



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II EN HEPATOCITOS DE CUYO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(B I O Q U I M I C A)

P R E S E N T A
MINERVA MARTINEZ ALFARO

ASESOR: DR. ADOLFO J. GARCIA SAINZ



MEXICO, D. F.



1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular
de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. J. Adolfo García Sáinz,
con apoyo por parte del CONACYT.**

Minerva Martínez Alfaro fue becario del CONACYT,

Registro No. 86455

Quisiera agradecer en forma muy especial al Dr Adolfo J. García Sainz por su apoyo aún en los momentos más difíciles y por sus valiosos conocimientos.

A mi compañera y gran amiga Claudia González por su increíble amistad y paciencia para enseñarme al igual que a Tere Romero y Marina Macías. A todos mis compañeros del laboratorio: Pati, Rocío, Artemio, Agustín, Gloria, José y Alberto.

A mi hijo Alejandro por sus travesuras.

A mi hija Eugenia por estar conmigo durante la realización del trabajo.

A René por ser mi compañero.

A mis padres por todo lo que hicieron por mí.

A mi hijo Alejandro por sus travesuras.

A mi hija Eugenia por estar conmigo durante la realización del trabajo.

A René por ser mi compañero.

A mis padres por todo lo que hicieron por mí.

ÍNDICE

Resumen	2
 I. INTRODUCCIÓN	
-Sistema renina-angiotensina	4
-Biología molecular de receptores para angiotensina II	6
-Antagonistas para los receptores de angiotensina II	10
-Aplicaciones clínicas.....	14
-Sistemas de transducción acoplados a los receptores de angiotensina II	16
-Distribución de los tipos de receptores y su importancia fisiológica.....	19
-Justificación del trabajo	20
 II. OBJETIVOS.....	22
 III. MATERIAL Y MÉTODOS	24
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
 V. CONCLUSIONES.....	41
 VI. PERSPECTIVAS	43
 VII. BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

La angiotensina II participa en el metabolismo hepático a través de receptores acoplados a varios sistemas de transducción por medio de proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina, denominadas proteínas G. La diversidad de acciones de la angiotensina II sugirió la existencia de más de un tipo de receptor, lo que fue confirmado con el desarrollo de antagonistas no peptídicos estables, que permitieron reconocer dos tipos farmacológicos: El tipo AT₁, sensible a DUP 753 (Losartán) y al tipo AT₂, sensible a PD123177. En algunas especies se han clonado dos subtipos del tipo AT₁ con alta identidad en sus regiones codificantes (96%), lo que impide diferenciarlos farmacológicamente.

En este trabajo se muestra que los hepatocitos de cuyo presentan sitios que interactúan con el SR 47436 (Irbesartán) y el DUP 753 (Losartán), que corresponden al receptor AT₁. Al activar a este tipo de receptor se induce un aumento de calcio citosólico que a su vez activa a la *fosforilasa a*, en un proceso asociado al recambio de fosfoinosítidos.

Estudios de asociación de ligandos usando [¹²⁵I]Saralasin mostraron una densidad moderada de sitios con una concentración aproximada de (≈650 fmol/mg proteína) con las características esperadas para los receptores AT₁.

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, previa transcripción inversa del ARN (RT-PCR), se detectó una señal que hibrida con la sonda del receptor AT_{1b} de rata, por lo que se puede afirmar que en hepatocitos de cuyo se expresa el receptor de angiotensina II tipo AT₁, y su activación produce aumento de calcio intracelular y de trifosfato de inositol (IP₃).

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

La angiotensina II (ang II) es una hormona peptídica que participa en el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Este sistema regula la dinámica del agua y los electrolitos de algunos animales. La angiotensina II incrementa la presión arterial, facilita la liberación de norepinefrina y disminuye su captura, incrementa la fuerza de contracción del corazón[1, 2] y es un potente mitógeno en las células del músculo cardíaco[3]. En el riñón contrae el músculo liso en las arteriolas eferentes, lo que disminuye la filtración glomerular, aumentando la retención de líquidos. Por otro lado, también aumenta la secreción de vasopresina por la hipófisis y de la hormona antidiurética de la neurohipófisis; y además estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal[4].

Vía de Síntesis

La angiotensina II se sintetiza a partir del angiotensinógeno, una α -globulina sintetizada en el hígado, sobre la cual actúa la proteasa renina (sintetizada en el aparato yuxtaglomerular del riñón). Como consecuencia de esta acción se libera entonces un decapeptido, la angiotensina I, que a su vez es hidrolizada por la enzima convertidora de angiotensina a un octapéptido, la angiotensina II. Posteriormente, ésta sufre una hidrólisis por una aminopeptidasa y se convierte en el heptapéptido angiotensina III[5]. Dicha secuencia de reacciones se esquematiza en la figura 1.

Acciones de la angiotensina II

Las acciones de la angiotensina II están mediadas por receptores específicos que se localizan principalmente en la membrana plasmática y que son capaces de activar diversos sistemas de transducción a través de proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina, denominadas proteínas G.

Se conoce que la angiotensina II (AII) es capaz de estimular el recambio de fosoinositidos y la movilización de calcio intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C. Provoca también la apertura de canales de calcio, inhibe la actividad

de la adenilato ciclasa. estimula a la fosfolipasa A (provocando un aumento en la síntesis de prostaglandinas) y a la fosfolipasa D[6].

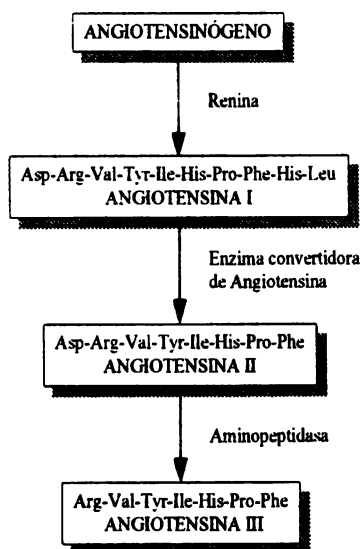


Fig. 1.- Esquema de la síntesis y degradación de angiotensinas

En los primeros estudios de este sistema se había observado que tanto en hígado, como en músculo liso de vasos sanguíneos y en células de la pituitaria, la angiotensina II provocaba la inhibición de la adenilato-ciclasa y estimulaba el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio. También se encontró que en el hígado y en la glándula pituitaria la toxina pertussis bloqueaba la habilidad de la angiotensina II de inhibir a la adenilato ciclasa, sin afectar el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio[7]. Sin embargo en células mesangiales de riñón de rata se observó que la toxina pertussis bloqueaba el recambio de fosfoinosítidos, lo que sugirió la existencia de diferentes tipos de receptores. Por otra parte, en el hígado se observó que el agente reductor DTT bloqueaba el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio, sin alterar la inhibición de la adenilato ciclasa[8]. El agente reductor DTT disminuía también el número de sitios de alta

afinidad, pero no los sitios de baja afinidad. Estos datos dieron más indicios de la existencia de una heterogeneidad en los receptores de angiotensina II[9], la que sólo pudo ser demostrada hasta el desarrollo de antagonistas no peptídicos estables (desarrollados en la presente década[10]) y confirmada con la clonación de estos receptores[11].

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA II

Actualmente, la biología molecular nos ha permitido conocer la secuencia de aminoácidos de proteínas que no se han aislado (por la dificultad técnica que esto implica), y con ayuda de programas de predicción de estructuras de proteínas, inferir de su secuencia, la estructura secundaria y terciaria.

Por medio de la biología molecular se estudia como se regula la expresión de los genes y se hace mutagénesis dirigida para establecer qué función tienen los diferentes aminoácidos de la molécula.

El gen para el receptor de angiotensina II AT₁ se clonó simultáneamente de músculo liso vascular de rata y de la capa glomerulosa de la corteza adrenal de bovino[11, 12]. Este gen codifica para una proteína de 359 aminoácidos, con un peso de 41 kDa y que posee 7 regiones transmembranales (característicos de receptores acoplados a proteína G). Cuatro residuos de cisteína en las regiones extracelulares podrían estar formando puentes disulfuro para estabilizar la proteína.

Cuando el gen es transfectado en células COS, se expresa una proteína que responde a la estimulación con angiotensina II, provocando movilización del calcio, acumulación de fosfatos de inositol y activación de la fosfolipasa C. Esta proteína puede unirse además a angiotensina marcada con radiactividad.

En estudios posteriores, el grupo de Inagami y cols.[13] clonaron, a partir de riñón de ratas hipertensas, un receptor que difiere en 18 aminoácidos intracelulares del producto de clonación en células de bovino. Poco después, al clonar el receptor de células de la capa glomerulosa de la suprarrenal de rata, se pudo establecer que estas diferencias se debían a la existencia de 2 subtipos distintos del receptor tipo

AT₁ en la rata y el ratón y que sus diferencias más notables se encontraban en la región reguladora del gen. Además, su distribución en tejidos es distinta: En la glándula suprarrenal y en la adenohipófisis predomina el subtipo b[14, 15], mientras que en los demás tejidos predomina el subtipo a.

Estos 2 genes se localizan en diferentes cromosomas: El subtipo b en el cromosoma 2 y el subtipo a en el cromosoma 17[16]. La organización genómica indica que ambos genes poseen 4 exones y 3 intrones[17] y que su región promotora contiene elementos de respuesta a glucocorticoides y un elemento de respuesta a AMP cíclico.

Por otra parte, también se ha clonado el receptor para AT₁ de humano[15] y se ha encontrado que el gen se localiza en el cromosoma 2. El promotor para este gen también se ha caracterizado y tiene sitios modulados por PKC y AMP cíclico[18]. El gen en su totalidad está constituido por 60 Kb formado también por 4 exones y 3 intrones. El estudio de este gen adquiere gran relevancia ya que nos permitirá conocer como se regula su expresión en estado normal y en estados en los que existan alteraciones del sistema renina-angiotensina-aldosterona, como en la hipertensión, los síndromes adrenales y la insuficiencia renal.

Se ha hecho mutagénesis dirigida para conocer más acerca de la función de los diferentes aminoácidos, de los dominios estructurales y funcionales del receptor. Walter y cols.[19] establecieron que el extremo carboxilo-terminal es esencial para la internalización del receptor causada por angiotensina II, ya que observaron que la expresión en células COS de un receptor truncado desde leucina 314 hasta el extremo carboxílico, sólo interfiere con dicha internalización; puesto que la proteína clonada es capaz de adoptar la conformación requerida para unir angiotensina II con alta afinidad. Además, permanece como un receptor funcional que activa señales de transducción (aumento de calcio intracelular y activación de MAP cinasas). Lazlo y cols.[20] demostraron que la inhibición de la internalización estaba asociada a la omisión de secuencias ricas en treonina, leucina y serina (sobre todo serina-335, treonina-336 y leucina-337, ubicados en la misma región).

La mutagénesis dirigida también se ha utilizado para establecer qué aminoácidos del tercer segmento transmembranal están involucrados en la unión distinta entre ligandos peptídicos y no peptídicos[21]. En este estudio se estableció que la mutación de serina-105 por alanina suprime completamente la unión de ligandos peptídicos; mientras que la mutación de asparagina-111 no cambia mucho las afinidades de estos ligandos, pero reduce drásticamente las afinidades de antagonistas no peptídicos. Esto sugiere que la forma de unión de los ligandos peptídicos y no peptídicos es distinta. En otro estudio de mutagénesis dirigida[22] se llegó a la conclusión que la angiotensina II se une al receptor de rata tipo AT₁ a en el sexto segmento transmembranal y que la angiotensina II sólo penetra una tercera parte de la membrana para unirse a su receptor.

También se ha trabajado sobre la región reguladora del gen, sobre todo en el receptor AT₁ de rata, del que se han encontrado 2 isoformas con regiones reguladoras distintas y diferente distribución en tejidos: El receptor AT_{1a} posee una región reguladora negativa entre las regiones -489 y -331, que se encuentra unida a una proteína de 53 kD en algunas células (como en células PC12 y células de cerebro de rata) que expresan bajos niveles de este subtipo, pero expresan mucho más el subtipo AT_{1b}. Sin embargo, en células de la adenohipófisis y de la glándula suprarrenal, que expresan predominantemente el subtipo b, no se encontró esta proteína, lo que sugiere que en estos tejidos la expresión del receptor depende de otro mecanismo[23].

El receptor para angiotensina II del tipo AT₂ se ha clonado de una biblioteca de la placenta humana y de otra biblioteca genómica de pulmón de adulto[24, 25]. Su secuencia de aminoácidos esta formada por 363 aminoácidos que corresponden a una proteína de aproximadamente 41 KDa. El análisis de hidropatía corresponde al de una proteína de 7 regiones transmembranales con 92% de identidad con el de la rata y el de ratón, y con varios residuos de serina y treonina en la tercera región transmembranal. Su organización genómica sugiere[26] que está compuesto de 3 exones, siendo los 2 primeros los que codifican regiones no traducibles. En el tercer

exón se encuentra todo el marco de lectura completa del receptor sin intrones. La región promotora contiene secuencias que unen proteína de interferón (ICSBP), sitios de proteína de unión específica de hepatocitos (H-APF-1), elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE) y un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). Sin embargo, aún no se ha investigado el papel de estas sustancias en la regulación del gen.

Este receptor está presente de manera muy importante en tejidos fetales; en el adulto está presente en núcleos cerebrales, médula adrenal y células granulosas del ovario, así como en células PC12W (que es una línea derivada de un feocromocitoma de rata y que expresa constitutivamente este receptor). En estas últimas se ha demostrado que los factores de crecimiento suprimen la expresión del receptor[27].

Se ha realizado la interrupción del gen de angiotensina II tipo AT_2 en ratones por dos grupos de investigadores con distintos resultados, aunque encontraron en común que los ratones mutados mostraron cambios en la conducta, presentando una disminución de la actividad física y de la ingesta de agua después de ayuno de agua prolongado. Uno de los grupos[28] no detectó cambios en la presión arterial basal, mientras que el otro grupo[29] encontró un incremento en la presión arterial basal y en la sensibilidad a la acción presora de la angiotensina II, por lo que se piensa que el receptor tipo AT_2 modula los efectos del receptor tipo AT_1 . Estos estudios deben interpretarse cuidadosamente, porque probablemente existan factores que no hayan sido controlados de manera adecuada (como los antecedentes genéticos de estos ratones, por ejemplo, o los cambios adaptativos inevitables en este tipo de estudios).

Estos receptores se expresan en estados patológicos como la hiperplasia de la neoíntima, después del daño vascular, el infarto al miocardio, la hipertrofia vascular y heridas quirúrgicas. Se ha asociado a segundos mensajeros como el GMP cíclico, y a una fosfatasa de fosfotirosinas, pero aún no se conoce con precisión su papel.

ANTAGONISTAS PARA LOS RECEPTORES DE LA ANGIOTENSINA II

Como la hormona activa del sistema renina-angiotensina es la angiotensina II, varios grupos de investigadores han trabajado en las últimas décadas en el desarrollo de antagonistas específicos de esta hormona, para el tratamiento de la hipertensión. En 1971, el grupo de Pals[30] reportó a la saralasina (fig. 2) como un potente antagonista; sin embargo, la droga no podía administrarse oralmente, era de corta duración, y tenía actividad de agonista parcial.



Fig. 2.- Esquema de la Saralasina (Sar)

Los primeros antagonistas que se desarrollaron fueron de naturaleza peptídica, con los que se llevaron a cabo estudios que permitieron profundizar sobre la relación estructura-actividad, determinando los grupos importantes para la actividad biológica[31].

En estos primeros estudios se encontró que el extremo carboxilo libre es el que interactúa con el receptor, ya que los ésteres y alcoholes de la angiotensina II con modificaciones en su extremo carboxilo-terminal tiene una afinidad por el receptor 100 veces menor al de la angiotensina II. Por ejemplo, el CGP 37534 (fig. 3), que es un dímero de Sar¹ Ile⁸-Ang II, se une 100 veces menos que la ang II.



Fig. 3.- Representación esquemática del dímero CGP 37534.

Sin embargo, los análogos que tiene el extremo carboxilo terminal truncado, son antagonistas competitivos del receptor, como el Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-NH₂, aunque de baja afinidad. Otra modificación importante es el reemplazo de la phe⁸ por

grupos que incrementen el volumen en esta parte de la molécula como el (2,3,4,5,6 Br₅) phe⁸-ang II. que tiene una acción más prolongada debido a la lenta disociación del receptor. Los compuestos análogos de angiotensina II, truncados por el extremo amino, son potentes antagonistas sin actividad agonista, lo que apoya el concepto de que el extremo carboxilo es el que se une al receptor. También se ha reportado que el residuo de histidina es esencial para el reconocimiento del receptor y que la presencia del anillo aromático de la fenilalanina y del grupo hidroxilo de la tirosina se requieren para su actividad agonista. Los otros grupos parecen tener un papel estructural menor, porque su omisión no inactiva a la molécula.

Aunado a la identificación y localización de los aminoácidos importantes para su actividad, se ha estudiado por resonancia magnética nuclear la conformación espacial de la angiotensina II en medios no acuosos. Los estudios han demostrado que los 3 anillos aromáticos de la angiotensina (fenilalanina, histidina y tirosina) se encuentran agrupados (fig. 4). Además, otros estudios espectroscópicos han demostrado que el anillo imidazólico de la histidina puede captar al protón de la tirosina, dando como resultado la formación del anión tirosinato. Los cálculos de minimización de energía han mostrado que este proceso de formación del anión tirosinato es facilitado por la intervención del carboxilato c-terminal, debido a que realiza una dispersión de carga sobre el anillo imidazólico. Toda esta información es esencial para sintetizar drogas que funcionen como antagonistas específicos, que puedan ser ingeridos por vía oral y que lleguen a los sitios de acción con una conformación biológicamente activa[32].

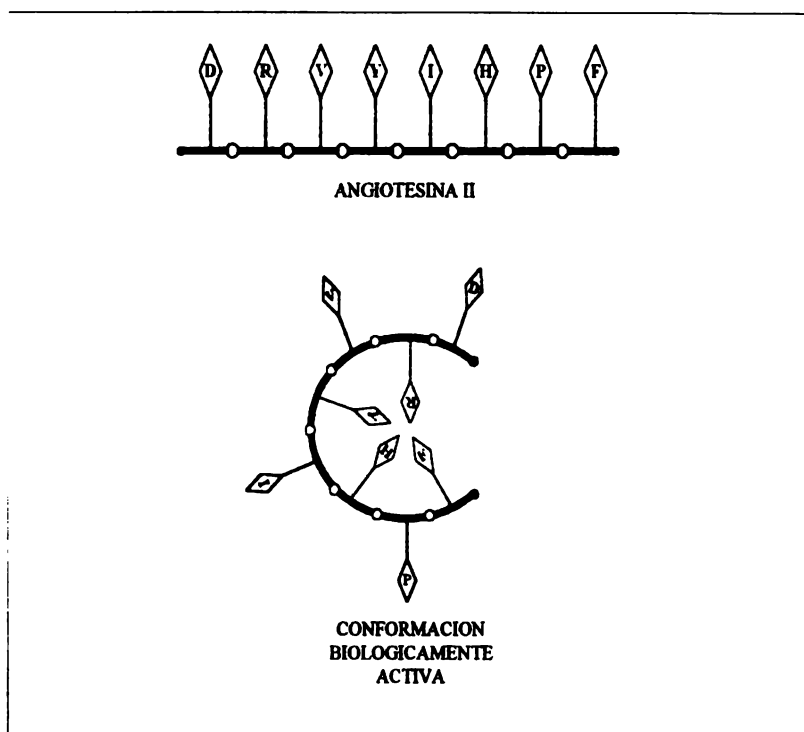


Fig. 4.- Esquema de la angiotensina II y su conformación biológicamente activa, determinada por estudios de RMN.

Varios grupos comenzaron la síntesis de antagonistas no peptídicos. En 1982 Furukawa[33], del grupo Takeda, reporta varios compuestos que inhiben la contracción de la aorta provocada por la angiotensina II. El grupo de la compañía Du Pont estudió dos compuestos de este grupo, el S-8307 y el S-8308, porque demostraron ser muy específicos para bloquear al receptor de angiotensina II, sin actividad agonista, pero muy poco efecto antihipertensivo. Con base en estos compuestos, el grupo de DuPont desarrolló un antagonista potente, selectivo, activo por vía oral y de larga duración.

Los primeros antagonistas no peptídicos y potentes que se desarrollaron se basaron en la conformación de baja energía de la angiotensina II y la alinearon a los compuestos bencilimidazólicos del grupo Takeda. El grupo de DuPont alineó el grupo

carboxilo terminal de la angiotensina II con el grupo carboxilo de su imidazol; sobrepuso el anillo del imidazol con el residuo 6 His de la angiotensina II. la cadena lateral de butilo la situó en el lugar del residuo de isoleucina de la angiotensina II y el grupo bencilo lo dirigió hacia el amino terminal. Como la angiotensina II tiene 2 grupos ácidos cerca de su extremo amino (uno del Asp¹ y otro de la Tyr⁴), el grupo bencilo fue acoplado a un carboxilo en posición "para", lo que originó un compuesto 10 veces más afín que el del grupo Takeda. Posteriormente se hicieron más extensiones al extremo amino con análogos del ácido ftálico, para finalmente introducir un grupo bifenilo, sustituido con un grupo carboxilo. Esto dió origen al compuesto EXP7711, que podía ser administrado por vía oral[31].

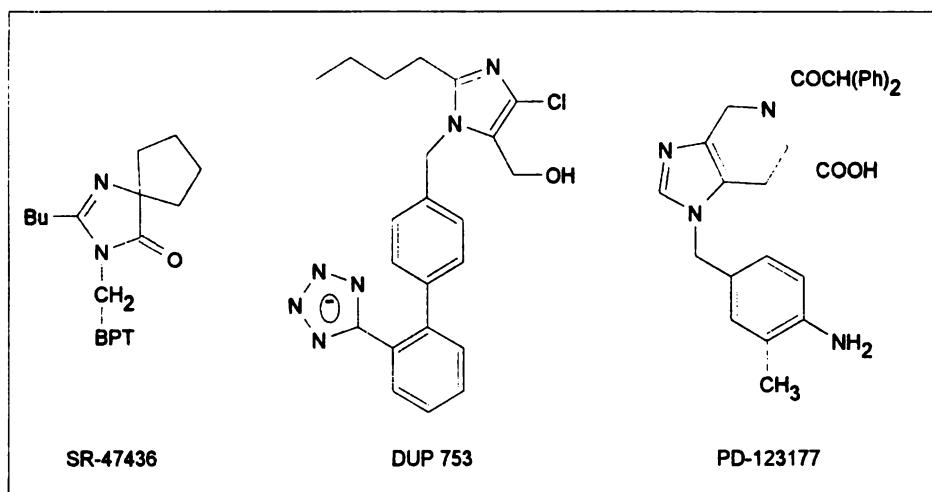


Fig. 5.- Estructura química de los antagonistas utilizados en el presente estudio

La síntesis de antagonistas estables de angiotensina II y la técnica de radioligandos permitió que se reconociera una heterogeneidad farmacológica en la población de receptores de la angiotensina II. Esta heterogeneidad había sido sugerida con anterioridad, ya que los receptores se acoplaban a diferentes sistemas de transducción en las células. Esto se confirmó con la síntesis del Dup 753, que sólo se une al 70% de la población de receptores en la glándula adrenal, y con la síntesis

del PD 123177, que se une a la población restante[34]. Las principales características de los receptores se presentan en la tabla 1.

CARACTERÍSTICAS DE LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA

CARACTERÍSTICAS	AT ₁	AT ₂
Orden de afinidad	Saralasin > ANGII > ANG III >> ANG I	ANG III ≥ ANG II ≥ Saralasin >> ANG I
Antagonistas selectivos	Losartán, EXP3174, Dup 532, L-158	PD123177, PD123319, CGP42112a
Sensibilidad a agentes reductores de SH	Si	No
Señales de transducción	Ca ²⁺ , IP ₃ , adenilato ciclase	GMP _c

TABLA 1

APLICACIONES CLÍNICAS

Los antagonistas de angiotensina II han tenido aplicación clínica en el tratamiento de la hipertensión. Anteriormente se había sintetizado un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (captopril), que había demostrado tener efectos favorables en pacientes con congestión cardíaca, además de que no tenía contraindicación en pacientes diabéticos. Su uso se restringió porque en un 10% de los casos se presentó erupción cutánea con o sin fiebre, sentido alterado del gusto, proteinuria y en algunos casos alteraciones renales[35]. Los efectos secundarios de esta droga se deben probablemente a que la enzima convertidora de angiotensina procesa otros péptidos, como la bradicinina, que es inactivada también por esta enzima. Es por esto que el uso del captopril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) potencia el efecto vasodilatador de la bradicinina; de aquí que el uso de antagonistas específicos de la angiotensina II podría ser benéfica para la terapéutica y nos permitiría conocer mucho más de la acción específica de la angiotensina II.

El losartán (Dup 753) se ha administrado en humanos sanos y una dosis diaria de 40 mg produce una disminución del 70% de la presión media con respecto al grupo de pacientes a los que se les había administrado un placebo.

Sin embargo, en estos pacientes no se pudo bloquear completamente el aumento de la presión en respuesta a la administración de angiotensina II exógena.

Esto último resulta muy interesante, porque existe la posibilidad de que algunos receptores de angiotensina II que no sean ocupados por losartán, regulen la presión arterial y sean sensibles a la angiotensina II. La posibilidad de que la droga tenga un efecto de corto tiempo es muy poco probable, porque el efecto sobre la presión arterial dura casi 24 horas.

La terapéutica con esta droga también aumentó los niveles de renina y angiotensina II endógena, por lo que es importante estudiar también la otra población de receptores insensibles a losartán, que podrían ser activados y tener efectos adversos. Aunque la terapéutica con este tipo de drogas es muy reciente para demostrar efectos secundarios de la administración crónica, hasta el momento únicamente se ha demostrado que el losartán aumenta la excreción de ácido úrico en los pacientes.

SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN ACOPLADOS A LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II

Como se mencionó anteriormente, el receptor para angiotensina II pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Las proteínas G actúan como un punto intermedio entre los receptores que reciben las señales del medio externo y los sistemas efectores de las células. Las proteínas G están formadas por 3 subunidades: α , β , y γ .

La unión del receptor activado a la proteína G induce cambios conformacionales que promueven el intercambio de GDP unido a la subunidad α por GTP; este cambio trae como consecuencia la liberación de las subunidades $\beta\gamma$. La subunidad α unida al GTP interactúa con múltiples sistemas efectores. Con base en su secuencia de aminoácidos se han clasificado en 4 clases: G_s , G_q , G_{12} y G_i . Las subunidades $\beta\gamma$ actúan como reguladores de la subunidad α y tienen acciones propias. El receptor de angiotensina II se acopla a diferentes sistemas de transducción, como se indica a continuación, a través de distintas clases de proteínas G:

Fosfolipasa C

El receptor de angiotensina II activa la PLC β a través de una proteína G_q insensible a la toxina pertussis. En 1985, Charest y cols.[36] demostraron que en hepatocitos de rata la angiotensina II estimula la formación de inositol trifosfato, y que este estímulo se relacionaba con el incremento de la actividad de la fosforilasa a (enzima sensible a la activación por calcio) sin requerir calcio extracelular en la fase inicial del estímulo. En 1987 Johnson y Garrison[37] observaron, en el mismo sistema, que esta estimulación era insensible al tratamiento con toxina pertussis. En rebanadas de piel de rata también se ha demostrado este efecto[38], así como en las células de la zona glomerulosa adrenal[39]. La activación de la fosfolipasa C resulta en la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 difosfato de la membrana plasmática con la cual se generan 2 segundos mensajeros: inositol 1,4-5 trifosfato y diacilglicerol. El

inositol trifosfato promueve la liberación de calcio del retículo endoplásmico. La identificación del receptor AT_1 en hepatocitos de rata y su asociación con este sistema de transducción se realizaron en el laboratorio donde se desarrolló la presente tesis[49].

Adenilato Ciclasa

La enzima adenilato ciclasa se encuentra unida a la membrana plasmática de las células y lleva a cabo la conversión del ATP en AMP cíclico y pirofosfato en presencia de magnesio. Este AMP cíclico actúa como segundo mensajero que en el hígado inhibe la glucogénesis y estimula la glucogenólisis y la liberación de glucosa. Se ha encontrado que en hepatocitos de rata, la angiotensina II inhibe la estimulación de la adenilato ciclasa producida por el glucagon[40].

Fosfolipasa D

La activación de la fosfolipasa D por angiotensina II, puede ser a través de una proteína G o por la proteína cinasa C. Esta última proteína es activada por el diacilglicerol. La fosfolipasa D hidroliza a la fosfatidilcolina, un fosfolípido de la membrana plasmática, lo que libera colina y ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico se convierte en diacilglicerol por una fosfatasa y esta reacción promueve la acumulación de diacilglicerol, que activa a la proteína cinasa C[41] .

Fosfolipasa A_2

La angiotensina II estimula a la fosfolipasa A_2 , la cual hidroliza la unión éster en la posición 2 del glicerol. El ácido en esta posición es frecuentemente el araquidónico, que es metabolizado por la sintetasa de prostaglandinas. Esta enzima cicla al ácido entre los átomos 8 y 12 para formar lo que será el esqueleto principal de las prostaglandinas en músculo liso vascular y en células mesangiales[42].

Canales de Calcio

La angiotensina II es capaz de estimular la entrada de calcio del medio externo a través de canales de calcio en células adrenocorticales. Se ha observado que esto ocurre a través de una proteína G sensible a la toxina pertussis. En músculo liso vascular este acoplamiento parece involucrar el mismo tipo de proteína G [56].

Canales de Potasio

Se ha reportado que la angiotensina II inhibe la entrada de potasio en los canales de capilares cerebrales de puerco[43], y también en células de la glomerulosa adrenal de rata, bovino y humano[44].

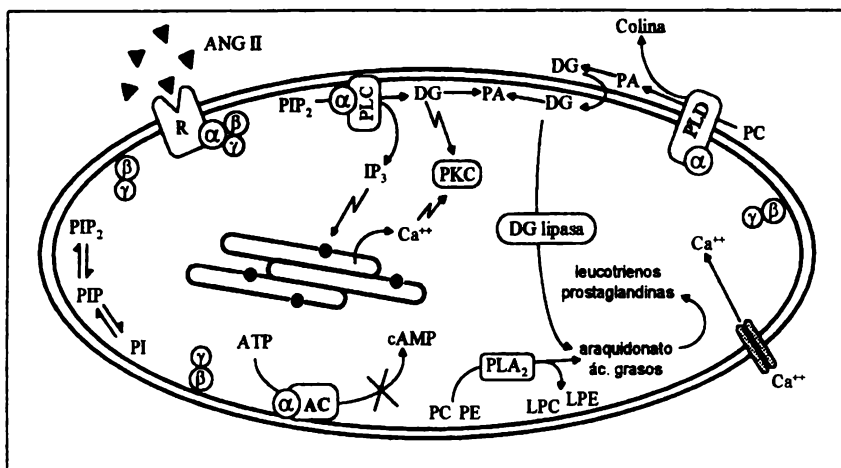


Fig. 6.- Esquema del acoplamiento del receptor de Ang II a los sistemas de transducción

DISTRIBUCIÓN DE LOS TIPOS DE RECEPTORES Y SU IMPORTANCIA FISIOLÓGICA

Como se puede deducir de lo antes dicho y de la información resumida en la tabla 2, la caracterización de este receptor se ha hecho en diferentes órganos y en diferentes especies. y los receptores han sido clonados también de varias especies.

RECEPTORES AT₁ Y AT₂ EN DIFERENTES TEJIDOS

TEJIDO	AT ₁	AT ₂
RATA		
corteza suprarrenal, útero, cerebro, aorta, corteza de riñón	+	+
médula suprarrenal	-	+
corazón, hígado, pulmón	+	-
CONEJO		
corteza suprarrenal, riñón, corazón	+	+
aorta, cerebro	+	-
médula suprarrenal	-	-
HUMANO		
corteza suprarrenal, útero, arteria renal	+	+
músculo liso de arteria renal	+	-
MONO		
aorta, corteza de riñón	+	+
corteza suprarrenal	+	-

TABLA 2

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Actualmente se desconoce si existen características específicas de los receptores al expresarse en diferentes órganos dentro de la misma especie, o si existen diferencias de un mismo receptor en un mismo órgano al expresarse en diferentes especies.

Por otro lado, los estudios fisiológicos y farmacológicos que se realizan para clasificar a un receptor pueden ayudar a entender su fisiología en el organismo en donde se estudia. En esta tesis se estudia la caracterización del receptor de angiotensina II expresado en los hepatocitos de cuyo.

Este estudio contribuirá a profundizar en el conocimiento de la distribución de los receptores de angiotensina II en distintos órganos y distintas especies y al conocimiento de la fisiología hepática del cuyo, especie que no tiene hasta la fecha una clasificación taxonómica bien determinada [45].

El nombre científico de esta especie es *Genus cavia* y forma parte del orden rodentia, que tradicionalmente se subdivide en 3 subórdenes: Sciuromorpha, Hystricomorpha y Myomorpha. Esta especie actualmente se encuentra clasificada dentro del suborden de los hystricomorpha. Sin embargo, los estudios de filogenia molecular[45] (que han alineado 18 secuencias de proteínas) han encontrado que la sustitución de aminoácidos de sus proteínas es mucho más alta que la que se espera de la clasificación actual del cuyo. Lo anterior sugiere que esta especie probablemente no tiene un ancestro común con el resto de las especies del suborden hystricomorpha, y que puede ser considerada como una monofilia distinta que diverge antes de la separación de los primates y los artiodáctilos.

Esto es apoyado por un reporte reciente[46], en el que han secuenciado el genoma mitocondrial de cuyo (este genoma se hereda por vía materna solamente y no está sujeto a recambio). Comparándolo con especies ubicadas en otros ordenes, los resultados de este estudio han ubicado al cuyo en un orden distinto entre los conejos y los roedores.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el receptor de angiotensina II en hepatocitos de cuyo

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.-Caracterizar el receptor de angiotensina II, mediante la evaluación de la actividad de la *fosforila* a como parámetro fisiológico, en respuesta a la aplicación de angiotensina II a diferentes dosis, y aplicando antagonistas para identificar el tipo de receptor involucrado.

2.- Determinar la acumulación de inositol trifosfato (IP_3) cuando se incuban los hepatocitos de cuyo con angiotensina II y también en presencia de antagonistas para determinar el tipo farmacológico del receptor involucrado en la respuesta.

3.- Cuantificar por la técnica de asociación de radioligandos, el número de receptores para angiotensina II en las membranas de los hepatocitos de cuyo, así como la afinidad por agonistas (angiotensina I y angiotensina III) y antagonistas de receptores AT_1 (DUP-753 Y SR-47436) y AT_2 (PD-123177), para establecer el tipo farmacológico de receptor.

4.- Determinar con una sonda (por el método Southern), previa transcripción inversa a ADNc y amplificación por PCR, si existe ARN mensajero del tipo del receptor farmacológico determinado por las pruebas anteriores.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

La angiotensina II, angiotensina III, angiotensina I, glucosa-1-fosfato, glucógeno, digitonina, cafeína, bacitracina y β glicerolfosfato, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. La albúmina de suero de bovino (fracción V) fue adquirida de Armour. La α -D-[^{14}C]-glucosa-1-fosfato(313 mCi/mmol), el 2-[^3H]myo-inositol (20 Ci/mmol) y la [^{125}I][Sar 1 -Ile 8]angiotensina II([^{125}I]sarile) (2200Ci/mmol) fueron adquiridos de New England Nuclear. El losartán (Dup 753) y PD123177 fueron donados por Du Pont y el SR 47436 fue obsequiado por Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute.

Para los experimentos se utilizaron cuyos macho (250-300 g), alimentados libremente, mantenidos y sacrificados de acuerdo con los principios y guías de nuestro instituto y del NIH, evitando el dolor innecesario para los animales. Los hepatocitos se aislaron por perfusión del hígado con collagenasa, seguido por separación mecánica[47]. Las células se incubaron en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato, burbujando constantemente una mezcla de 95% O_2 / 5% CO_2 , manteniendo un pH de 7.4 y una temperatura de 37°C en un baño con agitación constante. La viabilidad de las células se valoró con azul de tripano y únicamente se utilizaron las preparaciones con más del 90% de viabilidad.

Para cuantificar la actividad de la *fosforilasa a*, las células se preincubaron por 20 minutos con el amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato. Los agonistas y los antagonistas se incubaron durante 1 minuto y se terminó la reacción con una solución que contiene EDTA, NaF y digitonina. La actividad de la *fosforilasa a* se valoró como se describe por Stalmans y Hers[48]. La actividad se expresó en unidades, siendo una unidad la conversión de 1 μmol de sustrato a producto en 1 minuto, por gramo de células a peso húmedo.

La producción de [^3H]inositol trifosfato se determinó como se describe en las referencias[49, 50]. Las células se incubaron por 90 minutos, en un amortiguador Krebs-Ringer, con 15 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]inositol; posteriormente se lavaron para eliminar

el inositol no incorporado e inmediatamente se incubaron por 10 minutos con LiCl 10mM.

A continuación se agregaron las hormonas y se incubaron durante treinta minutos. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo. Los fosfatos de inositol se separaron por cromatografía de intercambio iónico[51] en una columna de intercambio aniónico forma formato, a la que se unen los fosfatos de inositol y posteriormente se eluyen con soluciones crecientes de formato de amonio, para cuantificar enseguida la fracción de interés.

Las membranas de los hepatocitos de cuyo se aislaron por el método de Neville[52]. La cuantificación de proteínas se hizo por el método de Lowry y cols.[53]. La unión de [¹²⁵I]Saralasin se llevó a cabo de la siguiente manera: se incubaron 10 µg de membranas en un volumen total de 100 µl, de un amortiguador con la siguiente composición: 100mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2% de albúmina bovina sérica, 0.1mg/ml bacitracina y 20 mM Tris, pH 7.5. Se incubaron por 60 minutos en un baño con agitación, a 12 °C. Al final de la incubación se agregaron 3 ml de amortiguador frío a las membranas, e inmediatamente después se filtraron en filtros GF/C usando un sistema de filtración Brandel, lavando 3 veces (con 3 ml cada lavado) con el mismo amortiguador. Los datos obtenidos de los experimentos de competencia y de saturación se analizaron con el programa EBDA (Biosoft Elsevier). Los valores de K_d se calcularon de acuerdo con Cheng y Prusoff[54].

El ARN total se obtuvo con un reactivo cuya fórmula es una modificación de el método de Chomczynski y Sacchi[55]. La integridad del ARN fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa con formaldehído, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. Con este ARN se hicieron reacciones usando la enzima transcriptasa reversa para sintetizar ADN. Con este producto de reacción y con los "primers" 5'-GGAAACAGCTTGGTGGTG-3' (sentido del codón) y 5'-GCACAATCGCCA TAATTATCC-3' (sentido del anticodón), correspondientes a las bases 133-150 y 739-719 de los receptores AT₁ de la rata[13], se hizo una amplificación por PCR con el siguiente programa: Desnaturalización 95°C por 30

segundos, alineamiento a 60°C por 1 minuto, polimerización a 72°C por 90 segundos por 28 ciclos, usando 15 µg de ARN total. Se hizo una electroforesis de estos productos en geles de poliacrilamida al 7.5 %, se transfirió a membranas de Nylon y se hibridó en condiciones de alta astringencia con el cADN del receptor AT₁b.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El concepto de receptor se desarrolló a principios de este siglo. por Paul Ehrlich y John Langley, quienes lo describieron como “una sustancia que se encuentra en las células y con las que se combinan los fármacos para llevar a cabo sus efectos”. El concepto de receptor es indispensable para entender la manera de actuar de los fármacos, las hormonas, los neurotransmisores y los autocoides. En este trabajo se utilizaron diferentes técnicas para caracterizar al receptor de angiotensina II de los hepatocitos de cuyo.

Para determinar si existen receptores para una molécula en una célula se utiliza la técnica de unión de ligandos radiactivos, con la que se conoce el número de sitios del receptor, las características cinéticas de esta unión y sus propiedades farmacológicas.

El radioligando utilizado debe tener 4 características importantes:

- Ser selectivo para el receptor de interés.
- Tener alta afinidad por el receptor (para que la concentración usada sea baja y no se marquen sitios inespecíficos).
- Ser químicamente estable, para resistir las condiciones del marcaje y las del ensayo de unión del ligando.
- El compuesto marcado debe tener una alta actividad específica, mayor de 10 Ci/mol por lo que se prefieren el tritio y el yodo. Este último es mejor, porque la actividad específica es mayor pero se restringe a compuestos con grupos hidroxilo en anillos aromáticos.

En nuestro ensayo utilizamos [125 I]Saralasin([125 I]Sarile), compuesto que reúne las características mencionadas, para valorar por medio de una cinética de concentración la saturación del receptor; y por medio de desplazamiento del radioligando por agonistas y antagonistas a diferentes dosis, determinar el tipo farmacológico.

Primero se debe saber si existen receptores para la angiotensina II. Como existe un número limitado de estos receptores en las células, sus sitios de unión se saturan, permitiendo conocer la concentración aproximada de receptores para el ligando. Esta propiedad se cuantifica de la siguiente manera:

Se incuban membranas de tejido en concentraciones crecientes del ligando radiactivo en 2 condiciones: a) en presencia de una cantidad fija (saturante) de ligando sin marca radiactiva (lo que representa la unión inespecífica) y b) en ausencia de ligando sin marca radiactivo (unión total). La diferencia entre la cantidad de ligando radiactivo en la condición b), menos la correspondiente a la condición a), es una medida de la cantidad de ligando radiactivo unido al receptor de manera específica. La saturación se logra cuando la unión desplazable permanece constante en función de la concentración de ligando radiactivo.

La relación matemática de saturación y desplazamiento describen una hipérbola rectangular equivalente a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$[L \bullet R] = \frac{[R]_{\text{total}} [L]}{K_d + [L]}$$

Donde R es el receptor y L es el ligando. En la ecuación de Michaelis-Menten la concentración del sustrato es mucho mayor que la de la enzima; lo mismo se supone en los estudios de unión de ligando a un receptor, en los que la concentración de ligando es mucho mayor que la concentración del receptor. La función de saturación describe la proporción de los receptores ocupados en el equilibrio. En este caso, la K_d se define como la concentración de ligando radiactivo que ocupa el 50% de los sitios totales de unión al equilibrio.

Como los valores de la K_d y de R_{total} son difíciles de estimar en una hipérbola, se han hecho transformaciones lineales de esta ecuación, siendo la de Scatchard una de las más utilizadas:

$$\frac{[L \cdot R]}{[L]} = \frac{1}{K_d} ([R]_{total} - [L \cdot R])$$

Si definimos: $B = [L \cdot R]$ (ligando unido a receptor)

$F = [L]$ (ligando libre)

$$\Rightarrow \frac{B}{F} = \frac{1}{K_d} (B_{max} - B)$$

De esta transformación lineal podemos calcular 2 características de los sitios receptores: la afinidad por el ligando K_d , que se obtiene de la pendiente, y la B_{max} , que nos describe la concentración total de sitios de unión y que se obtiene en el intercepto de la abcisa (eje de las X).

En la figura 7 se observan las tendencias de la curva de saturación con Saralasin marcada, que nos indica que la unión del radioligando es relativamente abundante (750 ± 95 fmol/mg proteína de membrana), y con alta afinidad para la Saralasin, con una $k_d = 3.88 \pm 0.96$ nM.

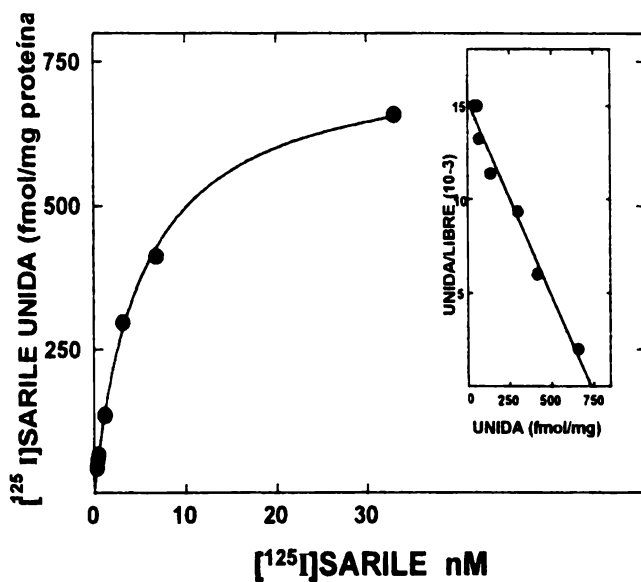


Fig. 7.- Curva de saturación de la $[^{125}\text{I}]\text{Saralasin}$ y análisis de Scatchard. Se obtuvieron membranas de hepatocitos de cuyo y se incubaron con el radioligando en un intervalo de concentración de 3 a 30 nM, y para pegado inespecífico se utilizó angiotensina II $1\mu\text{M}$. En la figura se muestra el pegado específico de $[^{125}\text{I}]\text{Saralasin}$ a los receptores de angiotensina, el esquema que se muestra es el representativo de 4 diferentes ensayos.

Se realizaron estudios de competencia utilizando AI y AIII, estableciéndose el orden de potencia de los agonistas. Para valorar el desplazamiento por antagonistas se utilizaron SR 47436, DUP 753 y PD 123177.

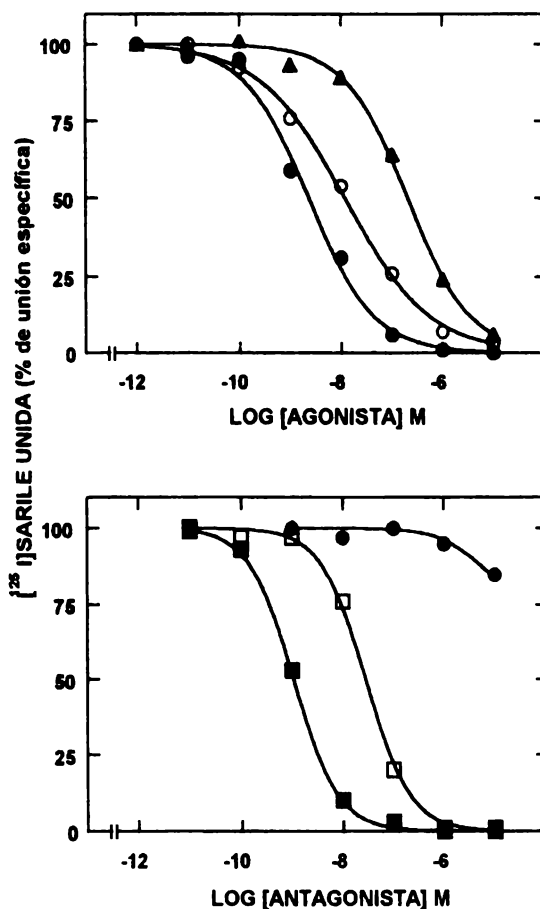


Fig. 8.- Estudio de competencia de diversos agonistas y antagonistas por los sitios de unión a [¹²⁵I]Saralasin. En la parte superior se muestra el estudio de competencia a los agonistas angiotensina II (círculos oscuros), angiotensina III (círculos claros) y angiotensina I (triángulos oscuros). En la parte inferior se muestra el estudio de competencia a las antagonistas SR47436 (cuadros oscuros), Losartán (cuadros claros) y PD123177 (círculos oscuros). La figura es la representativa de 4 diferentes experimentos.

De las curvas de desplazamiento con los agonistas se observó el siguiente orden de potencia: AII > AIII > AI; mientras que para los antagonistas el orden de potencia fue: SR 47436 > Dup 753 > PD123177. En la tabla 3 se observan las K_i y las pendientes de estas curvas. Con estos datos se puede establecer que el receptor que se expresa en las membranas de los hepatocitos de cuyo es del tipo AT_1 .

	K_i (nM)	Pendiente
Agonista		
Angiotensina II	1.52 ± 0.77	0.49 ± 0.03
Angiotensina III	7.06 ± 1.44	0.55 ± 0.02
Angiotensina I	176.00 ± 23.00	0.69 ± 0.05
Antagonista		
Irbesartán	0.53 ± 0.16	0.89 ± 0.02
Losartán	36.00 ± 8.00	1.04 ± 0.01
PD123177	$>> 10,000$	---

Tabla 3. *Parámetros de unión derivados de la competencia por los sitios de unión de la [125 I] Saralasin por los antagonistas y agonistas. Estos resultados son el promedio de 4 diferentes experimentos con $\pm$ S.E.M. usando diferentes preparaciones de membranas.*

Respuesta Fisiológica

La unión del ligando debe provocar una respuesta fisiológica, y ésta debe ser inhibida al ser bloqueada la unión de ligando y receptor por los antagonistas. Las respuestas fisiológicas que se determinaron fueron la actividad de la *fosforilasa a* y la acumulación de IP_3 marcado.

En 1985, Charest y cols.[36] demostraron que el IP_3 en hepatocitos de rata se incrementaba como respuesta a vasopresina, adrenalina, y angiotensina II, y que este aumento precedía a la estimulación máxima de la actividad de la *fosforilasa a* (que es activada por calcio), lo cual indicaba que el metabolismo de los fosfatos de inositol estaba relacionado con la señal del calcio. Además, observaron que el calcio extracelular no se requería para el aumento inicial del calcio intracelular, pero sí para mantener la respuesta. Se concluyó entonces que la angiotensina II causaba un aumento de la concentración del calcio intracelular.

Para poder detectar el aumento de calcio intracelular se cuantificó la actividad de la *fosforilasa a*, una enzima que a su vez es activada por otra enzima sensible al calcio, la fosforilasa cinasa.

Se hizo una curva dosis-respuesta a angiotensina I, II y III con un tiempo de estimulación de 1 minuto (fig. 9). Los resultados muestran que la estimulación de la actividad de la fosforilasa depende de la dosis.

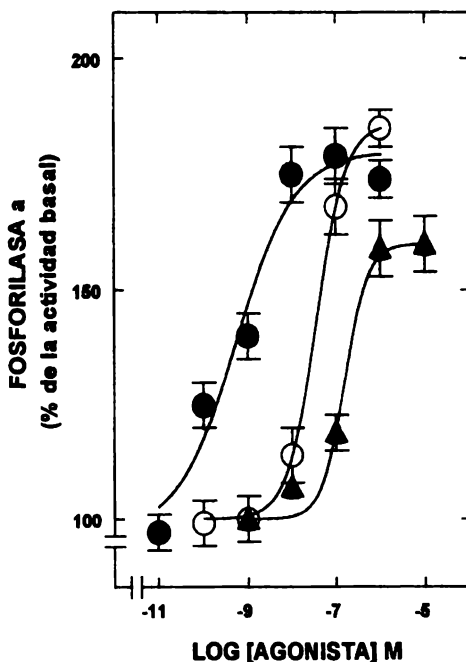


Fig. 9.- Efecto de los subtipos de la angiotensina sobre la actividad de la fosforilasa a. Los hepatocitos se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de angiotensina II (círculos oscuros), angiotensina III (círculos claros) y angiotensina I (triángulos oscuros) por un minuto de estimulación y posteriormente se determinó la actividad de fosforilasa a. La gráfica es el promedio de 6 experimentos y las líneas verticales representan el error medio estándar, los resultados se representan como el porcentaje sobre la actividad basal.

El orden de potencia observado fue:

Ang II ($EC_{50} \approx 1 \text{ nM}$) > Ang III ($EC_{50} \approx 30 \text{ nM}$) > Ang I ($EC_{50} \approx 300 \text{ nM}$)

Para establecer el tipo de receptor farmacológico que está involucrado en esta activación, se utilizó angiotensina II a una concentración de 10^{-5} M , con concentraciones crecientes de los antagonistas SR 47436, DUP 753 y PD 123177.

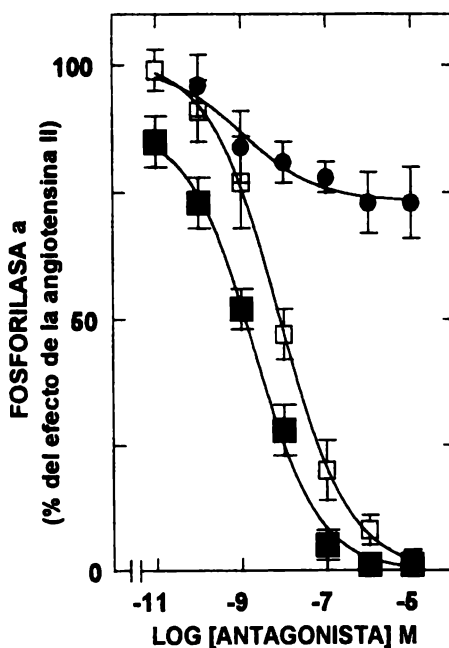


Fig. 10.- Efecto de los antagonistas no peptídicos sobre la actividad de la fosforilasa a inducida por angiotensina II 10^{-5} M . Los hepatocitos se incubaron en presencia de angiotensina II y diferentes concentraciones de SR43436 (cuadros oscuros), Losartán (cuadros claros), y PD123177 (círculos oscuros) durante 1 minuto y se determinó la actividad de la fosforilasa a. La gráfica es el promedio de 6 diferentes experimentos y las líneas verticales representan el error medio estándar.

Como se observa en la figura 10, la actividad de la *fosforilasa a* se bloqueó con los antagonistas del receptor AT_1 : SR 47436, $K_i \approx 1$ nM y DUP 753, $K_i \approx 10$ nM. El antagonista AT_2 (PD 123177) produjo muy poca inhibición a altas dosis. Ninguno de los 3 antagonistas produce algún efecto por sí solo. Estos datos permiten afirmar que el receptor de la angiotensina II en los hepatocitos de cuyo, capaz de estimular a la *fosforilasa a* (a través del aumento de calcio intracelular), es del tipo AT_1 .

En la fig. 11 se muestran los resultados obtenidos al cuantificar IP_3 con dosis crecientes de angiotensina II.

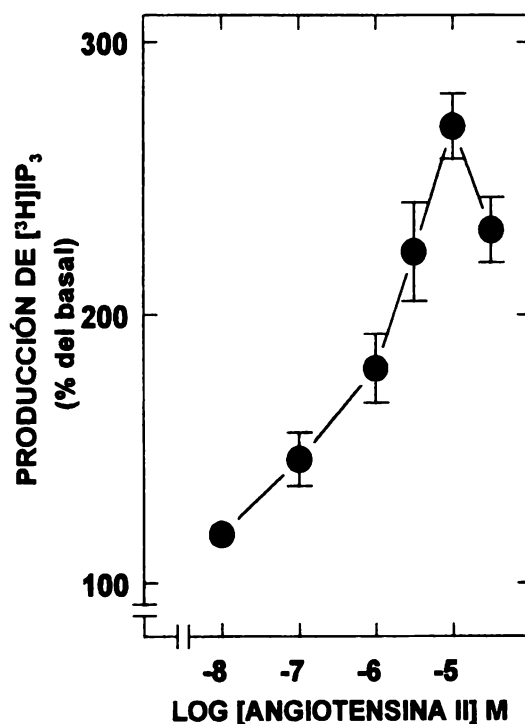


Fig. 11.- Curva dosis-respuesta de producción de IP_3 en respuesta a dosis crecientes de angiotensina II

El estudio del efecto de la angiotensina II y sus antagonistas sobre el recambio de fosfoinosítidos se llevó a cabo en un tiempo de 30 minutos (previamente

establecido como óptimo en este laboratorio). Los resultados de este estudio nos muestran que el máximo nivel de producción de IP_3 , estimulado por la angiotensina II a una concentración de 10^{-5} M, fue de 270 % sobre el nivel basal.

Esta estimulación resultó bloqueada por el SR 47436 y el DUP 753 (como se muestra en la fig. 12), llevando el nivel de IP_3 a valores basales, al aplicar dosis de 10^{-5} M de estos antagonistas. El antagonista de los receptores tipo 2 (PD123177) muestra un menor efecto.

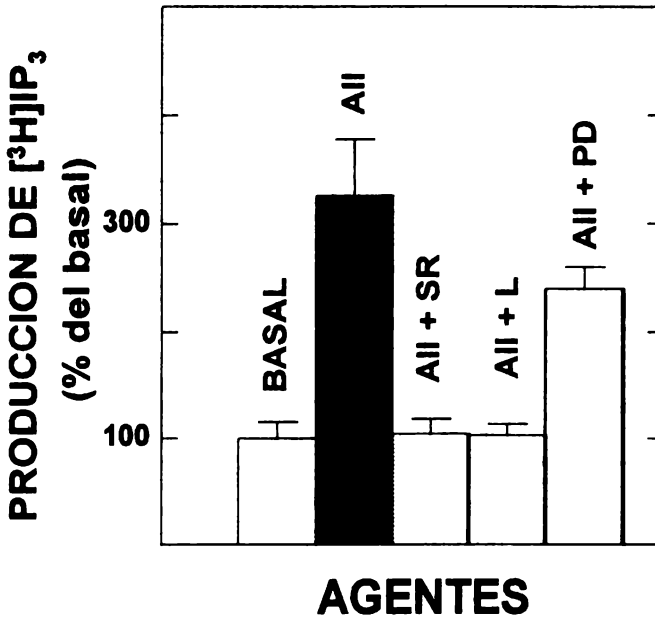


Fig. 12.- Producción de IP_3 en respuesta a diferentes fármacos

El efecto máximo observado se encontró hasta los 30 minutos de incubación, a diferencia del efecto de la *fosforilasa a*, que se observó al minuto, por lo que sería conveniente saber si ambas respuestas están relacionadas y cuál es la fuente del aumento de calcio inicial: el medio extracelular o las reservas del retículo endoplásmico.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las membranas del hepatocito de cuyo presentan receptores para la angiotensina II del tipo AT₁, y que estos receptores inducen 2 respuestas fisiológicas: activación de la fosforilasa y recambio de los fosfoinosítidos.

Para determinar si en los hepatocitos de cuyo se expresa el ARNm correspondiente al receptor AT₁ de angiotensina II, se obtuvo cADN a partir de ARNtotal y se amplificó por PCR, como se indica en la sección de métodos.

Se obtuvo una banda de aproximadamente 600 pares de bases, que hibridamos con una sonda del receptor AT_{1b} de rata. La fotografía correspondiente se muestra en la fig. 13. De lo anterior concluimos que el receptor expresado en hepatocitos de cuyo es del tipo 1.

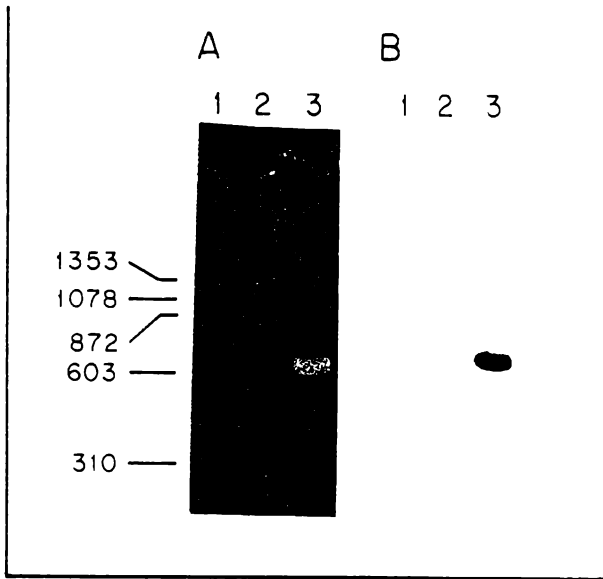


Figura 13.- RT-PCR e hibridación de los productos de reacción. En el panel A se observa el gel teñido con bromuro de etidio mostrando los productos de RT-PCR, obtenidos usando las condiciones mencionadas en métodos (el carril 1 es una reacción en ausencia de transcriptasa inversa, el carril 2 el producto de reacción en ausencia de RNA, y el carril 3 con RNA y transcriptasa inversa). En el panel B el gel A se transfiere a membranas de nylon y se hibrida con un cADN del receptor AT_{1B} de rata en condiciones de alta astringencia.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados de los experimentos nos permiten concluir que el receptor de angiotensina II expresado en los hepatocitos de cuyo corresponde al tipo AT₁

Los agonistas nos muestran el siguiente orden de potencia: angiotensina II > angiotensina III > angiotensina I. Para los antagonistas se obtuvo: SR 47436 > DUP 753 > PD 123177. Las curvas de competencia tienen una pendiente cercana a 1 para los antagonistas, y menores de 1 para los agonistas, característico de los receptores acoplados a proteínas G.

VI. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

En los hepatocitos la angiotensina II había demostrado tener efectos sobre el metabolismo del glucógeno (estimular la glucogenólisis) a través de la cinasa de la fosforilasa b (enzima estimulada por calcio); y también aumentar la acumulación de IP_3 , por lo que estas células son un modelo ideal para el estudio de las acciones de la angiotensina II.

En el laboratorio donde se realizó el presente trabajo se habían estudiado estas 2 respuestas metabólicas en hepatocitos de rata. Una especie que está genéticamente relacionada a la rata y al ratón es el cuyo (*Genus cavia*), por lo que para hacer una comparación con los resultados obtenidos en este y otros laboratorios, se caracterizó el receptor de angiotensina II en hepatocitos de cuyo, utilizando técnicas de farmacología, bioquímica y biología molecular. Vale la pena mencionar que el único modelo hepático caracterizado a profundidad es el hepatocito de rata. Nuestro estudio hace una exploración de otro modelo, el segundo plenamente caracterizado hasta el momento, siendo ambos modelos similares.

Es decir, los resultados producidos por estas técnicas en el presente estudio son similares a los obtenidos anteriormente en este laboratorio con ratas: La activación de angiotensina II muestra una $EC_{50} \approx 1$ nM en cuyo y una $EC_{50} \approx 3$ nM en rata. La acumulación de IP_3 obtenida en este estudio fue 3 veces sobre la basal, similar a los resultados de Charest [36] y de este laboratorio [49], en rata con la misma dosis (10^{-5} M), por lo que nuestros resultados apoyan los resultados anteriores.

Con relación a los receptores para angiotensina II, el grupo del Dr. Inagami en 1992 [57] publicó un análisis de la evolución del receptor AT_1 de angiotensina II en rata, ratón, humano y bovino; y llegó a la conclusión que el gen se había duplicado antes de la divergencia de la rata y el ratón, y después de la divergencia del grupo de los roedores y los artiodáctilos. Por esto, sería importante averiguar si el cuyo

presenta también 2 subtipos de receptor AT_1 como los roedores o un sólo tipo como en humanos y bovinos.

Como estos 2 subtipos tiene una homología muy grande en sus regiones codificantes se necesitaría clonar el receptor y secuenciar su región 3' reguladora que es donde existen las 2 diferencias mayores entre los subtipos para averiguar si están presentes los 2 subtipos o solo uno.

Por otro lado, consideramos de interés que si bien los receptores hepáticos para angiotensina II son del mismo subtipo (AT_1), los receptores α_1 -adrenérgicos no lo son: El hepatocito de rata expresa al receptor α_{1B} [58, 59], mientras que el del cuyo expresa al α_{1A} . Evidentemente esto señala diferencias en la expresión de estos receptores entre las especies y abre nuevas perspectivas de estudio.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Peach, M. J.** Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action. *Physiological Review* **57**: 313-370 (1977).
- 2.- **Jackson, E. K. & Garrison, J. C.** Renin and angiotensin. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. Chapter 31, pp 733-58. (eds. J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddpm & A.G. Gilman). McGraw-Hill. New York (1996).
- 3.- **Dzau, V. E. K. & Garrison, J. C.** Mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension* **18**[11]100-5 (1991).
- 4.- **Hausdoff, W. P. Sekura, R. D. & Aguilera G.** Control of aldosterone production by angiotensin II is mediated by two guanine nucleotide regulatory proteins. *Endocrinology* **120**:1668-78 (1987).
- 5.- **Valloton, M. B.** The renin-angiotensin system. *Trends in Pharmacological Science*. **8**: 69-74 (1987).
- 6.- **Chiu A. T. Herblin, W. F. & McCall, D. E.** Angiotensin receptors, Chapter 3: Defining angiotensin receptor subtypes. Saavedra, J., Pieter, B. M. & Timmerman, W. M., Editors. Ed. Plenumilless. New York (1994).
- 7.- **Enjalbert, A. F., Sladeczek, F. & Guillon, G.** Ang II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate production in anterior pituitaries cells. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 4071-75 (1986).
- 8.- **Gunther, S. J.** Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 7622-7629 (1984).
- 9.- **Chang R. S., & Lottiu, V. J.** Two distinct angiotensin II receptor binding sites in rat adrenal revealed by new selective nonpeptide ligands. *Molecular Pharmacology* **37**: 347-351 (1990).
- 10.- **Herblin, W. F., Chiu, A. T., MacCall, D. E. & Carini, D. J.** Angiotensin II receptor heterogeneity. *American Journal of Hypertension*. **4**: 299S-302S (1991).
- 11.- **Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. & Inagami, T.** Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor. *Nature* **351**: 230-32 (1991).

-
- 12.- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Range, M. S. & Bernstein, K. E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**: 233-236 (1991).
- 13.- Iwai, N. & Inagami, T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Letters* **298** [2-3] 257-68 (1992).
- 14.- Sandberg, K., Ji, H., Clark, A., Shaphira, H. & Catt, K. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 9455-9458 (1992).
- 15.- Baogen Su, M. & Terry, S. E. The genomic organization and functional analysis of the promoter for the human Angiotensin II type 1 receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **204**: 1039-46 (1994).
- 16.- Lewis, J. L., Serikawa, T. & Warnack, D. G. Chromosomal localization of angiotensin II type 1 receptor isoforms in the rat. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **194** [2] 677-82 (1993).
- 17.- Murasawa, S., Matsubara, H., Urakarm, M. & Inada, M. Regulatory elements that mediate expression of the gene for the Angio II type 1a receptor of the rat. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 26996-27003 (1993).
- 18.- Takayanagi, R., Kizo, O., Yoshiyuku, S. & Hajime, N. Molecular cloning and characterization of the promoter for human type-1 angiotensin II receptor gene. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **200**[3] 1264-78 (1994).
- 19.- Thomas, W. G., Thekkumkara, T. J. & Baker, K. M. Stable expression of a truncated AT1a receptor in CHO-K1 cells. The carboxyl terminal region directs agonist induced internalization but not receptor signaling or desensitization. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 207-13 (1995).
- 20.- Hunyaday, L., Bor, M., Ballas, T. & Catt, K. Identification of a cytoplasmic Ser, Thr, Leu motif. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 31378-31382 (1994).
- 21.- Groblewski, T., Maigret, B. & Lombard, C. Aminoacids of the 3rd. transmembrane domain of the AT1a Angiotensin II receptor are involved in the differential recognition of peptide and non-peptide ligands. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **209** [1] 153-60 (1995).

-
- 22.- Inagami, T., Yamano, Y., Ohgama, K., Kikyo, M., Sano, T., Nakagomi, Y., Nakamura, N. & Guo, D. T. Mutagenesis and the molecular modeling of the rat angiotensin II receptor AT₁. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 14024-30 (1995).
- 23.- Murasawa, S., Matsubara, H., Mori, Y., Kazuhisa, K., Maruyama, K. & Inadi, M. Identification of a negative cis regulatory element. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 24282-24286 (1995).
- 24.- Satoshi, T., Ichiki, T., Nakakubo, H., Kitami, Y., Guo, D. & Inagami, T. Molecular cloning and expression of the gene encoding human AII type 2 receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **200**: 1449-1454 (1994).
- 25.- Mickey, M. M., Su, B. & Terry, S. E. Cloning of the human angiotensin II receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **205**: 645-51 (1994).
- 26.- Mickey, M. M. & Terry, S. E. The Sequence and Genomic Organization of the human type 2 angiotensin II receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **209**: 554-562 (1995).
- 27.- Ichiki, T., Kambayashi, Y. & Inagami, T. Transcription of the rat angiotensin II type 2 receptor gene. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **222**: 566-571 (1996).
- 28.- Hein, L., Barsh, G., Pratt, R. E., Dzau, V. & Kobilka, B. Behavioral and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type 2 receptor in mice. *Nature* **377**: 744-747 (1995).
- 29.- Ichiki, T., Labosky, P., Shiuta, Ch., Okuyoma, Sh., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I. & Inagami, T. Effects on blood pressure and exploratory behavioral of mice lacking angiotensin type 2 receptor. *Nature* **377**: 748-750 (1995).
- 30.- Pals, D. T., Thaisrivongs, S., Lawson, J. A., Kati, W. H., Turner, S. R., De Graaf, G. L. & Johnson G. A. A specific competitive antagonist of the vascular action of angiotensin II. *Circulation. Research*. **29**: 664 (1971).
- 31.- Lassegue B, Griendling K and Wayne A. "Molecular Biology of Angiotensin Receptor". In Angiotensin Receptor chapter 2 pp 17-47 Editores:Saavedra, J., Pieter, B. M. & Timmerman, W. M., In Ed. Plenumil. New York (1994).
- 32.- Moore, J. G. Designing peptide mimetics. *TIPS* **15**:124-129 (1994).
- 33.- Furukawa, Y., Kishimoto, S. & Nishikawa K. U. S. Patent 4,340,598 & 4,355,040 Takeda Chemical Industries, Ltd. Osaka(1982).

-
- 34.- Chiu, A. T., Herblin, W. F. & McCall, D. E. Identification of angiotensin II receptor subtype. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **165**[1]:196-203 (1989).
- 35.- Atkinso, A. B. Combined treatment of severe hypertension with captopril and diuretic. *Lancet*, **2**:105-110 (1980).
- 36.- Charest, R., Pripié, V., Exton, J. & Blackmore, P. Stimulation of inositol triphosphate formation in hepatocytes by vasopressin, adrenaline and angiotensin II and its relationship to change in cytosolic free Ca. *Biochemical Journal* **227**:79-90 (1985).
- 37.- Johnson, R. & Garrison, J. Epidemial growth factor and ang II stimulate formation of inositol 1,4,5 and inositol 1,3,4 triphosphate in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **262**:17285-17293 (1987).
- 38.- Gyruko, R., Kimura, B., Kurien, P. & Phillips, M. Angiotensin II Receptor subtypes play opposite roles in regulating phosphatidylinositol hydrolysis in rat skin slices. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **186**:285-292 (1992).
- 39.- Enyedi, P., Mues, J. & Hunyaday, L. The role of guanyl nucleotide binding proteins in the formation of inositol phosphates in adrenal glomerulosa cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **140**:941-947 (1986).
- 40.- Jard, S., Cantau, B. & Jakobs, K. H. Angiotensin II and α -adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **256**:2603-06 (1981).
- 41.- Lassegue, B. Alexander, R. & Clark, M. Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal* **276**:19-25 (1991).
- 42.- Madhun, Z., Goldthwait, D. & Mckay, D. An epoxygenase metabolite of arachidonic acid mediates angiotensin II-induced rises in cytosolic calcium in rabbit proximal tubule epithelial cells. *Journal of Clinic Investigation*. **88**:456-61 (1991).
- 43.- Hoyer, J., Popp, R. & Meger, J. Angiotensin II, vasopressin and GTP (gamma S) inhibit inositol rectifying K^+ channels in porcine cerebral capillary endothelial cells. *Journal of Membrane Biology*. **123**:55-62 (1991).

-
- 44.- Brauenis, U., Vassilev, P. M. & Quinn, S. J. Ang II blocks potassium currents in zone glomerulosa cells from rat, bovine and human adrenals. *American Journal of Physiology* **260**:E772-779 (1991).
- 45.- Li, W. H., Hide, W. A., Zharkikh, A., Ma, D. P. & Graur, D. The molecular Taxonomy and Evolution of the Guinea Pig. *Journal of Heredity*. **83**:174-81 (1992).
- 46.- D'Erchia, A. M., Gissi, C., Pesole, G., Saccone, C. & Arnason, U. The guinea-pig is not a rodent. *Nature* **381**:597-599 (1996).
- 47.- Berry, M. N. & Friend, D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *Journal of Cell Biology* **43**: 506-520(1969).
- 48.- Stalmans, W. & Hers, H. G. The stimulation of liver phosphorylase α by AMP, fluoride and sulfate. A technical on the specific determination of the α and β forms of liver glycogen phosphorylase. *European Journal of Biochemistry* **54**: 341-350(1975).
- 49.- García-Sáinz, J. A. & Macías-Silva, M. Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **172**: 780-785(1990).
- 50.- García-Sáinz, J. A. Macías-Silva, M., Olivares-Reyes, J. A. & Romero-Avila, M.T. Histamine activates phosphorylase and inositol, phosphate production in guinea pig hepatocytes. *European Journal of Pharmacology* **227** :325-331(1992).
- 51.- Berridge, M. J., Dawson, R. H., Downes, P. & Irvine, R. Changes in the level of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phospholipids. *Biochemical Journal* **212** :473-482(1983).
- 52.- Neville, J. M. Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* **154** :540-552(1968).
- 53.- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193** :265-275(1951).
- 54.- Cheng, Y. C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **22** :3099-3108(1973).

55.- Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159(1987)

56.- Blayney L.M., Gapper, P.W. & Newby, A.C. Vasoconstrictor agonists activate G-protein-dependent receptor-operated calcium channels in pig aortic microsomes. *Biochemical Journal* **282**: 81-84 (1992).

57.- Yoshida, H., Kakuchi, J., Guo, D. F., Furuta, H., Iwai, N., Jong, R. M., Inagami, T. & Ichikawa, I. Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **186**[2]1042-9(1992).

58.- García Saíñz J. A. and Romero Avila M. T. Characterization of the α 1A adrenoreceptor of the guinea pig liver membranes: study using 5-[3 H] methyl urapidil. *Molecular Pharmacology* **44** (3): 589-594 (1993)

59.- García Saíñz J. A., Casas González P., Romero Avila M.T. & González Espinosa C. Characterization of the hepatic α 1B adrenoreceptor of rat, mice and hamster. *Life Science* **54** (25): 1995-2003 (1994)

Characterization of the AT₁ angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver

J A García-Sáinz, M Martínez-Alfaro, M T Romero-Avila and C González-Espinoso

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. postal 70-248, México, D. F. 04510

Requests for offprints should be addressed to J A García-Sáinz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. postal 70-248, México, D. F. 04510

Abstract

In guinea pig hepatocytes angiotensin II induced phosphorylase α activation. This effect was mimicked by other angiotensins with the potency order: angiotensin II (EC_{50} , ≈ 1 nM) > angiotensin III (EC_{50} , ≈ 30 nM) > angiotensin I (EC_{50} , ≈ 300 nM). The effect of 10 nM angiotensin II was blocked by the angiotensin II receptor AT₁-selective antagonists irbesartan and losartan (K_i values of ≈ 1 nM and ≈ 10 nM for irbesartan and losartan respectively) but not by the AT₂-selective antagonist PD123177.

Similar data were obtained when the production of [³H]IP₃ from [³H]myo-inositol-labeled cells was studied. Angiotensin II induced a dose-dependent increase in [³H]IP₃ production; the maximal effect (≈ 3 -fold) was observed at a concentration of 10 μ M. This effect of angiotensin II was completely blocked by the AT₁-selective antagonists irbesartan and losartan, but only in a very limited fashion by PD123177.

[¹²⁵I][Sar¹-Ile⁸]angiotensin II bound with high affinity (≈ 3.8 nM) to a moderately abundant number of sites (≈ 660 fmol/mg protein) in guinea pig liver membranes. Binding competition experiments indicate the following orders of potency for agonists: angiotensin II (≈ 1.5 nM) > angiotensin III (≈ 7 nM) > angiotensin I (≈ 176 nM), and for antagonists: irbesartan (≈ 0.5 nM) > losartan (≈ 36 nM) $\gg$ PD123177 ($\gg 10\,000$ nM).

The functional and binding data strongly indicate that the effects of angiotensin II were mediated through AT₁ receptors. Expression of the mRNA for these receptors was confirmed by RT-PCR and hybridization of the reaction product with a radiolabeled rat AT₁ receptor cDNA probe.

Journal of Endocrinology (1997) 154, 133–138

Introduction

Angiotensin II is a potent octapeptide hormone which elicits a large variety of physiological effects by modulating the function of the cardiovascular systems, the brain, kidney, adrenal glands, pituitary and liver, among many other organs and systems (Jackson & Garrison 1996). Its actions are initiated through interaction with specific receptors located in the plasma membrane. Two basic types of angiotensin II receptors have been described, i.e. AT₁ and AT₂ receptors, which both belong to the seven transmembrane domain G-protein-coupled family of receptors (De Gasparo *et al.* 1995, Zhang & Pratt 1996). These two major types of receptors have been distinguished pharmacologically through the use of very selective nonpeptide antagonists, such as losartan (DuP 753) and PD123177 (Chiu *et al.* 1989) and irbesartan (SR 47436/BMS-186295) (Cazaubon *et al.* 1993). The cDNAs of these receptors have been cloned and expressed in model cellular systems (Murphy

et al. 1991, Sasaki *et al.* 1991, Kambayashi *et al.* 1993, Mukoyama *et al.* 1993).

In rat liver cells, angiotensin II activates phosphorylase α activity via the phosphoinositide turnover/calcium mobilization signal transduction pathway through AT₁ receptors (García-Sáinz & Macías-Silva 1990). These receptors are also coupled in an inhibitory fashion to adenylyl cyclase in hepatocytes (Bauer *et al.* 1991). In addition to its short term effects, activation of AT₁ receptors induces longer-term effects such as proto-oncogene mRNA accumulation (González-Espinoso & García-Sáinz 1992, 1996). It is well known that angiotensin II also modulates the metabolism of liver cells of other animals, such as the guinea pig (DeWitt & Putney 1983, Burgess *et al.* 1985). However, to the best of our knowledge, the characteristics of the angiotensin II receptors in these cells have not been defined. Here we present the characterization of the AT₁ angiotensin receptor expressed in guinea pig liver cells, using biochemical, pharmacological and molecular biological approaches.

Materials and Methods

Angiotensin II, angiotensin III, angiotensin I, glucose-1-phosphate, glycogen, digitonin, caffeine, bacitracin and β -glycerophosphate were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Bovine serum albumin (fraction V) was from Armour (Kankakee, IL, USA). α -D-[¹⁴C]Glucose-1-phosphate (313 mCi/mmol), 2-[³H]myo-inositol (20 Ci/mmol) and [¹²⁵I][Sar¹-Ile⁸]angiotensin II ([¹²⁵I]Sarile) (2200 Ci/mmol) were from New England Nuclear (Boston, MA, USA). Losartan (DuP 573) and PD123177 were generously provided by DuPont (Wilmington, DE, USA) and irbesartan (SR 47436/BMS-186295-01) was a generous gift from Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ, USA) and Sanofi-Recherche (Montpellier, France) which codeveloped the compound.

Male guinea pigs (250–300 g), having food available *ad libitum*, were maintained and sacrificed according to the principles and guidelines of our Institute and the NIH, to avoid any unnecessary pain to the animals. Hepatocytes were isolated by perfusing the liver with collagenase followed by mechanical disruption (Berry & Friend 1969). The cells were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer under an atmosphere of 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4 at 37 °C in an orbital water bath shaker. Cell viability was routinely >90% as evidenced by trypan blue exclusion.

To quantify phosphorylase *a* activity, the cells were preincubated for 20 min. Agonists and/or antagonists were added to the cells 1 min before stopping the reaction and phosphorylase *a* activity was assayed as described by Stalmans & Hers (1975). Activity is expressed in units, one unit being defined as the conversion of 1 μ mol substrate to product in 1 min per g cell wet weight.

Production of [³H]inositol phosphates was studied as described (García-Sáinz & Macías-Silva 1990, García-Sáinz *et al.* 1992). In brief, cells were incubated for 90 min in buffer containing 15 μ Ci/ml [³H]inositol, washed and incubated for 10 min with 10 mM LiCl; the hormones were added and after 30 min (Burgess *et al.* 1985) the reaction was stopped. Inositol phosphates were separated by anion exchange chromatography (Berridge *et al.* 1983), and data corresponding to production of [³H]inositol trisphosphate ([³H]IP₃) are presented (García-Sáinz *et al.* 1992).

Liver membranes were isolated by the method of Neville (1968) and membrane protein was quantified by the method of Lowry *et al.* (1951). [¹²⁵I]Sarile binding was performed as follows: liver membranes (10 μ g) were incubated in a total volume of 100 μ l buffer containing 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2% bovine serum albumin, 0.1 mg/ml bacitracin, 20 mM Tris, pH 7.5. Incubations were for 60 min in a water bath shaker at 12 °C. At the end of the incubation 3 ml ice-cold buffer were added to the membrane suspension, the membranes were immediately filtered on GF/C filters (Sigma), using a Brandel

harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA), and washed three times (3 ml each time) with the same buffer. Filters were presoaked in 0.3% polyethylenimine to decrease nonspecific binding to the filter. Saturation experiments were performed using 200–300 pM [¹²⁵I]Sarile and increasing concentrations of unlabeled antagonist (0.2–30 nM). Nonspecific binding was evaluated in the presence of 1 μ M angiotensin II; specific binding represented 85–90% of the total binding. Similarly, binding competition experiments were performed using 200–300 pM [¹²⁵I]Sarile and varying concentrations of agonists or antagonists. Saturation and competition data were analyzed using the EBDA programs (Biosoft-Elsevier, Cambridge, UK). *K_i* values were calculated according to Cheng & Prusoff (1973).

Total RNA was obtained by the method of Chomczynski and Sacchi (1987) with minor modifications. RNA integrity was routinely checked by electrophoresis on formaldehyde-containing agarose gels and visualization under UV light using ethidium bromide staining. Reverse transcriptase-polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed with total RNA using a kit from Perkin Elmer (Branchburg, NJ, USA). The primers: 5'-GGAACAGCTTGCTGGTG-3' (coding sense) and 5'-GCACAATCGCCATAATTATCC-3' (anticoding sense) corresponding to bases 133–150 and 739–719 of the rat AT₁ receptors cDNAs (Iwai & Inagami 1992), were employed. The PCR amplification profile consisted of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 60 °C for 60 s, and extension at 72 °C for 90 s (28 cycles) using 5 μ g total RNA. The RT-PCR products were electrophoresed in 7.5% polyacrylamide gels, transferred to nylon membranes and hybridized under high stringency conditions (García-Sáinz *et al.* 1992) with the whole AT_{1B} rat cDNA (Iwai & Inagami 1992) labeled by nick translation (specific activity $\approx 10^8$ c.p.m./ μ g).

Results are presented as means $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed using ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons.

Results

Activation of hepatocytes with angiotensins II, III and I resulted in dose-dependent activation of phosphorylase *a* activity (Fig. 1). Angiotensin II and III were fully effective whereas angiotensin I induced a consistently smaller activation of this enzyme (Fig. 1). The potency order observed was: angiotensin II (EC₅₀ $\approx$ 1 nM) > angiotensin III (EC₅₀ $\approx$ 30 nM) > angiotensin I (EC₅₀ $\approx$ 300 nM).

When cells were challenged with 10 nM angiotensin II, an immediate $\approx$ 2-fold increase in phosphorylase *a* activity was observed. Such an effect was dose-dependently inhibited by the nonpeptide AT₁-selective antagonists irbesartan and losartan (Fig. 2). The former was

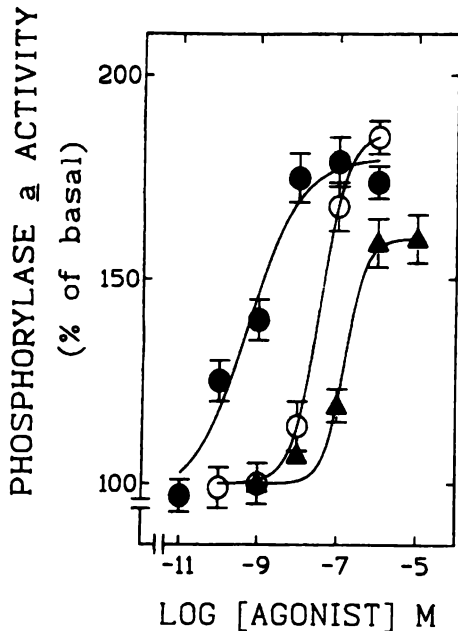


Figure 1 Effect of angiotensins on phosphor-lyase activity. Hepatocytes were incubated in the absence or presence of different concentrations of angiotensin II (●), angiotensin III (○) or angiotensin I (▲) for 1 min and phosphor-lyase activity was determined. Results are plotted as the means $\pm$ S.E.M. of 5–6 experiments using different cell preparations. Data are presented as percentage of basal activity which was 18 ± 3 units (one unit of enzyme activity is defined as the conversion of 1 μ mol substrate to product in 1 min per g cell wet weight).

approximately 10-fold more potent than the latter (K_i values of ≈ 1 nM for irbesartan and ≈ 10 nM for losartan). In contrast, the AT₂-selective antagonist PD123177 induced only a very modest inhibition of angiotensin II effect at relatively large concentrations (Fig. 2). None of the antagonists altered basal phosphor-lyase activity (data not shown).

The effect of angiotensin II on phosphoinositide turnover was studied. Angiotensin II induced a dose-dependent increase in [3 H]IP₃ production with the maximal effect (≈ 3 -fold) being observed at a concentration of 10 μ M (Fig. 3). This effect of angiotensin II was completely blocked by the AT₁-selective antagonists irbesartan and losartan, but the effect was blocked in only a very limited fashion by PD123177 (Fig. 4). The antagonists by themselves were without effect on this parameter (data not shown).

[125 I]Sarile is bound to guinea pig liver membranes in a saturable fashion as shown in Fig. 5. The binding isotherm and the Rosenthal transformation of the data indicate

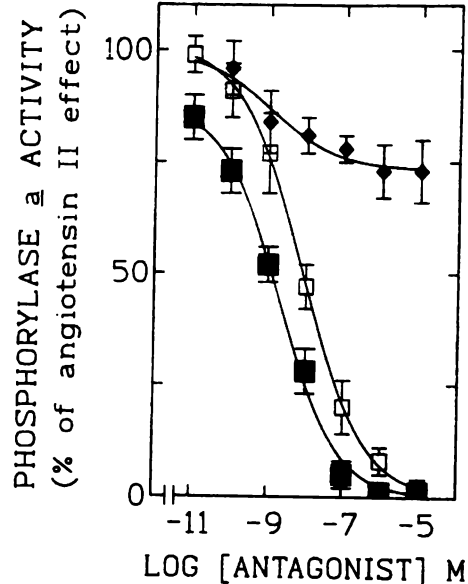


Figure 2 Effect of nonpeptide antagonists on the stimulation of phosphor-lyase activity induced by angiotensin II. Hepatocytes were incubated in the absence or presence of 10 nM angiotensin II and different concentrations of irbesartan (■), losartan (□) or PD123177 (●) for 1 min and phosphor-lyase activity was determined. Results are plotted as the means $\pm$ S.E.M. of 5–6 experiments using different cell preparations.

that the radioligand binds to a relatively abundant (663 ± 95 fmol/mg), homogeneous class of sites with high affinity for this antagonist (K_i , 3.88 ± 0.96 nM; mean $\pm$ S.E.M.) (results are the means $\pm$ S.E.M. of 4 separate experiments using different membrane preparations). Binding competition experiments with agonists indicated the following order of potency: angiotensin II > angiotensin III > angiotensin I (Fig. 6 and Table 1); for antagonists the potency order was: irbesartan > losartan > PD123177 (Fig. 6 and Table 1). The slopes of the competition curves were close to 1 for antagonists and clearly less than 1 for agonists, which is characteristic of G-protein-coupled receptors.

Using RT-PCR we detected a fragment of ≈ 600 bp (Fig. 7, panel A, lane 3). No such fragments were detected in the absence of RNA or reverse transcriptase (Fig. 7, panel A, lanes 1 and 2 respectively). The fragment had the size expected (comparable to that obtained using RNA from rat liver, data not shown, and see Iwai & Inagami 1992). The identity of the fragments was further tested by hybridization with the whole rat AT_{1B} angiotensin II receptor cDNA (Fig. 7, panel B).

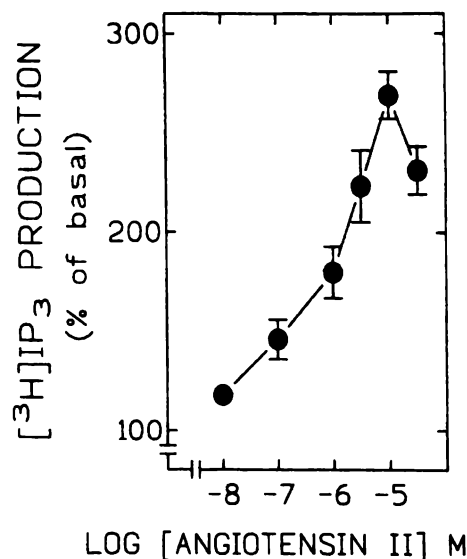


Figure 3 Effects of angiotensin II on [³H]IP₃ production. Hepatocytes were incubated in the presence of different concentrations of angiotensin II. Results are plotted as the means ± S.E.M. of 6 experiments using different cell preparations. Data are presented as percentage of basal activity which was 265 ± 30 c.p.m./40 mg cell wet weight.

Discussion

In the present study the angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver was characterized using several different approaches. This is the first reported characterization of these receptors. The results show a very good correlation between the data obtained in the phosphorylase *a* assays and the binding data (Table 1), in that the order of potency for agonists and antagonists and even the EC₅₀ and K_i values were very similar. Such values are within the range that has been observed in other models that express AT₁ receptors (De Gasparo *et al.* 1995). These data strongly suggest that both parameters are reflecting the characteristics of the same receptors and that these are very similar to those present in rat liver (García-Sáinz & Macías-Silva 1990).

AT₁ receptors are coupled to the phosphoinositide turnover/calcium mobilization signal transduction process (García-Sáinz & Macías-Silva 1990). However, there is evidence that this same subtype may be coupled to other signaling events, such as inhibition of adenylyl cyclase (Bauer *et al.* 1991) and activation of tyrosine kinases (Huckle *et al.* 1990, Earp *et al.* 1995, Marrero *et al.* 1995a,b). In general, our studies suggest that the AT₁ receptors in guinea pig liver are also coupled to phos-

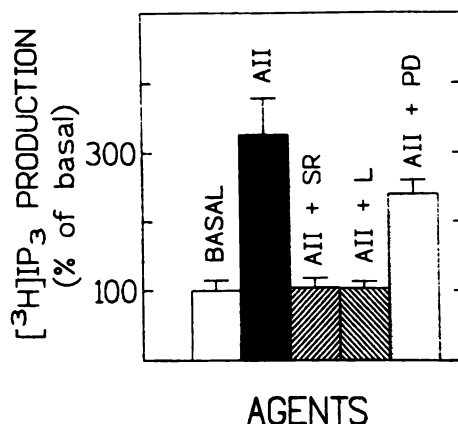


Figure 4 Effects of angiotensin II and angiotensin II antagonists on [³H]IP₃ production. Hepatocytes were incubated in the absence of any agent (BASAL), or in the presence of 10 µM angiotensin II alone (AII) or with 10 µM irbesartan (AII+SR), 10 µM losartan (AII+L) or 10 µM PD123177 (AII+PD). Results are plotted as the means ± S.E.M. of 7 experiments using different cell preparations. Data are presented as percentage of basal activity which was 239 ± 44 c.p.m./40 mg cell wet weight. Statistical analysis: BASAL vs AII, *P*<0.001; BASAL vs AII+PD, *P*<0.05; AII vs AII+SR, *P*<0.001; AII vs AII+L, *P*<0.001.

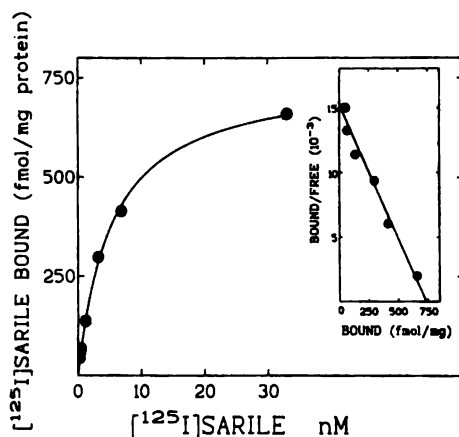


Figure 5 [¹²⁵I]Sarile saturation isotherm. Plotted are the specific binding and the Rosenthal analysis (insert). The results are representative of four experiments using different membrane preparations.

phoinositide turnover, since angiotensin II increased the production of [³H]IP₃, and this action was blocked by the AT₁ antagonists. However, this effect was small at low concentrations of angiotensin II and higher concentrations were required in order to reach maximal production.

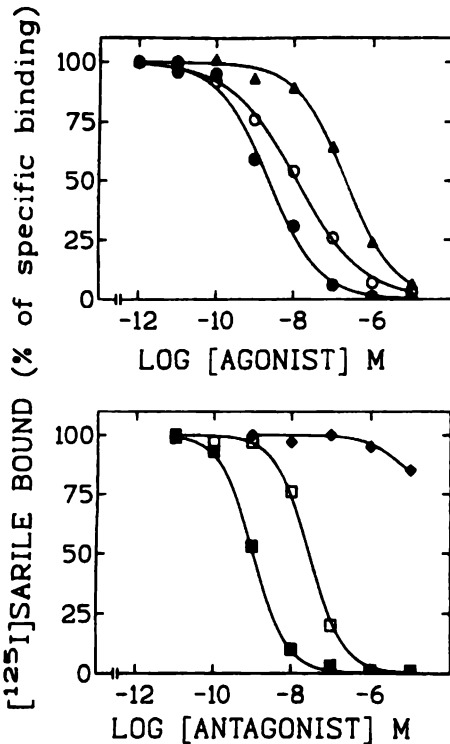


Figure 6 Binding competition experiments. The following agonists were employed: (a) agonists (upper panel): angiotensin II (●), angiotensin III (○) and angiotensin I (▲); (b) antagonists (lower panel): irbesartan (■), losartan (□) and PD123177 (◆). The results are representative of four experiments using different membrane preparations.

Table 1 Binding parameters derived from the competition by agonists and antagonists for [¹²⁵I]sarile binding sites. Results are the means $\pm$ S.E.M. of four determinations using different membrane preparations

Agonist	K_i (nM)	Slope
Angiotensin II	1.52 $\pm$ 0.77	0.49 $\pm$ 0.03
Angiotensin III	7.06 $\pm$ 1.44	0.55 $\pm$ 0.02
Angiotensin I	176.00 $\pm$ 23.00	0.69 $\pm$ 0.05
Antagonist		
Irbesartan	0.53 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.02
Losartan	36.00 $\pm$ 8.00	1.04 $\pm$ 0.01
PD123177	$\geq 10\,000$	—

Several reasons may be responsible for this difference from the results obtained in the phosphorylase α assays. Here the cells were in contact with the peptide hormone for only



Figure 7 RT-PCR and hybridization of the reaction products. Ethidium bromide-stained gel showing the RT-PCR product obtained using conditions for the AT₁ receptor: panel A) (lane 1, reaction performed in the absence of reverse transcriptase; lane 2, reaction performed in the absence of RNA; lane 3, complete reaction). Gels identical to those in panel A were transferred to nylon membranes and hybridized with the labeled AT_{1B} cDNA (panel B); the autoradiograph presented is representative of three different experiments with identical results.

1 min, whereas in the studies on the production of [³H]IP₃, 30 min incubation are required and it is well known that liver cells actively degrade angiotensin II. On the other hand, a minimal increase in IP₃ is probably sufficient to increase cytosol calcium and maximally activate phosphorylase α . Nevertheless, it is clear that activation of guinea pig liver angiotensin II receptors stimulates IP₃ production through AT₁ receptors, although our data do not exclude the possibility that other signaling pathways could be stimulated when these receptors are activated.

Two forms of angiotensin II receptor exist in some species (Iwai & Inagami 1992, Konishi *et al.* 1994, De Gasparo *et al.* 1995), i.e. AT_{1A} and AT_{1B} isoforms. These receptors have a very high degree of sequence similarity (96% for the rat isoforms (Iwai & Inagami 1992) and 97% for the human isoforms (Konishi *et al.* 1994)) and are pharmacologically indistinguishable. In the liver of these species both isoforms seem to be coexpressed (Iwai & Inagami 1992, Konishi *et al.* 1994). The expression of mRNA for AT₁ receptors was tested using RT-PCR. The detection of a fragment of the size expected and that hybridized with the rat AT_{1B} receptor (under high stringency conditions) confirmed the previous findings. Due to the very high similarity between the AT₁ receptor isoforms, this approach does not allow us to define whether one or both receptor isoforms are expressed in guinea pig liver. Further experiments will be required to address this aspect.

In summary, our present data indicate that AT₁ receptors are expressed in guinea pig liver cells and that such receptors are coupled to phosphoinositide turnover and modulate glycogen metabolism.

Acknowledgements

This research was partially supported by a Grant from CONACyT (3170P-N9607). The authors express their gratitude to Gerardo Coello-Coutiño, Juan M. Barbosa and Rodrigo Montufar for their help. Dr Rafael Villalobos-Molina and Juan Javier López-Guerrero for the donation of some of the guinea pigs used in this work and Drs D. Nisato, C. Cazaubon (Sanofi), J. Powell (Bristol-Myers-Squibb Company) and R. D. Smith (DuPont) for generously providing the nonpeptide AT₁ angiotensin II antagonists, irbesartan and losartan respectively.

References

- Bauer PH, Chiu AT & Garrison JC 1991 DuP 753 can antagonize the effects of angiotensin II in rat liver. *Molecular Pharmacology* **39** 579–585.
- Berridge MJ, Dawson RMC, Downes P, Heslop JP & Irvine RF 1983 Changes in the level of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phospholipids. *Biochemical Journal* **212** 473–482.
- Berry MN & Friend DS 1969 High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *Journal of Cell Biology* **43** 506–520.
- Burgess GM, McKinney JS, Irvine RF & Putney JW Jr 1985 Inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4-trisphosphate formation in Ca²⁺-mobilizing-hormone-activated cells. *Biochemical Journal* **232** 237–243.
- Cazaubon C, Gougat J, Bousquet F, Guiraudou P, Gayraud R, Lacour C, Roccon A, Galindo G, Barthelemy G, Gautret B, Bernhart C, Perreaut P, Breliere J-C, Le Fur G & Nisato D 1993 Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT₁ subtype angiotensin II receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **265** 826–834.
- Cheng Y-C & Prusoff WH 1973 Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **22** 3099–3108.
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL & Timmermans PBMWM 1989 Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **165** 196–203.
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159.
- De Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T & Timmermans PBMWM 1995 Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25** 924–927.
- DeWitt LM & Putney JW Jr 1983 Stimulation of glycogenolysis in hepatocytes by angiotensin II may involve both calcium release and calcium influx. *FEBS Letters* **160** 259–263.
- Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM & Dy R 1995 Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells Separation of the major calcium-regulated tyrosine kinase from p125FAK. *Journal of Biological Chemistry* **1995** 28440–28447.
- García-Sáinz JA & Macías-Silva M 1990 Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylation through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **172** 780–785.
- García-Sáinz JA, Macías-Silva M, Olivares-Reyes JA & Romero-Avila MT 1992 Histamine activates phosphorylase and inositol phosphate production in guinea pig hepatocytes. *European Journal of Pharmacology* **227** 325–331.
- González-Espinosa C & García-Sáinz JA 1992 Angiotensin II and active phorbol esters induce protooncogene expression in isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1136** 309–314.
- González-Espinosa C & García-Sáinz JA 1996 Hormonal modulation of c-fos expression in isolated hepatocytes: Effects of angiotensin II and phorbol myristate acetate on transcription and mRNA degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1310** 217–222.
- Huckle WR, Prokop CA, Sy RC, Herman B & Earp S 1990 Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology* **10** 6290–6298.
- Iwai N & Inagami T 1992 Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Letters* **298** 257–260.
- Jackson EK & Garrison JC 1996 Renin and angiotensin. In *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. chapter 31, pp 733–758. Eds JG Hardman, LE Limbird, PB Molinoff, RW Ruddon & AG Gilman. New York: McGraw-Hill.
- Kambayashi Y, Bardham S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T & Inagami T 1993 Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **268** 24543–24546.
- Konishi H, Kuroda S, Inada Y & Fujisawa Y 1994 Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor: cDNA cloning and expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199** 467–474.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193** 265–275.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P & Bernstein KE 1995a Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* **375** 247–250.
- Marrero M, Schieffer B, Paxton W G, Schieffer E & Bernstein KE 1995b Electrophoretic of pp60c-src antibodies inhibit the angiotensin II activation of phospholipase C-γ1 in rat aortic smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* **270** 15734–15738.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horuchi M, Sasamura H, Pratt RE & Dzau VJ 1993 Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *Journal of Biological Chemistry* **268** 24539–24542.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS & Bernstein KE 1991 Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351** 233–236.
- Neville JDM 1968 Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* **154** 540–552.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardham S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y & Inagami T 1991 Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351** 230–232.
- Stalmans W & Hers H-G 1975 The stimulation of liver phosphorylase b by AMP, fluoride and sulfate. A technical note on the specific determination of the a and b forms of liver glycogen phosphorylase. *European Journal of Biochemistry* **54** 341–350.
- Zhang J & Pratt RE 1996 The AT₂ receptor selectively associates with G_{i2} and G_{i3} in the rat fetus. *Journal of Biological Chemistry* **271** 15026–15033.

Received 8 October 1996

Revised manuscript received 12 December 1996

Accepted 25 February 1997