tanto la función renal ARNm de ATI y proteína receptora, masa renal no alterada por deplección de sodio. Estos resultados sugieren que Ang II modu-

retrasa el crecimiento renal durante el desarrollo normal a través del receptor ATI. Sin embargo, los aumentos de la masa renal por encima de los niveles normales requieren la activación de múltiples factores. La comprensión del papel de Ang II en la regulación del crecimiento del riñón puede proporcionar nueva información sobre la regulación de la presión arterial y la patogenia de la hipertensión y las enfermedades renales.

Expresiones de gratitud

Este estudio fue financiado en parte por los Institutos Nacionales de Salud Grant HL-52279 y una subvención de Merck Research Laboratories a la Dra. Donna H. Wang, el Dr. Donald J. DiPette recibió un premio de investigador establecido de la American Heart Association. Agradecemos al Dr. Richard D. Bukoski por su revisión crítica de este manuscrito ya Wilma Frye por sus habilidades secretariales expertas.

Referencias

1. Chansel D, Czekalski S, Pham P, Ardaillou R: Caracterización de los subtipos de receptores de angiotensina II en humanos fatales y adultos riñón. *Am J Physiol* 262: F326-F331, 1992
2. De Gaspero M, Whitebread S, Mele M, Motani AS, Whitcombe PJ, Ramjoue HP, Kamber B: Caracterización bioquímica de dos subtipos de receptores de angiotensina II en la rata. *J Cardiovasc Pharmacol* 16: \$31-\$35, 1990
3. Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M: Distribución de los subtipos de angiotensina II en riñón humano y de rata. *Am J Physiol* 262: F236-F240, 1992
4. Du Y, Yao A, Guo DF, Inagami T, Wang DH: Regulación diferencial de los subtipos de receptores de angiotensina II en riñón de rata por dieta baja en sodio. *Hipertensión* 25: 872-877, 1995
5. Tufro-McReddie A, Harrison JK, Everett AD, Gomez RA: Endogénesis de la expresión del gen del receptor de angiotensina II tipo 1 en el rata. *J Clin Invest* 90: 1-9, 1993
6. Wang DH, Prewitt RL: efecto longitudinal de captopril en la aorta desarrollo arteriolar en ratas normotensas. *Soy J Physiol* 260: H1956-H1965, 1991
7. Wang DH, Prewitt RL: Captopril reduce el crecimiento microvascular aórtico en ratas normotensas e hipertensas. *Hipertensión* 15: 68-77, 1990
8. Tufro-McReddie A, Johns DW, Geary KM, Dugli H, Everett AD, Chevalier RL, Carey RM, Gomez A: Angiotensina II tipo I receptor: Papel en el crecimiento renal, expresión génica durante el desarrollo normal. *Am J Physiol* 266: P911-918, 1994
9. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T: Mecanismos de fibrosis intersticial de tubuloína. *Riñón Int* 39: 550-556, 1991
10. Hayman JM, Martin J, Miller M: función renal, el número de glomérulos en el riñón humano. *Arch Intern Med* 64: 69, 1939
11. Baserga R: Medición de parámetros de crecimiento. En: *Crecimiento y división celular: un enfoque práctico*, Oxford, Universidad de Oxford Press, 1989, pp 1-16
12. Labarca C, Paigen K: Un procedimiento de ensayo de ADN simple, rápido y sensible. *Ann Biochem* 102: 344-352, 1980
13. Bradford MM: Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de unión de tinte de proteína. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976

14. Iwai N, Yamano S, Foot S, Konishi F, Bardhan S, Tibbetts C, Sasaki K, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T: Receptor de angiotensina II de rata: secuencia de ADNc y regulación del gen regulación Biochem Biophys Res Commun 177: 299-304, 1991 15.
- Chomczynski P, Sacchi N: Método de aislamiento de ARN en un solo paso mediante extracción con tiocianato-fenol-cloroformo de guanidinio ácido. Ann Biochem 162: 156-159, 1987
16. Speth RC, Bumpus FM, Husain A: Identificación de receptores de angiotensina II en el ovario de rata. Eur J Pharmacol 130: 351-352, 1986
17. Munson PJ, Rodbard D: LIGAND: un enfoque computarizado versátil para la caracterización del sistema de unión de ligandos. Ann Bioquímica 107: 220-239, 1980
18. Chiu AT, Roscoe DE, McCall DE, Timmermans PBWM: Los receptores de angiotensina II-1 median las respuestas vasoconstrictoras e hipertróficas en las células del músculo liso aórtico de rata. Receptor 1: 133-140, 1991
19. Fogo A, Yoshida Y, Yared A, Ichikawa I: Importancia de la acción angiogénica de la angiotensina II en el crecimiento glomerular de los riñones en maduración. Riñón Int 38: 1068-1074, 1990
20. Ray PE, Aguilera G, Kopp JB, Horikoshi S, Klotman PE: Proliferación mediada por un receptor de giotensina II de células mesangiales fetales humanas cultivadas. Kidney Int 40: 764-771, 1991
21. Tufro-McReddie A, Chevalier RL, Everett AD, Gomez RA: La presión de perfusión disminuida modula la renina y la Ang II tipo I. Expresión del gen del receptor en riñón de rata. Soc J Physiol 264: R696 - R702, 1993
22. Platt T: Terminación de la transcripción, la regulación de la expresión génica. Annu Rev Biochem 55: 339-372, 1986
23. Wang DH, Prewitt RL, Beebe SJ: Regulación de PDGF A: A posible mecanismo para el crecimiento vascular inducido por angiotensina II. Soc J Physiol 269: H356-H364, 1995
24. Ray PE, Castren E, Ruley EJ, Saavedra JM: Diferentes efectos de deleción de sodio o cloruro en los receptores de angiotensina II en ratas. Am J Physiol 258: R1008-R1015, 1990 25.
- Makita N, Fukunaga M, Iwai N: Dos vías distintas en la regulación negativa del gen del receptor de angiotensina II tipo 1 en células de músculo liso aórtico de rata [Resumen]. Circulación 86 (Suplemento 1): 90, 1992
26. Takeuchi K, Alexander W, Nakamura Y, Tsujino T, Murphy TJ: Estructura molecular y función transcripcional del gen del receptor de angiotensina AT1A vascular de rata. Circ Res. 73: 612-621, 1993
27. Douglas JG: subtipos de receptores de angiotensina de la corteza renal. Am J Physiol 253: F1-F7, 1987
28. Cogan MG: Regulación y control de la reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal. Semin Nephrol 10: 115-121, 1990 29.
- Liu FY, Cogan MG: Angiotensina II estimulación de iones de hidrógeno secreción en el túbulo proximal temprano de rata. Modos de acción, mecanismos, cinética. J Clin Invest 82: 601-607, 1983 30.
- Schuster VL, Kokko JP, Jacobson HR: La angiotensina II estimula directamente el transporte de sodio en los túbulos contorneados proximales de conejo. J Clin Invest 73: 507-515, 1984