



Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INFLUENCIA DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE
LA FUNCION RENAL
I. EFECTO SOBRE LA SECRECION DE RENINA**

T E S I S

**Que para obtener el grado de Doctor en
CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)**

P r e s e n t a

JOSE PEDRAZA CHAVERRI



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

23

JURADO

Presidente.
1er. vocal.
2do. vocal.
3er. vocal.
Secretario.
Suplente.
Suplente.

DR. ANTONIO PEÑA
DRA. VICTORIA CHAGOYA
DRA. HERMINIA PASANTES
DR. ADOLFO GARCIA SAINZ
DRA. ROSARIO MUÑOZ CLARES
DR. ALFONSO CARABEZ T.
DR. VÍCTOR MANUEL LOYOLA

EL DIRECTOR DE LA TESIS

DR. J. ADOLFO GARCIA-SAINZ

EL SUSTENTANTE

M. en C. JOSE PEDRAZA-CHAVERRI

RESUMEN

En este trabajo se estudia la influencia de la toxina pertussis sobre la regulación adrenérgica de la secreción de renina tanto en el animal completo (ratas despiertas y ratas anestesiadas) como en un sistema in vitro de rebanadas de corteza renal. En las ratas despiertas control la administración subcutánea de epinefrina no modifica la secreción de renina, pero en las ratas tratadas con toxina pertussis la aumenta de manera importante. El efecto de la epinefrina es bloqueado por propranolol, y es reproducido en las ratas control cuando la yohimbina es administrada antes que la epinefrina. La clonidina disminuye mucho más la secreción de renina en las ratas control que en las ratas tratadas con toxina pertussis. El isoproterenol estimula mucho más la secreción de renina en las ratas tratadas con toxina pertussis que en las ratas control. Los anestésicos aumentan de manera importante la secreción de renina en las ratas control. Este efecto estimulador de los anestésicos es aumentado de manera notoria en las ratas tratadas con toxina pertussis. El propranolol bloquea el efecto de los anestésicos en ambos grupos de ratas, lo cual sugiere la participación del sistema adrenérgico en este efecto. El aumento de la secreción de renina en ratas tratadas con toxina pertussis es debido principalmente al aumento de las acciones beta adrenérgicas. En las rebanadas de corteza renal se observa que la epinefrina y el isoproterenol estimulan, mientras que la clonidina disminuye la secreción de renina en el grupo de ratas control. La toxina pertussis: a) aumenta significativamente la secreción basal de renina, b) desplaza a la izquierda la curva concentración-respuesta para isoproterenol y epinefrina y aumenta la respuesta a epinefrina y c) bloquea el efecto inhibitorio de la clonidina sobre la secreción de renina. En conclusión: la toxina pertussis modifica la regulación adrenérgica de la secreción de renina, bloquea la modulación alfa₂ adrenérgica de la liberación de renina y aumenta la secreción de renina debida a estimulación beta adrenérgica tanto in vivo como in vitro.

SUMMARY

The influence of pertussis toxin on the adrenergic regulation of renin secretion it was studied in this work. The study was made in conscious and anesthetized rats and in a system of renal cortical slices. In conscious rats the subcutaneous administration of epinephrine did not modified the renin secretion, but in pertussis toxin-treated rats it was increased significantly. The effect of epinephrine was blocked by propranolol and it was reproduced in control rats when yohimbine was given before epinephrine. Clonidine decreased at much more significant extent renin secretion in control rats than in animals treated with the toxin. Isoproterenol stimulated renin secretion to a greater level in toxin-treated rats. The anesthetics increased renin secretion and this effect was markedly magnified in rats treated with pertussis toxin. Propranolol partially blocked the increase of renin secretion produced by anesthetics. This result indicate that the adrenergic system is involved in this effect and that pertussis toxin magnifies it by potentiating beta-adrenergic action. In renal cortical slices from control group it was observed that isoproterenol and epinephrine stimulated renin secretion and that clonidine decreased both basal and isoproterenol stimulated renin secretion. Pertussis toxin: a) increased significantly basal renin secretion, b) displaced to the left the concentration-response curve for isoproterenol and epinephrine and magnified the response to epinephrine and c) abolished the inhibitory effect of clonidine on renin secretion. In conclusion, pertussis toxin modifies the adrenergic regulation of renin secretion, blocks the α_2 -adrenergic modulation of renin release and magnifies the ability of beta-adrenergic activation to stimulate renin secretion.

**ESTA TESIS SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL DEL
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN" BAJO LA DIRECCION DEL
DOCTOR J. ADOLFO GARCIA-SAINZ.**

**ESTA TESIS FUE APOYADA PARCIALMENTE
POR UN DONATIVO DEL CONSEJO NACIONAL
DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
PCSABNA 22620**

A MIS PADRES

Abelardo e Isaura

A MIS HERMANOS

Fernando, Adolfo, Rosa María

Jesús, Eduardo, Marcela Elisa

y Adriana

A MI ESPOSA

Edilia

AGRADEZCO AL DOCTOR JOSE CARLOS PEÑA, JEFE DEL
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL
DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR
ZUBIRAN" SU APOYO CONTINUO PARA LA REALIZACION
DE ESTA TESIS

**AGRADEZCO AL DOCTOR J. ADOLFO GARCIA-
SAINZ, SU APOYO, ESTIMULO Y DIRECCION
PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

I N D I C E

- I. INTRODUCCION
 - 1. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.
 - 2. LOS RECEPTORES ADRENERGICOS.
 - 3. LA TOXINA PERTUSSIS.
- II. OBJETIVOS.
- III. EXPERIMENTAL.
- IV. RESUMEN DE RESULTADOS.
- V. DISCUSION GENERAL.
- VI. CONCLUSIONES.
- VII. REFERENCIAS.

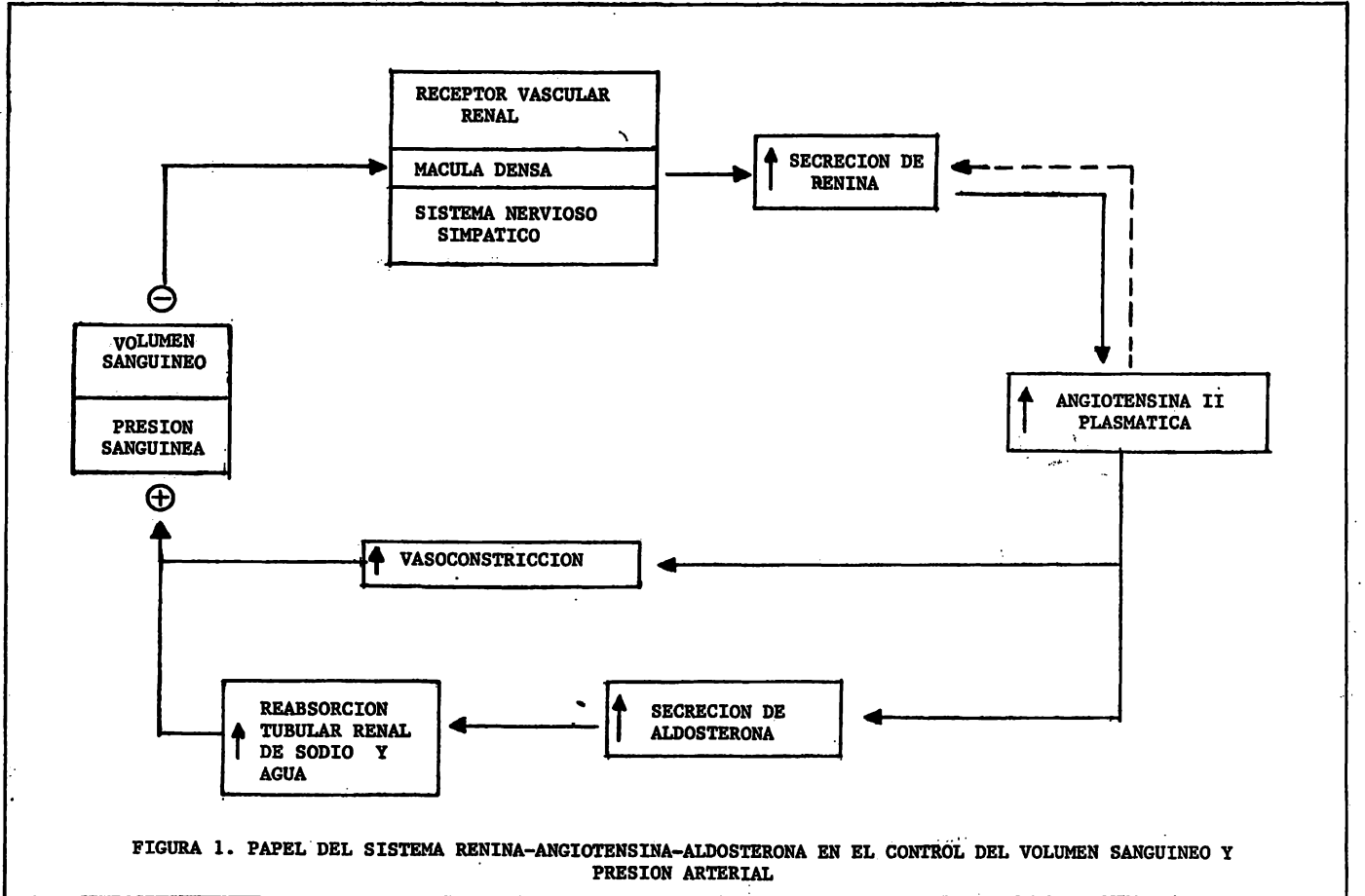
I. INTRODUCCION

1. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.

La investigación continua en las dos últimas décadas ha establecido que el sistema renina-angiotensina-aldosterona, es un sistema hormonal importante que juega un papel central en el balance de líquidos y electrolitos y de la presión arterial (Figura 1). Participa de manera importante en algunos tipos de hipertensión, lo cual, desde el punto de vista clínico, ha estimulado el interés por conocer la estructura, localización, regulación de síntesis y secreción y mecanismo de acción de cada uno de los componentes. Las moléculas que componen este sistema son: las enzimas: a) renina (EC 3.4.99.19), b) convertidora de angiotensina I (EC 3.4.15.1) y c) angiotensinasas; los péptidos: a) angiotensina I, b) angiotensina II y c) angiotensina III; la globulina alfa₂ (angiotensinógeno) y la hormona esteroide aldosterona.

En forma resumida, el sistema funciona de la siguiente manera (Figura 2 y referencia 1): la renina que se sintetiza principalmente a nivel renal, actúa en plasma sobre el sustrato angiotensinógeno, que es sintetizado principalmente en el hígado. Producto de esta reacción hidrolítica es la liberación del decapeptido angiotensina I (extremo amino del angiotensinógeno). Este péptido tiene poca o nula actividad biológica, y fisiológicamente es transformado al octapeptido angiotensina II por la acción de la enzima convertidora. Esta enzima es una dipeptidil dipéptido hidrolasa que remueve en un paso los dos aminoácidos (His-Leu) del extremo carboxilo de la angiotensina I.

Algunas de las acciones fisiológicas de la angiotensina II son: a) su potente efecto vasoconstrictor (50 veces mayor al de la norepinefrina), b) estimulación de la liberación de aldosterona que a su vez promueve la reabsorción de sodio y agua, c) estimulación de la sed, d) inhibición de la secreción de renina y e) estimulación de la secreción de angiotensinógeno. La angiotensina II tiene una vida media muy corta (aproximadamente 30 segundos) y su producción continua depende de la presencia de sustrato de renina. Sin embargo, la concentración de angiotensinógeno en sangre es generalmente constante, y de hecho es la cantidad de renina circulante, la limitante principal en la producción de angiotensina II *in vivo*. A pesar de que la renina tiene una vida media mucho mas larga (de 4 a 15 minutos) en



circulación, se requiere de un estímulo constante para la secreción de esta enzima. La angiotensina III es producida por la acción de la angiotensinasa A sobre la angiotensina II, removiendo el aminoácido del extremo amino terminal (ácido aspártico) de la angiotensina II para formar el heptapéptido correspondiente, que también estimula la secreción de aldosterona. Como angiotensinasas se conocen colectivamente a un grupo de enzimas hidrolíticas (aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas) que degradan a las angiotensinas a los correspondientes aminoácidos (Figura 2).

La renina es la enzima principal y limitante de la velocidad del sistema, fue descubierta por Tigerstedt y Bergman en 1898 (2). Estos investigadores habían mostrado que cuando se administraban intravenosamente extractos salinos de riñón de conejo a conejos, producían una sorprendente elevación de la presión sanguínea. A pesar de su descubrimiento temprano, la importancia real de la renina, no fue apreciada sino hasta después del trabajo de Harry Goldblatt en 1934. En una serie de experimentos clásicos (3-5), Goldblatt produjo hipertensión, en animales de laboratorio, demostró que la hipertensión tenía bases humorales y probó que era de origen renal. El descubrió que una reducción moderada del flujo sanguíneo, producida al colocar una pinza de plata en ambas arterias renales (2 pinzas, 2 riñones) o bien solo en una arteria (1 pinza, 2 riñones) producía una forma de hipertensión arterial persistente que se parecía mucho a la forma humana de la enfermedad. Más tarde Goldblatt demostró que:

a) La elevación de la presión sanguínea que sigue a la constricción de la arteria no pudo ser impedida por la simpatectomía completa, ni por la destrucción de la médula espinal, ni por trasplante del riñón isquémico denervado.

b) Si las venas renales eran ligadas al animal, este se hacía normotenso y posteriormente moría por uremia.

Esto sugería que esta forma de hipertensión era causada directa o indirectamente por una sustancia humoral o sustancias liberadas por el riñón isquémico. Estos trabajos clásicos de Goldblatt condujeron inmediatamente a la búsqueda del agente humoral responsable de la elevación de la presión en la hipertensión, e hizo que se redescubriera la renina descrita mucho tiempo antes por Tigerstedt y Bergman (2).

Dos grupos de investigadores encontraron que la renina no era *per se* una sustancia vasoconstrictora. Page y Helmer en los Estados Unidos en 1940 (6) y

BIOQUIMICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

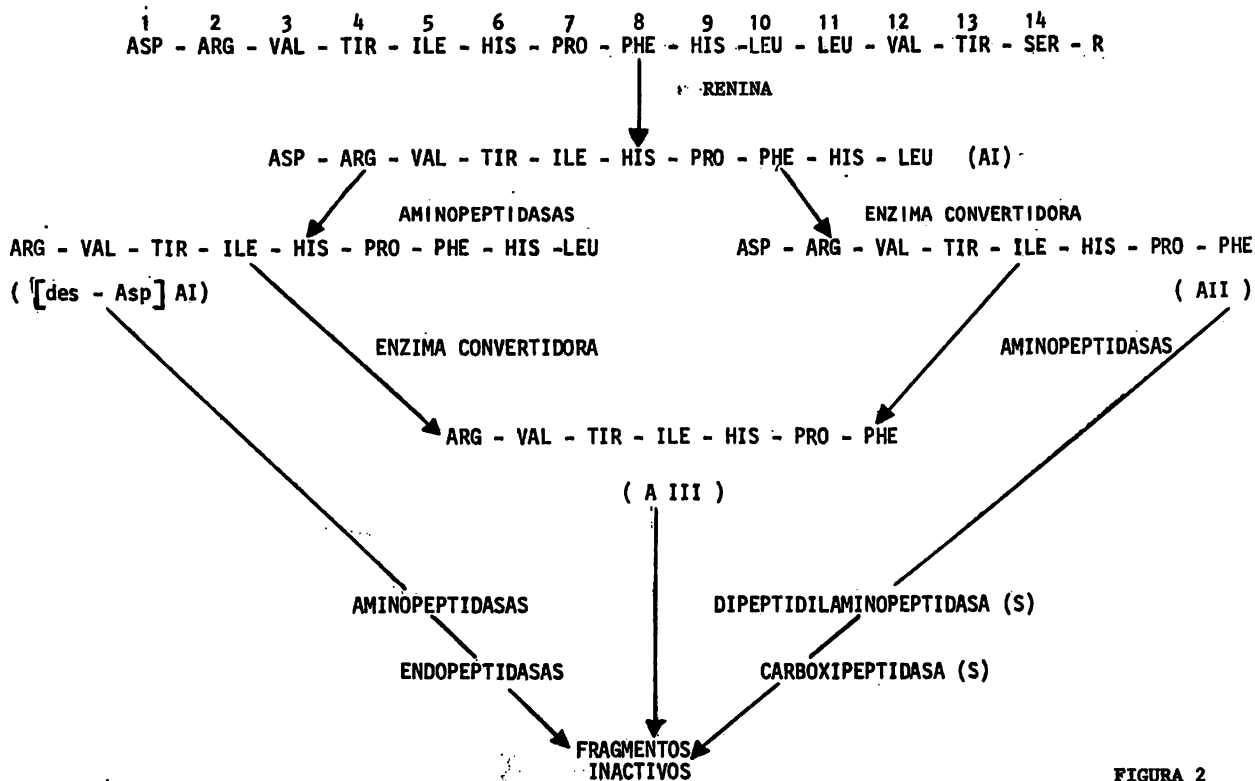


FIGURA 2

Braun-Menéndez y su grupo también en 1940 en Argentina (7) encontraron que la renina actuaba sobre una sustancia presente en plasma para producir otra sustancia estable al calor y vasoconstrictora de corta duración. Page y Helmer nombraron a esta nueva sustancia "angiotonina", mientras Braun-Menéndez y su grupo usaron el término "hipertensina". Finalmente, después de un período de muchos años, en que se conoció que eran exactamente la misma sustancia, acordaron estos dos grupos en una reunión en 1961 en el Universidad de Michigan llamarla "angiotensina".

Dos experimentos probaron que la renina y la angiotensina eran verdaderos mediadores en la hipertensión en humanos y en la hipertensión experimental en animales.

a) Se encontró que los niveles de angiotensina en sangre de pacientes con hipertensión maligna estaban elevados 20 veces sobre el normal. Los niveles de angiotensina eran medidos en un extracto purificado a partir de la sangre de pacientes por su capacidad vasopresora en ratas (8).

b) La presión sanguínea en perros con hipertensión experimental pudo disminuirse a los niveles normales por inmunización con extractos de riñón de cerdo que contienen renina (9-11).

La primera preparación pura de angiotensina se obtiene por incubación *in vitro* de renina cruda preparada a partir de riñón de cerdo con sustarto de renina preparado de plasma de caballo (12). Pronto se conoció su composición y secuencia de aminoácidos (13). La secuencia de aminoácidos de angiotensina de varias especies se muestra en la Figura 3, es de notarse que los aminoácidos que cambian en las diferentes especies son el 1, el 5 y el 9. El procedimiento para la preparación de angiotensinógeno para la incubación con renina cruda en la preparación *in vitro* de angiotensina, involucraba el fraccionamiento con sulfato de amonio seguido por diálisis contra agua destilada. Por razones desconocidas por los autores (14), decidieron en una ocasión dializar contra solución salina en vez de hacerlo contra agua destilada; con este procedimiento el producto tenía la misma actividad vasopresora en ratas, pero tenía propiedades químicas totalmente diferentes. Así se descubrió por casualidad que la angiotensina está presente en dos formas (14). Una de ellas se obtenía al dializar contra agua destilada y la otra al dializar contra solución salina. Así se descubrió la existencia de una enzima activada por cloruros la cual fue llamada enzima convertidora de angiotensina que estaba presente en plasma (y en la preparación del sustarto crudo de renina), y que convierte al sustrato inicial de la reacción, angiotensina I al octapéptido angiotensina II.

ESTRUCTURA DE ANGIOTENSINA I EN ESPECIES DE VERTEBRADOS REPRESENTATIVAS

| | |
|--|--|
| PEZ TELEOSTEO A GLOMERULAR (PEZ GANSO) | <u>ASN-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-PHE-HIS-LEU</u> |
| PEZ TELEOSTEO GLOMERULAR (SALMON) | <u>ASN-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-PHE-ASN-LEU</u> |
| ANFIBIOS (RANA TORO) | <u>ASP-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-PHE-ASN-LEU</u> |
| REPTIL (SERPIENTE) | <u>ASX-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-PHE-TIR-LEU</u> |
| PAJARO (POLLO) | <u>ASP-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-PHE-SER-LEU</u> |
| MAMIFERO (BOVINO) | <u>ASP-ARG-VAL-TIR-VAL-HIS-PRO-PHE-HIS-LEU</u> |
| MAMIFERO (CABALLO, CERDO, RATA, PERRO, HUMANO, CONEJO, CABALLO) | <u>ASP-ARG-VAL-TIR-ILE-HIS-PRO-PHE-HIS-LEU</u> |

FIGURA 3

RENINA

La renina es sintetizada, almacenada y secretada por las células granulares del aparato yuxtaglomerular. Cada nefrona tiene una región conocida como el aparato yuxtaglomerular el cual está compuesto de: a) células granulares, b) células agranulares, c) mácula densa y d) células mesangiales (Figura 4). Las células granulares son células de músculo liso diferenciadas, que se encuentran normalmente en la media de la arteriola aferente adyacente al glomérulo. Estas células contienen un retículo endoplásmico bien desarrollado y membranas de Golgi, características citológicas que son consistentes con una función endócrina. Los nervios simpáticos renales inervan las células granulares del aparato yuxtaglomerular. La renina también se ha localizado en varios tejidos tales como útero, placenta, cerebro, hipotálamo, glándula pineal, pared de arterias y venas y en la glándula submaxilar.

En la actualidad se han descrito al menos cinco mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina en riñón, éstos son: a) un barorreceptor intrarrenal que responde a cambios en la presión sanguínea, b) la cantidad del ión sodio (o posiblemente cloruro) que pasa por el segmento de mácula densa del túbulo distal, c) el sistema nervioso simpático y las catecolaminas circulantes, d) otros factores hormonales (e.g. angiotensina II, prostaglandinas, esteroides) y f) otros electrolitos plasmáticos (calcio, potasio, etc.) (15).

La renina es sintetizada como una preproenzima, cuya secuencia de aminoácidos ha sido obtenida tanto de glándula submaxilar de ratón (16,17) como de riñón humano (referencia 18 y figura 5). En 1982, la secuencia de aminoácidos de la renina se obtuvo por la técnica convencional de secuenciación de aminoácidos (16) y a partir de la secuencia de nucleótidos del ADN complementario del precursor de renina (17). La secuencia de la prepro-renina humana fue deducida del análisis de la secuencia de su ADNc (18). La renina humana tiene 406 aminoácidos con un pre y un prosegmento de 20 y 46 aminoácidos respectivamente. El peso molecular de la preprorenina humana es de 45,067 y de la renina humana de 37,235 daltones. La renina de la glándula submaxilar de ratón tiene un pre y prosegmento de 18 y 45 aminoácidos respectivamente. La renina en ratón es de 338 (16) o 333 (17) aminoácidos, y consiste de una cadena pesada (64-353) y una ligera (354-401). La comparación de la secuencia de aminoácidos de la renina de riñón humano con la renina de glándula submaxilar de ratón indica un alto grado de homología entre las dos

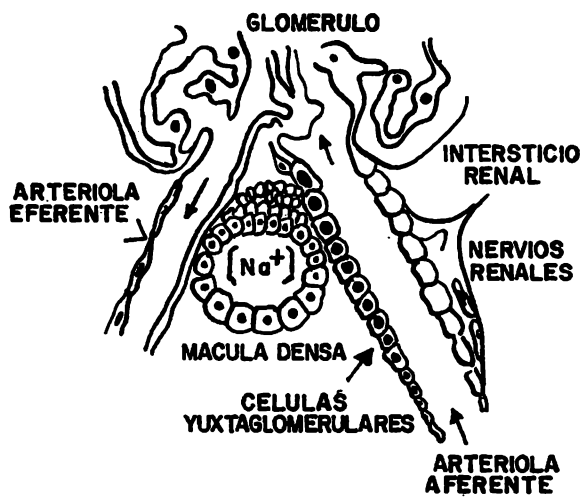


FIG. 4
EL APARATO YUXTAGLOMERULAR

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Humana | Met | Asp | Gli | Trp | Arg | Arg | Met | Pro | Arg | Trp | Gli | Leu | Leu | Leu | Leu | Trp | Gli | Ser | Cis | |
| Murina | Met | Asp | Arg | Arg | Arg | Met | Pro | Leu | Trp | Ala | Leu | Leu | Leu | Leu | Trp | Ser | Pro | Cis | | |
| Humana | Thr | Phe | Gly | Leu | Pro | Thr | Asp | Thr | Thr | Thr | Phe | Lis | Arg | Ile | Phe | Leu | Lis | Arg | Met | Pro |
| Murina | Thr | Phe | Ser | Leu | Pro | Thr | Gli | Thr | Thr | Phe | Glu | Arg | Ile | Pro | Leu | Lis | Lis | Met | Pro | |
| Humana | Ser | Ile | Arg | Glu | Ser | Leu | Lis | Glu | Arg | Gli | Val | Asp | Met | Ala | Arg | Leu | Gli | Pro | Glu | Trp |
| Murina | Ser | Val | Arg | Glu | Ile | Leu | Glu | Glu | Arg | Gli | Val | Asp | Met | Thr | Arg | Leu | Ser | Ala | Glu | Trp |
| Humana | Ser | Gln | Pro | Met | Lis | Arg | Leu | Thr | Leu | Gli | Asn | Thr | Thr | Ser | Ser | Val | Ile | Leu | Thr | Asn |
| Murina | Asp | Val | Phe | Thr | Lis | Arg | Ser | Ser | Leu | Thr | Asp | Leu | Ile | Ser | Pro | Val | Leu | Thr | Asn | |
| Humana | Tir | Met | Asp | Thr | Gln | Tir | Tir | Gli | Glu | Ile | Gli | Ile | Gli | Thr | Pro | Pro | Gln | Thr | Phe | Lis |
| Murina | Tir | Leu | Asn | Ser | Gln | Tir | Tir | Gli | Glu | Ile | Gli | Ile | Gli | Thr | Pro | Pro | Gln | Thr | Phe | Lis |
| Humana | Val | Val | Phe | Asp | Thr | Gli | Ser | Ser | Asn | Val | Trp | Val | Pro | Ser | Ser | Lis | Cis | Ser | Arg | Leu |
| Murina | Val | Ile | Phe | Asp | Thr | Gli | Ser | Ala | Asn | Leu | Trp | Val | Pro | Ser | Thr | Lis | Cis | Ser | Arg | Leu |
| Humana | Tir | Thr | Ala | Cis | Val | Tir | His | Lis | Leu | Phe | Asp | Ala | Ser | Asp | Ser | Ser | Ser | Tir | Lis | His |
| Murina | Tir | Leu | Ala | Cis | Gli | Ile | His | Ser | Leu | Tir | Glu | Ser | Ser | Asp | Ser | Ser | Ser | Tir | Met | Glu |
| Humana | Asn | Gli | Thr | Glu | Leu | Thr | Leu | Arg | Tir | Ser | Thr | Gli | Thr | Val | Ser | Gli | Phe | Leu | Ser | Gln |
| Murina | Asn | Gli | Asp | Asp | Phe | Thr | Ile | His | Tir | Gli | Ser | Gli | Arg | Val | Lis | Gli | Phe | Leu | Ser | Gln |
| Humana | Asp | Ile | Ile | Thr | Val | Gli | Gli | Ile | Thr | Val | Thr | Gln | Met | Phe | Gli | Glu | Val | Thr | Glu | Met |
| Murina | Asp | Ser | Val | Thr | Val | Gli | Gli | Ile | Thr | Val | Thr | Gln | Thr | Phe | Gli | Glu | Val | Thr | Glu | Leu |
| Humana | Pro | Ala | Leu | Pro | Phe | Met | Leu | Ala | Glu | Phe | Asp | Gli | Val | Val | Gli | Met | Gli | Phe | Ile | Glu |
| Murina | Pro | Leu | Ile | Pro | Phe | Met | Leu | Ala | Gln | Phe | Asp | Gli | Val | Leu | Gli | Met | Gli | Phe | Pro | Ala |
| Humana | Gln | Ala | Ile | Gli | Arg | Val | Thr | Pro | Ile | Phe | Asp | Asn | Ile | Ile | Ser | Gln | Gli | Val | Leu | Lis |
| Murina | Gln | Ala | Val | Gli | Gli | Val | Thr | Pro | Val | Phe | Asp | His | Ile | Leu | Ser | Gln | Gli | Val | Leu | Lis |
| Humana | Glu | Asp | Val | Phe | Ser | Phe | Tir | Tir | Asn | Arg | Asp | Ser | Glu | Asn | Ser | Gln | Ser | Leu | Gli | Gli |
| Murina | Glu | Lis | Val | Phe | Ser | Val | Tir | Tir | Asn | Arg | Gli | Pro | His | Leu | Leu | Gli | Gli | | | |
| Humana | Gln | Ile | Val | Leu | Gli | Gli | Ser | Asp | Pro | Gln | His | Tir | Glu | Gli | Asn | Phe | His | Tir | Ile | Asn |
| Murina | Glu | Val | Val | Leu | Gli | Gli | Ser | Asp | Pro | Glu | His | Tir | Gln | Gli | Asp | Phe | His | Tir | Val | Ser |
| Humana | Leu | Ile | Lis | Thr | Gli | Val | Trp | Gln | Ile | Gln | Met | Lis | Gli | Val | Ser | Val | Gli | Ser | Ser | Thr |
| Murina | Leu | Ser | Lis | Thr | Asp | Ser | Trp | Gln | Ile | Thr | Met | Lis | Gli | Val | Ser | Val | Gli | Ser | Ser | Thr |
| Humana | Leu | Leu | Cis | Glu | Asp | Gli | Cis | Leu | Ala | Leu | Val | Asp | Thr | Gli | Ala | Ser | Tir | Ile | Ser | Gli |
| Murina | Leu | Leu | Cis | Glu | Glu | Gli | Cis | Glu | Val | Val | Val | Asp | Thr | Gli | Ser | Ser | Phe | Ile | Ser | Ala |
| Humana | Ser | Thr | Ser | Ser | Ile | Glu | Lis | Leu | Met | Glu | Ala | Leu | Gli | Ala | Lis | Lis | Arg | Leu | Phe | |
| Murina | Pro | Thr | Ser | Ser | Leu | Lis | Leu | Ile | Met | Gln | Ala | Leu | Gli | Ala | Lis | Glu | Lis | Arg | Leu | His |
| Humana | Asp | Tir | Val | Val | Lis | Cis | Asn | Glu | Gli | Pro | Thr | Leu | Pro | Asp | Ile | Ser | Phe | His | Leu | Gli |
| Murina | Glu | Tir | Val | Val | Ser | Cis | Ser | Gln | Val | Pro | Thr | Leu | Pro | Asp | Ile | Ser | Phe | Asn | Leu | Gli |
| Humana | Gli | Lis | Glu | Tir | Thr | Leu | Thr | Ser | Ala | Asp | Tir | Val | Phe | Gln | Glu | Ser | Tir | Ser | Ser | Lis |
| Murina | Gli | Arg | Ala | Tir | Thr | Leu | Ser | Ser | Thr | Asp | Tir | Val | Leu | Gln | Tir | Pro | Asn | Arg | Arg | Asp |
| Humana | Lis | Leu | Cis | Thr | Leu | Ala | Ile | His | Ala | Met | Asp | Ile | Pro | Pro | Pro | Thr | Gli | Pro | Thr | Trp |
| Murina | Lis | Leu | Cis | Thr | Val | Ala | Leu | His | Ala | Met | Asp | Ile | Pro | Pro | Pro | Thr | Gli | Pro | Val | Trp |
| Humana | Ala | Leu | Gli | Ala | Thr | Phe | Ile | Arg | Lis | Phe | Tir | Thr | Glu | Phe | Asp | Arg | Arg | Asn | Asn | Arg |
| Murina | Val | Leu | Gli | Ala | Thr | Phe | Ile | Arg | Lis | Phe | Tir | Thr | Glu | Phe | Asp | Arg | His | Asn | Asn | Arg |
| Humana | Ile | Gli | Phe | Ala | Leu | Ala | Arg | | | | | | | | | | | | | |
| Murina | Ile | Gli | Phe | Ala | Leu | Ala | Arg | | | | | | | | | | | | | |

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la renina de riñón humano y de glándula submaxilar de ratón

moléculas, la cual es de 68.7% incluyendo la presecuencia (Figura 5). La diferencia estructural mas sobresaliente entre ambas enzimas es la presencia de dos sitios de glucosilación (Asn-X-Thr) en la renina de riñón humano constituidos por los residuos 71-73 y 141-143, los cuales no son observados en la renina de ratón (18). Por analogía también a la renina de ratón la renina de riñón humano tendría dos cadenas, la pesada (67-360) y la ligera (361-406) (Figura 6). Se ha estudiado la maduración o procesamiento de la prepro-renina de la glándula submaxilar y se ha encontrado que el proceso involucra la ruptura proteolítica secuencial de la preproforma a la forma madura activa. La prepro-renina es rápidamente internalizada cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico rugoso e hidrolizada por una peptidasa (la cual hidroliza al péptido señal) para producir prorenina (Figura 7). En el aparato de Golgi la prorenina es convertida en 15 minutos a la renina que es enzimáticamente activa. En las siguientes 12 horas, un lento proceso intracelular remueve un dipéptido cerca del extremo carboxilo, y así convierte la renina de una cadena en renina de dos cadenas unidas por un puente disulfuro. Esta conversión ocurre durante la formación, condensación y empaquetamiento de los gránulos de renina. La molécula de renina intacta es obligatoria para que ocurra la actividad enzimática debido a que la cadena pesada sólo tiene poca o nula actividad. Tanto la renina de una o dos cadenas son secretadas, pero no la prepro-renina (Figura 7). Esto sugiere que la síntesis y secreción de renina es compleja y puede ser sujeta a regulación en múltiples pasos.

ANGIOTENSINOGENO

El angiotensinógeno (sustrato de renina) es una alfa₂-globulina, que es sintetizado en la rata como un precursor de 477 aminoácidos (referencia 19 y figura 8). El fragmento pre es de 24 aminoácidos. El peso molecular de la molécula completa libre de carbohidratos es de 49,548 daltones. Posee tres sitios potenciales de glucosilación, Asn-X-Ser (Thr) en las posiciones 47-49, 295-297 y 319-321. Es una proteína muy relacionada estructuralmente con la alfa₁-antitripsina, la anti-trombina III y la ovoalbúmina (20). Su concentración en plasma es de 4-7 mg/ml (21). Su principal sitio de síntesis es el hígado (21) aunque también hay evidencias que sugieren que puede ser sintetizado en riñón (21) y en cerebro (22). Se han usado varios modelos *in vitro* para el estudio de los factores que regulan la secreción de angiotensinógeno. Estos son: hígado perfundido (23,24), hepatocitos

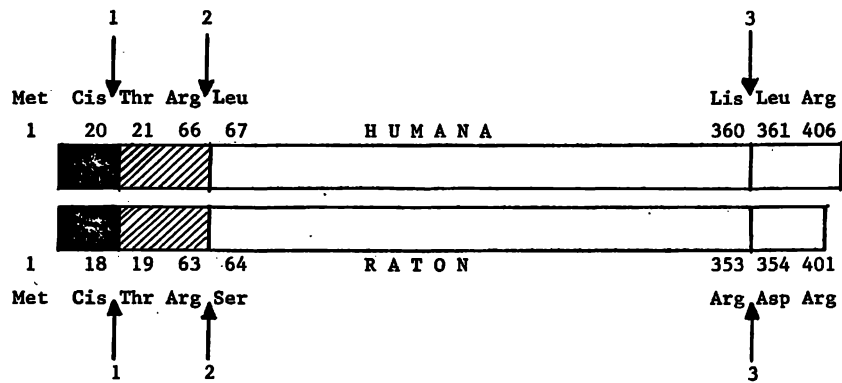


FIGURA 6. PROCESAMIENTO DE PREPRORENINA HUMANA Y DE RATON

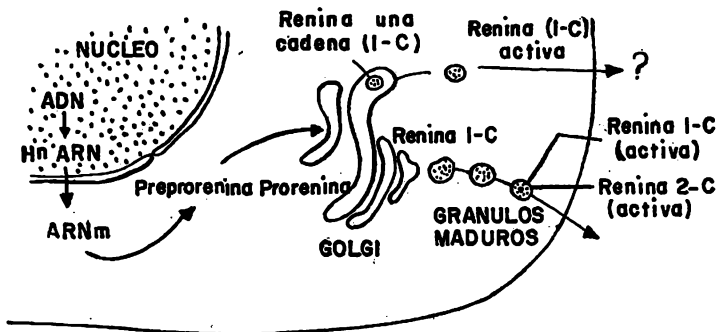
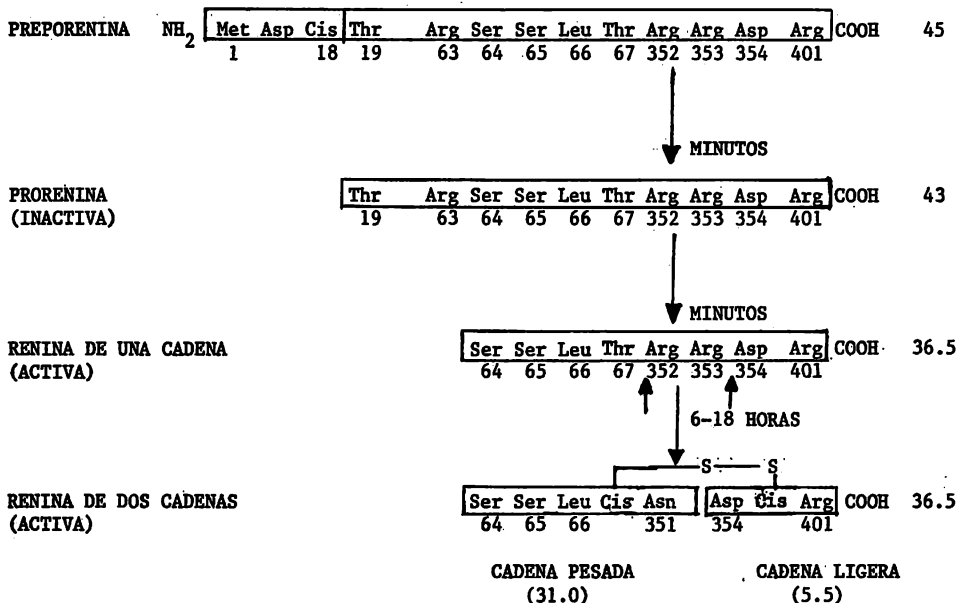


FIGURA 7 MODELO PARA LA BIOSINTESIS Y SECRECION DE RENINA DE RATON

aislados (25,26), rebanadas de hígado (27,28). Estos estudios han demostrado que los estrógenos, los glucocorticoides, la insulina, las prostaglandinas, la angiotensina II y la binefrectomía estimulan la secreción de angiotensinógeno. Por el contrario se ha demostrado que la tiroidectomía y la adrenalectomía disminuyen el nivel plasmático de angiotensinógeno.

ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

La enzima convertidora de angiotensina I (peptidil dipéptido hidrolasa, EC 3.4.15.1) es una exopeptidasa que cataliza la ruptura de unidades peptídil del extremo carboxilo de varios oligopéptidos sintéticos y naturales. Los sustratos fisiológicos son angiotensina I y bradícina (referencia 29 y figura 9). La enzima es una metaloproteína (es inhibida por EDTA) y es dependiente de cloruros. La enzima en mamíferos es una glucoproteína de un peso molecular de 130,000-140,000 daltones, que está compuesta de una sola cadena polipeptídica y que tiene asociado un equivalente molar de Zinc. La enzima existe en una amplia variedad de organismos desde bacterias hasta mamíferos (29). Esta presente virtualmente en todos los órganos y líquidos corporales de los mamíferos. Se han desarrollado inhibidores específicos y potentes de esta enzima en base a sus propiedades y mecanismos de acción. Estos agentes suprimen la respuesta vasopresora de angiotensina II, potencian los efectos vasodepresores de bradícina y revierten la hipertensión experimental dependiente de renina. Uno de los inhibidores más usados en humanos es el captopril (SQ 14,225). A pesar de la gran cantidad de información de la actividad de la enzima convertidora en tejidos y suero sanguíneo en un gran número de estados fisiológicos y patológicos, se conoce muy poco acerca del mecanismo de biosíntesis y secreción de esta enzima.

2. LOS RECEPTORES ADRENERGICOS

Las hormonas adrenérgicas (epinefrina y norepinefrina) ejercen su acción a través de receptores específicos que están localizados en la membrana plasmática

celular. Estos receptores se han clasificado en cuatro subtipos, a saber: β_1 , β_2 , α_1 y α_2 (Figura 10). Los dos primeros son isorreceptores, ya que están acoplados estimulatoriamente a la adenilato ciclasa. Esto es, cuando estos receptores interactúan con las hormonas adrenérgicas naturales o agonistas sintéticos, activan a la adenilato ciclasa; como consecuencia producen un aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc el cual va a producir una serie de eventos intracelulares tales como la activación de cinasas de proteínas. La subclasificación en β_1 y β_2 está dado por el orden de potencia de los agonistas naturales y sintéticos. Los receptores β_2 están involucrados en la broncodilatación y son activados preferentemente por epinefrina, mientras que la norepinefrina tiene poca actividad. Por el contrario, la epinefrina y la norepinefrina son activadores equipotentes de los receptores β_1 en corazón y en tejido adiposo en donde son responsables del inotropismo positivo y la activación de la lipólisis respectivamente (31). Otros efectos mediados por el AMPc intracelular son: en músculo liso, la relajación; en plaquetas, la inhibición de su agregación; en páncreas, el aumento en la liberación de insulina; en hígado, activación de la fosforilasa de glucógeno e inactivación de la sintetasa de glucógeno. Se ha sugerido que los efectos β_1 son debidos a la norepinefrina liberada por los nervios simpáticos, mientras que los efectos β_2 son debidos a los efectos hormonales de la epinefrina liberada por la médula adrenal (32). Los agonistas naturales y sintéticos para los receptores β_1 son la norepinefrina y el prenalterol y para los receptores β_2 son la epinefrina y la terbutalina. El metoprolol y la butoxamina son inhibidores específicos para los receptores β_1 y β_2 respectivamente. El isoproterenol es un agonista sintético no específico y más potente que la epinefrina y la norepinefrina, mientras que el propranolol es un antagonista no específico para los subtipos beta.

Los receptores α_1 y α_2 no son isorreceptores, ya que el mecanismo por medio del cual transducen su señal al interior de las células es diferente (33,34). La estimulación de los receptores α_2 inhibe a la adenilato ciclasa con lo cual disminuyen las concentraciones intracelulares de AMPc. Este efecto es opuesto al observado por la estimulación de los receptores beta adrenérgicos. Por otra parte, la estimulación de los receptores α_1 produce un aumento en el recambio de un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol y un aumento en la concentración intracelular de calcio. En el caso de los receptores beta y α_2 adrenérgicos, el segundo mensajero es el AMPc; por lo que respecta al segundo mensajero en el caso de los receptores α_1 adrenérgicos no parece estar muy claro. Actualmente

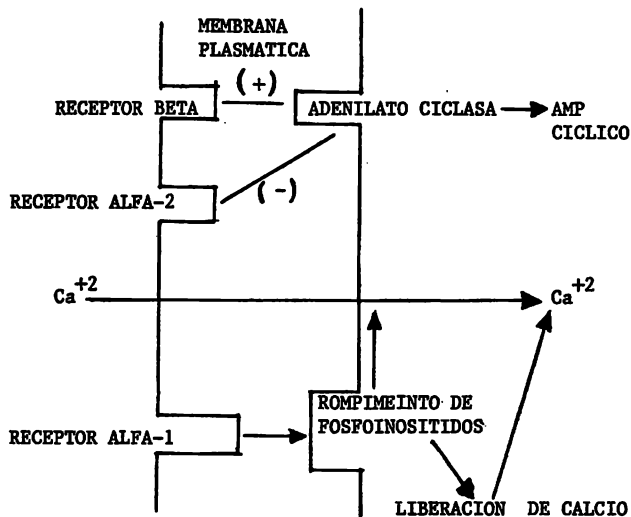


FIGURA 10 MODELO PARA LA ACCION DE LAS CATECOLAMINAS

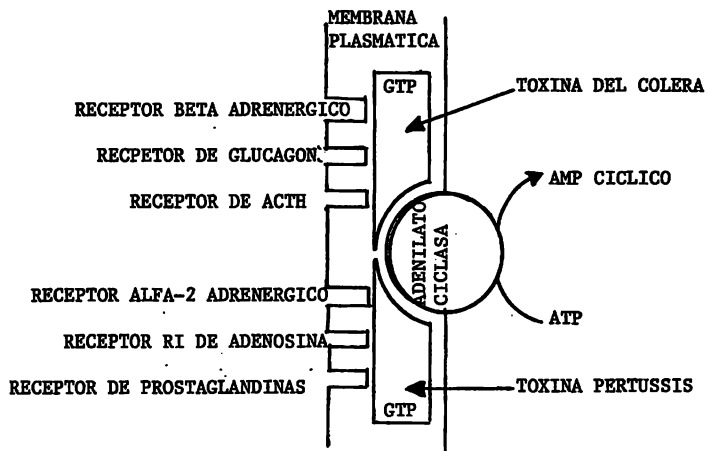


FIGURA 11. MODELO PARA LA ACTIVACION E INHIBICION DE LA ADENILATO CICLASA.

se sugiere la existencia de dos tipos de receptores α_1 , cada uno diferenciado por su efecto intracelular último (35). McGrath ha sugerido (36) que la respuesta α_1 es debida a la liberación simpática de norepinefrina en las terminales nerviosas. Por el contrario la epinefrina liberada como hormona por la médula adrenal trabaja más lentamente y media las respuestas α_2 . Los agonistas naturales y sintéticos para α_1 son: la norepinefrina y la fenilefrina, y para α_2 son la epinefrina y la clonidina. La prazosina y la yohimbina son los antagonistas de los receptores α_1 y α_2 respectivamente. La estimulación de la respuesta α_2 adrenérgica produce los siguientes efectos: en músculo liso, contracción; en plaquetas, agregación; en páncreas, disminución de la secreción de insulina; en adipocitos inhibición de la lipólisis y activación de la sintetasa de glucógeno. La estimulación de la respuesta α_1 adrenérgica produce los siguientes efectos: en músculo liso contracción; en hígado aumenta la actividad de la fosforilasa de glucógeno; en adipocitos inactivación de la sintetasa de glucógeno. Los receptores beta y α_2 adrenérgicos está acoplados estimulatoria e inhibitoriamente a la adenilato ciclasa a través de las proteínas N_s (n estimulatoria) y N_i (N inhibitoria) respectivamente. Estas proteínas unen nucleótidos de guanina los cuales regulan el estado de afinidad de los receptores por las hormonas. La proteína N_s es el blanco de la toxina colérica. La modificación de N_s por la toxina colérica (ADP ribosilación) produce una estimulación consatnte de la adenilato ciclasa aún en ausencia de agonistas beta adrenérgicos. Por otra parte N_i es el sustrato de la toxina pertussis. La consecuencia de esta modificación (ADP ribosilación) es una inactivación de la actividad de N_s , por lo tanto una incapacidad de esta proteína para tranducir señales inhibitorias de receptores acoplados inhibitoriamente a la adenilato ciclasa a esta enzima.

Actualmente se cuenta con técnicas que permiten cuantificar el número de receptores adrenérgicos en la membrana (B_{max}) y conocer su afinidad (K_d). Esto se ha logrado con la técnica de unión de ligandos radiactivos a preparaciones de membranas con el receptor a estudiar (37). A continuación se anotan algunos radioligandos usados en estos estudios: dihidroalprenolol- 3H , hidroxibenzilpindolol- ^{125}I , carazolol- 3H para receptores beta adrenérgicos; dihidroergocriptina- 3H para receptores α_1 y α_2 ; prazosina- 3H y WB4101- 3H para α_1 , mientras que yohimbina- 3H es selectivo para receptores α_2 . Con el ligando se construye una curva de saturación, cuya transformación de acuerdo a Scatchard produce una línea recta, cuya pendiente es la K_d , la cual es una medida de la afinidad del receptor

por el ligando, y el intercepto con el eje de las abscisas es el número de sitios (B max). Usando esta metodología se puede estudiar el estado de afinidad de los receptores adrenérgicos. La afinidad de los receptores beta por la hormona esta regulado por los nucleótidos de guanina. Estos nucleotidos reducen la afinidad de los agonistas, pero no de los antagonistas beta adrenérgicos (37). Esto se puede estudiar con curvas de desplazamiento del radioligando unido por un antagonista o agonista no radiactivo. Cuando el desplazamiento se hace con un antagonista, se observa una afinidad homogénea del receptor. Por el contrario cuando se usa un agonista total para realizar el desplazamiento, se observa una afinidad heterogénea del receptor. Este es el caso del desplazamiento del dihidroalprenolol-³H cuando es desplazado con isoproterenol, en este caso se obtiene un 77% de los receptores en alta afinidad y un 23% en baja afinidad. Cuando este mismo desplazamiento se realiza en presencia de altas concentraciones de GTP (1×10^{-4} M) la curva se desplaza a la derecha y llega a tener mas pendiente. Sin embargo, ahora todos los receptores muestran una afinidad baja y homogéna para el agonista. Esta metodología ha sido empleada para investigar las posibles alteraciones de los receptores adrenérgicos en distintas células, sobre todo de sangre periférica, en el humano. Recientemente se ha publicado un revisión, en la cual se mencionan las alteraciones de los receptores adrenérgicos en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, y bajo la influencia de diferentes agentes farmacológicos (38).

3. LA TOXINA PERTUSSIS.

La *Bordetella pertussis*, el microorganismo que causa la tosferina, secreta una toxina proteínica que produce una variedad de respuesta fisiológicas que incluyen: inducción de linfocitosis, sensibilización de los animales a los efectos letales de la histamina, estimulación de la secreción de insulina y estimulación de la lipólisis en los adipocitos (30,39). Esta toxina ha sido llamada factor promotor de linfocitosis (40), proteína activadora de los islotes (41), factor sensibilizador de histamina, pertusígeno y toxina pertussis (42). Además de sus acciones celulares, la toxina pertussis actúa como hemaglutinina y sirve como un importante inmunógeno para la protección de ratones contra el reto con *Bordetella pertussis* (43).

Recientemente se ha encontrado una explicación a nivel molecular de algunas

de las acciones biológicas de la toxina pertussis. En primer lugar se observó una marcada disminución de la sensibilidad a los agentes alfa₂ adrenérgicos y a otras hormonas cuyos receptores están acoplados inhibitoriamente a la adenilato ciclasa en adipocitos de hamster previamente tratados con la vacuna pertussis (44). Por otra parte se demostró en páncreas perfundido, que la inhibición de la secreción de insulina se suprimió y se potenció la estimulación beta adrenérgica por tratamiento previo con la vacuna (45). Estas observaciones iniciales (44) fueron comprobadas posteriormente usando la toxina pertussis purificada a partir de la vacuna completa (46). La observación hecha en el sentido de que la toxina pertussis modificaba la respuesta de diferentes hormonas acopladas inhibitoriamente a la adenilato ciclasa, cada una con su propio receptor, sugirió que el sitio de acción no eran los receptores sino una entidad común a todos los receptores, un mecanismo de acoplamiento entre los diferentes receptores y la adenilato ciclasa. Por otra parte la enzima adenilato ciclasa tampoco parecía ser el blanco de acción pues ésta no solo se mantenía activa sino por el contrario aumentaba su actividad. Esta hipótesis fue comprobada por investigadores japoneses que demostraron que la toxina pertussis modifica covalentemente a la proteína Ni (47,48). La toxina pertussis cataliza la ribosilación de Ni usando como sustrato NAD endógeno (48,49). Este mismo mecanismo ya había sido descrito para la acción de la toxina colérica sobre la proteína Ns (50). Estos resultados fueron comprobados por estudios adicionales del efecto de la toxina pertussis sobre una variedad de tipos celulares; la disminución en la producción de AMPc o la inhibición de la adenilato ciclasa via receptores alfa₂ adrenérgicos (46,51), muscarínicos colinérgicos (51), opiáceos (51), a prostaglandina E₁ (44,52) o de adenosina A₁ fueron atenuados o abolidos en islotes (53), corazón (52), híbridos neuroblastoma-glioma (NG 108-15) (51) o en adipocitos (46,47,54). En algunos casos, el incremento en AMPc mediado por receptores o activación de la adenilato ciclasa, fue incrementado por la toxina pertussis.

J.L. Boyer y cols. demostraron que el pretratamiento de ratas con la toxina pertussis aumenta la frecuencia cardíaca de una manera dependiente de la dosis; asimismo bloquea la acción de agonistas alfa₂ adrenérgicos, pero no de agonistas alfa₁ adrenérgicos sobre la tensión arterial (55,56). C.K. Pusphendran y cols. demostraron que los hepatocitos de ratas tratadas con la toxina pertussis tenían alteraciones en la respuesta hormonal (57). Otros grupos de investigadores han extendido y confirmado los estudios previos de la toxina pertussis trabajando con otro grupo de hormonas y otro grupo de células. Por ejemplo, se encontró que la toxina pertussis bloquea la acción inhibitoria de la somatostatina sobre la pro-

ducción de AMPc (58) y sobre la inhibición de la liberación de la hormona del crecimiento en células de la pituitaria anterior. La toxina pertussis bloquea la inhibición de la liberación de prolactina inducida por dopamina (59) en células de la pituitaria anterior.

Resultados de nuestro grupo han demostrado que la vacuna pertussis afecta marcadamente el metabolismo de los lípidos (30). Produce un severo hígado graso y aumenta el nivel de ácidos grasos libres, triglicéridos y cuerpos cetónicos. Por otra parte los resultados iniciales encontrados acerca de la acción de la vacuna (44) y toxina pertussis (46) en los adipocitos de hamster previamente tratados con esta proteína fueron confirmados experimentalmente en un sistema *in vitro* de trozos de tejido adiposo (47). La toxina pertussis fue adicionada directamente al medio de incubación de los trozos, después de un período de incubación con la toxina, ésta produjo una disminución de la acción de los agentes que inhiben a la adenilato ciclasa e incrementó la acción del isoproterenol (47). J.A. García-Sáinz y cols. (60) y J.L. Boyer y cols. (61) demostraron que la toxina pertussis induce un desplazamiento en la proporción de sitios en estado de alta y baja afinidad para agonistas alfa₂ adrenérgicos hacia la conformación de baja afinidad tanto en tejido adiposo (60) como en membranas de corteza renal (61). En estos experimentos la toxina pertussis no modificó el número de receptores alfa₂ adrenérgicos o su afinidad para antagonistas (61) y no indujo un desplazamiento en la afinidad para agonistas alfa₁ adrenérgicos.

ESTRUCTURA DE LA TOXINA PERTUSSIS

La toxina pertussis es un hexámero que consiste de 5 subunidades distintas, que son llamadas S₁, S₂, S₃, S₄ y S₅ de acuerdo a sus pesos moleculares. La toxina pura puede ser separada en condiciones controladas en S₁, la subunidad más grande, y un pentámero residual que tiene dos dímeros (dímero 1: S₂ + S₄, dímero 2: S₃ + S₄) que están conectados uno con otro por medio de la subunidad S₅ (62). S₁ es el protómero A (Activo) de la toxina que tiene la actividad de glucohidrolasa; hidroliza al NAD en ADP-ribosa y nicotinamida en ausencia de cualquier componente celular (63-64) sólo después de que los puentes disulfuro intrapeptídicos son reducidos por el ditiotreitól. La acción de la toxina nativa sobre las células intactas es antagonizada de una manera competitiva por el pentámero aislado. Esto indica que la molécula de

III. EXPERIMENTAL

toxina se une a sitios particulares sobre la superficie celular vía el pentámero. Así el pentámero es el oligómero B (Binding) de la toxina. Este oligómero es un potente mitógeno en linfocitos T, por lo cual se ha sugerido que tiene una unión divalente, vía dos dímeros, a las glucoproteínas de membrana (65). Estos resultados acerca de la estructura A-B de la toxina pertussis han sido confirmadas por las siguientes observaciones:

a) un tiempo de retraso que precede invariablemente al principio de la acción de la toxina sobre la célula intacta. Es el tiempo que requiere el protómero A para atravesar la membrana plasmática, antes de alcanzar su sitio de acción (65).

b) El protómero A no tiene efecto sobre ningún tipo de células intactas, a menos que esté asociado al oligómero B para formar la toxina completa (65).

La unión del oligómero B a su sitio receptor ejerce un efecto doble: Por una parte transporta al protómero A a su sitio intracelular de acción y por otra estimula a las células a una serie de acciones como por ejemplo la linfocitosis. Parece que este último efecto es el responsable de algunas actividades biológicas de la toxina pertussis, tales como promotora de linfocitosis, sensibilidad a la histamina, aumento en permeabilidad vascular. La arginina ha sido identificada como el aminoácido que es ADP-ribosilado por la toxina colérica (50), mientras que la asparagina lo ha sido en el caso de la toxina pertussis (66). Este dato ha sido reportado en la subunidad alfa de la transducina, la cual es una proteína regulatoria dependiente de nucleótidos de guanina, que en la retina media la activación de una fosfodiesterasa por rodopsina fotolizada (66).

II OBJETIVOS .

II OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son la evaluación de la participación de los receptores adrenérgicos renales (beta y alfa₂) en la regulación de la secreción de renina, tanto en el animal completo como en un sistema mas simple de rebanadas de corteza renal, usando como herramienta a la toxina pertussis.

III EXPERIMENTAL

Los materiales y métodos, los resultados y una introducción y discusión específica se encuentran en los siguientes trabajos que constituyen la tesis doctoral.

TRABAJO NUMERO 1

Pedraza-Chaverrí, J., Alatorre-González, M.C., Ibarra-Rubio, M.E., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. *Life Sciences* 35: 1683-1689, 1984.

TRABAJO NUMERO 2

Pedraza-Chaverrí, J., Ibarra-Rubio, M.E., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Pertussis toxin potentiates anesthesia-induced renin secretion. Aceptado para su publicación en el *European Journal of Pharmacology*, 1985.

TRABAJO NUMERO 3

Pedraza-Chaverrí, J., Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sáinz, J.A. Pertussis toxin enhances beta-adrenergic and blocks the α_2 -adrenergic regulation of renin secretion in renal cortical slices. Enviado a publicación a *Life Sciences*, 1985.

EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON THE ADRENERGIC
REGULATION OF PLASMA RENIN ACTIVITY

José Pedraza-Chaverri⁺, M. Carmen Alatorre-González⁺, María Elena Ibarra-Rubio⁺, José Carlos Peña⁺ and J. Adolfo García-Sáinz⁺⁺

⁺Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" and ⁺⁺Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600, 04510, México, D.F.

(Received in final form August 6, 1984)

Summary

Basal plasma renin activity (PRA) was not modified by pertussis toxin administration. On the contrary, the modulation of PRA by adrenergic amines was markedly affected by the toxin. Administration of epinephrine did not modified PRA in the controls but markedly increased it in toxin-treated rats. This effect of epinephrine was reproduced in control rats when yohimbine was given before the catecholamine. Clonidine decreased PRA to a much more significant extent in control rats than in animals treated with the toxin. Isoproterenol stimulated PRA to a greater level in toxin-treated rats. Our data indicate that pertussis toxin blocks the α_2 -adrenergic modulation of renin release and magnifies the ability of beta adrenergic activation to stimulate PRA.

Renin, a very specific protease that catalyzes the release of angiotensin I from angiotensinogen, is synthesized, stored and secreted by the granular cells of the juxtaglomerular apparatus of the kidney (1). The secretion of renin is under the control of a variety of factors including: ions (sodium, potassium, calcium and possibly chloride), intrarenal baroreceptors and hormonal mediators (angiotensin II, prostaglandins and catecholamines) (2). Adrenergic amines regulate renin release through the sympathetic innervation of the kidney and circulating catecholamines.

Two types of adrenoceptors, beta and alpha, seems to be involved in the catecholamine-mediated regulation of renin release. Beta-adrenergic activation of the kidney stimulates renin release whereas α_2 -adrenergic activation inhibits the secretion of this protease (2-4). It is generally accepted that beta-adrenoceptors are coupled in an stimulatory fashion to adenylate cyclase whereas α_2 -adrenoceptors are coupled to the cyclase inhibitorily (5-8). Two different guanine nucleotide binding proteins (N) seem to be involved in the coupling of these two types of receptors to the cyclase termed Ns (activation) and Ni (inhibition) (9). It has been shown that pertussis toxin, an exotoxin produced by Bordetella pertussis, blocks the transfer of inhibitory information from hormone receptors to adenylate cyclase (10-14). The action of the toxin seems to be due to ADP-ribosylation of a protein of MW 41,000 probably a subunit of Ni (15-18).

Based on the above mentioned data the hypothesis was made that pertussis toxin may alter the adrenergic regulation of renin release by blocking the α_2 -adrenergic action. In the present paper the effect of pertussis toxin administration on the adrenergic regulation of plasma renin activity is presented.

Material and Methods

Isoproterenol, yohimbine, propranolol and epinephrine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.). Clonidine was a generous gift from Boehringer Ingelheim. The radioimmunoassay kit used for the determination of angiotensin I was obtained from New England Nuclear (Boston, MA). Pertussis toxin was purified from whole pertussis vaccine by the procedures described by Arai and Sato (19) and Yajima and coworkers (20).

Male Wistar rats (100-250 g) were used in this work. Pertussis toxin was given intraperitoneally in a single dose (50 $\mu\text{g}/100\text{g}$) three days before the experiment. Adrenergic agents (epinephrine, isoproterenol, clonidine, propranolol and yohimbine) were injected subcutaneously in a total volume of 100-200 μl . Drugs were dissolved in saline solution (0.85% NaCl) just before administration. When an antagonist and an agonist were administered to the same rat, the antagonist was injected 30 minutes before the agonist. Rats were sacrificed by decapitation and exsanguinated. Blood was collected in a siliconized glass tube on ice containing Na_2EDTA . Plasma was separated by centrifugation at 4°C and frozen at -20°C until the assay of plasma renin activity was done. Plasma renin activity was determined according to Haber et al. (21), by estimating the formation of angiotensin I from endogenous angiotensinogen during 1 hour at 37°C, the basal angiotensin I (1 hour incubation at 4°C) was subtracted. The between and within assay coefficients of variations for radioimmunoassays were <12% and <8% respectively. Activity is expressed in ng Angiotensin I generated during one hour per ml of plasma. Results are expressed as the means \pm S.E.M. of at least 5 determinations using different animals. Statistical significance of the difference between comparable groups was determined by Student's *t* test.

Results

Basal plasma renin activity was not modified by pertussis toxin administration (8.4 ± 0.7 and 8.3 ± 0.7 ng Angiotensin I $\text{hour}^{-1} \text{min}^{-1}$ in control and pertussis toxin-treated animals, respectively). On the contrary the adrenergic regulation was markedly modified by pertussis toxin. The time-course of the effect of epinephrine (10 $\mu\text{g}/100$ g) is shown in Figure 1. It was observed that in control animals the administration of the amine produced essentially no change in plasma renin activity whereas in pertussis toxin-treated rats the PRA activity increased 2, 14 and 12-fold at 5, 30 and 60 min; plasma renin activity returned to basal values 120 min after the administration of epinephrine (Fig. 1).

Dose-response curves for epinephrine are presented in Figure 2. Only minor changes were produced in PRA in control animals by epinephrine. In contrast, PRA increased markedly in response to epinephrine in pertussis toxin-treated rats; the increment was statistically significant with a dose as small as 1 $\mu\text{g}/100$ g (2.5-fold, $p < 0.001$) and reached the maximum (15-fold) with a dose of 10 $\mu\text{g}/100$ g (Fig. 2). In order to study the type of adrenoceptor involved in the action of pertussis toxin, the effect of epinephrine as affected by the selective antagonists propranolol (beta) and yohimbine (α_2) was studied. Similarly the action of the agonists isoproterenol (beta) and clonidine (α_2) were studied. It was observed that yohimbine alone had no effect on plasma renin activity (Fig. 3). However, yohimbine magnified the

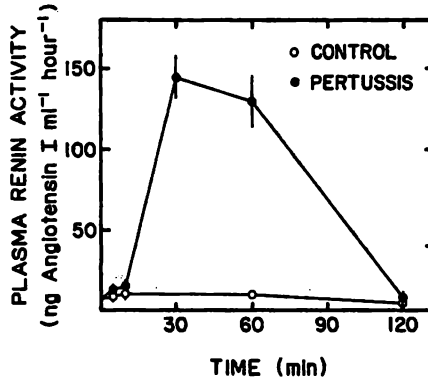


Figure 1.

Time-course of the effect of pertussis toxin on plasma renin activity in control (open circles) and pertussis toxin-treated rats (closed circles) injected with epinephrine (10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). Plotted are the means and the vertical lines represent the S.E.M. of at least 5 determinations using different animals.

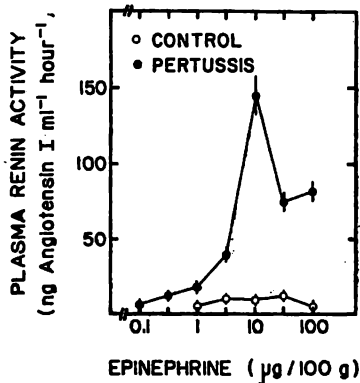


Figure 2.

Dose-response for the effect of epinephrine on plasma renin activity. Control rats (open circles) and pertussis toxin-treated rats (closed circles) were injected with different amounts of epinephrine; determinations were made 30 min after the administration of the drug.

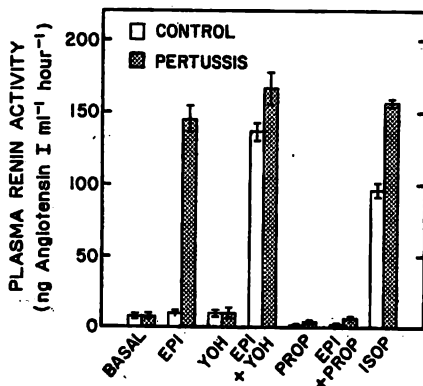


Figure 3.

Effect of adrenergic agonists and antagonists on plasma renin activity. Rats were injected with epinephrine (10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) EPI, yohimbine (100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) YOH, epinephrine plus yohimbine (10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ + 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ respectively) EPI + YOH, propranolol (100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) PROP, epinephrine plus propranolol (10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ + 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ respectively) EPI + PROP or isoproterenol (10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) ISOP. Antagonist was administered 30 minutes before the injection of agonist and rats sacrificed 30 minutes later. Bars represent the means and vertical lines represent the S.E.M. of at least 5 determinations using different animals.

action of epinephrine on this parameter in control animals reaching a level similar to that produced by epinephrine alone in pertussis toxin-treated rats. The action of epinephrine plus yohimbine was similar in pertussis toxin-treated rats than in controls (Fig. 3). Consistent with this finding was the data obtained with isoproterenol (Fig. 3). Beta-adrenergic activation produced a significant increase in plasma renin activity in control animals; the effect of isoproterenol was even bigger in pertussis toxin-treated rats (Fig. 3) ($p < 0.05$). All these data indicate that pertussis toxin was blocking the α_2 -adrenergic effects of epinephrine and magnifying its beta-adrenergic action. In order to further support these findings the effects of propranolol and clonidine were studied. Propranolol alone significantly diminished plasma renin activity in both control and pertussis toxin-treated animals; the effect was more marked in control rats (Fig. 3). Furthermore propranolol blocked completely the stimulation produced by epinephrine in pertussis toxin-treated rats (Fig. 3). Clonidine significantly decreased plasma renin activity in both control and pertussis toxin-treated rats (Fig. 4). However, the effect of clonidine was much more marked in control animals as compared to toxin-treated rats ($p < 0.001$). These data further support the idea that the action of pertussis toxin is due to blockade of the α_2 -adrenergic and magnification of the beta adrenergic actions. In all conditions when plasma renin activity was increased, the basal value of angiotensin I (incubation at 4°C) was elevated and similar when plasma renin activity was decreased, basal angiotensin I level was decreased. These data indicate that the changes detected in the determination were occurring *in vivo*.

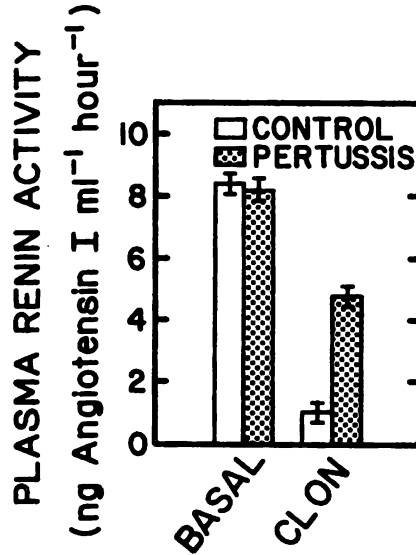


Figure 4.

Effect of clonidine on plasma renin activity. Rats were injected with clonidine (10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) CLON, 30 min before sacrifice. Other indications as in Figure 3.

Discussion

It is well documented that activation of beta-adrenoceptors increases renin secretion whereas activation of alpha₂-adrenoceptors diminishes the release of the protease (2-4, 22-24). Our results further document these observations and validate their physiological significance by using pertussis toxin as a tool. Alpha₂-adrenoceptors seem to play a role at least as significant as beta-adrenoceptors in the adrenergic regulation of renin release as suggested by the inability of epinephrine to increase plasma renin activity and the ability of epinephrine plus propranolol or even propranolol alone to decrease the activity of the protease in plasma. The action of pertussis toxin seems to occur mainly by blocking the transfer of inhibitory information produced by activation of alpha₂-adrenoceptors. This is supported by the ability of yohimbine plus epinephrine to mimic the effect of epinephrine alone in toxin-treated rats and the diminished effect of clonidine in toxin-treated animals. The data suggest that the ability of alpha₂-adrenergic amines to diminish plasma renin activity is mediated by inhibition of adenylate cyclase through M₁. Alpha₂-adrenergic-mediated inhibition of renal adenylate cyclase has already been demonstrated (25,26). The ability of pertussis toxin to selectively block the transfer of inhibitory information from receptors to adenylate cyclase (10-14, 27-29) support our suggestion and validates the use of pertussis toxin as a tool to study processes in which adenylate cyclase

inhibition is involved.

The possibility that extrarenal factors, such as hemodynamic changes and metabolic clearance changes might have played a role in our studies with pertussis toxin cannot be ruled out. However it is very unlikely based on the effects of pertussis toxin in the vascular system of the rat (30, 31) and on the observations that pertussis toxin shifts the α_2 -adrenoceptors of the kidney to a low affinity state for agonists (32). The data with clonidine suggest that with the dose of toxin employed the activity of Ni is not completely blocked. Our binding data are also consistent with this suggestion (32). However, there is also an increased beta-adrenergic responsiveness associated with the action of pertussis toxin as evidenced by the data using isoproterenol. This is not unexpected, it has been observed that pertussis toxin magnifies the cell response to agents that stimulate adenylate cyclase (13, 27, 33). It has been suggested that this effect is due to the release of a constrain on adenylate cyclase by Ni (13). The molecular basis of such constrain is unknown. However recent data indicate the possibility that Ni and Ns may have in common a 35 K subunit (34) which could explain the increased responses.

Acknowledgements

This research was partially supported by a Grant from Fondo de Estudios e Investigaciones "Ricardo J. Zevada". The authors want to thank Ms Guadalupe Ramirez for typing the manuscript.

References

1. I.A. REID, B.J. MORRIS and W.F. GANONG, *Ann. Rev. Physiol* **40**, 377-410 (1978).
2. T.K. KEETON and W.B. CAMPBELL, *Pharmacol. Rev.* **31** 81-227 (1981).
3. P.A. INSEL and M.D. SNAVELY, *Ann. Rev. Physiol.* **43** 625-636 (1981).
4. W.A. PETTINGER, T.K. KEETON, W.B. CAMPBELL and D.C. HARPER, *Circ. Res.* **38** 338-346 (1976).
5. G.G. HAMES and M. ROBBELL, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73** 1189-1192 (1976).
6. J.N. FAIN and J.A. GARCIA-SAINZ, *Life Sci.* **26** 1183-1194 (1980).
7. J.A. GARCIA-SAINZ, B.B. HOFFMAN, S.Y. LI and J.N. FAIN, *Life Sci.* **27** 953-961 (1980).
8. J.A. GARCIA-SAINZ and J.N. FAIN, *Trends Pharmacol. Sci.* **3** 201-203 (1982).
9. M. ROBBELL, *Nature (Lond.)* **284** 17-22 (1980).
10. J.A. GARCIA-SAINZ, *FEBS Lett.* **126** 306-308 (1981).
11. O. HAZEKI and M. UI, *J. Biol. Chem.* **256** 2856-2862 (1981).
12. T. KATADA and M. UI, *J. Biol. Chem.* **256** 8310-8317 (1981).
13. M.A. MARTINEZ-OLMEDO and J.A. GARCIA-SAINZ, *Biochim. Biophys. Acta.* **760**, 215-220 (1983).
14. H. KURASE, T. KATADA, T. AMANO and M. UI, *J. Biol. Chem.* **255** 4870-4875 (1983).
15. T. KATADA and M. UI, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79** 3129-3133 (1982).
16. J. CODINA, J. HILDEBRANDT, R. IYENGAR, L. BIRNBAUMER, R.D. SEKURA and C.R. MANCLARK. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **80** 4276-4280 (1983).
17. G.M. BOKOCH, T. KATADA, J.K. NORTHUP, E.L. HEWLETT and A.G. GILMAN, *J. Biol. Chem.* **258** 2072-2075 (1983).
18. J.D. HILDEBRANDT, R.D. SEKURA, J. CODINA, R. YENGAR, C.R. MANCLARK and L. BIRNBAUMER, *Nature* **302**, 706-709 (1983).
19. H. ARAI and Y. SATO. *Biochim. Biophys. Acta* **444** 765-782 (1976).
20. M. YAHIMA, K. HOSADA, Y. KANBAYASHI, T. NAKAMURA, K. NOGIMORI, Y. MIYUSHIMA, Y. NAKASE and M. UI. *J. Biochem.* **83** 295-303 (1978).
21. E. HABER, T. KOERNER, L.B. PAGE, B. KLIMAN and A. URNODE, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **29** 1349-1355 (1969).
22. J.O. DAVIES and R.H. FREEDMAN, *Physiol. Rev.* **56** 1-56 (1976).

23. B.J. MORRIS, I.A. REID, W.F. GANONG, *Eur. J. Pharmacol.* 59 37-45 (1979).
24. C. CHEVILLARD, R. PASQUIER, N. DUDRENE and J.M. ALEXANDRE, *Eur. J. Pharmacol.* 48 451-454 (1978).
25. E.A. WOODCOCK, C.I. JOHNSTON and C.A. OLSSON, *J. Cyclic Nucleotide Res.* 6 261-271 (1980).
26. E.A. WOODCOCK and C.I. JOHNSTON, *Am. J. Physiol.* 242 F721-F726 (1983).
27. T.D. REISINE, Y.L. ZHANG and R.D. SEKURA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 794-799 (1983).
28. M.J. CRONIN, A.D. ROGEL, G.A. MYERS and E.L. HEWLETT, *Endocrinology* 113 09-215, (1983).
29. M.J. CROMIN, G.A. MYERS, R.M. MACLEOD, and E.L. HEWLETT, *Am. J. Physiol.* 244 E499-E504 (1983).
30. J.L. BOYER, C. POSADAS and J.A. GARCIA-SAINZ, *Eur. J. Pharmacol.* 83, 123-126 (1983).
31. J.L. BOYER, C. CARDENAS, C. POSADAS and J.A. GARCIA-SAINZ, *Life Sci.* 26, 2627-2633 (1983).
32. J.L. BOYER, A. GARCIA, C. POSADAS and J.A. GARCIA-SAINZ, *J. Biol. Chem.* in press.
33. C.K. PUSHPENDRAN, S. CORVERA and J.A. GARCIA-SAINZ, *FEBS Lett.* 160, 198-202 (1983).
34. K.M. FERGUSON, I.K. NORTHRUP and A.G. GILMAN, *Fed. Proc.* 41 1407 (1982).

PERTUSSIS TOXIN POTENTIATES ANESTHESIA-INDUCED RENIN SECRETION

José Pedraza-Chaverrí

M. Elena Ibarra-Rubio

M. Carmen Alatorre-González

José C. Peña and

J. Adolfo-García Sáinz*

Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran" and *Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México . Apartado Postal 70-600, 04510, México, D.F.

* To whom all correspondende should be addressed.

Running title: Anesthesia-induced renin secretion

Index words: Pertussis toxin

Anesthesia,

Renin secretion.

J. PEDRAZA-CHAVERRI, M.E. IBARRA-RUBIO, M.C. ALATORRE-GONZALEZ, J.C. PEÑA
and J.A. GARCIA-SAINZ. Pertussis toxin Potentiates Anesthesia-induced Re-
nin Secretion.

Plasma renin concentration was measured after anesthesia in control
and pertussis toxin-treated rats. The anesthetics increased renin secretion
and this effect was markedly magnified in rats treated with pertussis toxin
Propranolol partially blocked the increase in plasma renin concentration -
produced by anesthetics. It is concluded that the adrenergic system is in-
volved in this effect and that pertussis toxin magnifies it by potentiating
 β - adrenergic action.

INTRODUCTION

Pertussis toxin blocks the action of hormones whose receptors are coupled inhibitorily to adenylate cyclase and magnifies the action of hormone receptors coupled activatorily to this enzyme (Martínez-Olmedo and García-Sáinz, 1983; Reisine et al, 1983, Katada et al, 1984). We have recently shown that the administration of pertussis toxin to rats markedly modifies the adrenergic regulation of renin secretion in vivo (Pedraza-Chaverría et al, 1984). It was observed that the inhibitory action of α_2 -adrenergic agonists on renin secretion was blocked - and that the stimulatory action of β -adrenergic agonists was magnified by the toxin (Pedraza-Chaverrí et al, 1984).

It is known that anesthetics increase renin secretion and that this effect is probably mediated through adrenergic mechanisms (Keeton and Campbell, 1980). The effect of pertussis toxin on anesthesia-induced renin secretion was studied and the results are here presented.

MATERIAL AND METHODS

Propranolol and yohimbine were obtained from Sigma Chemical Co., Inaktin from Byk Gulden, urethane and α chloralose from Merck, Ketamine from Parke-Davis and sodium pentobarbital from Smith Kline Norden de México. Radioimmunoassay kits for quantification of angiotensin I were obtained from New England Nuclear.

Male Wistar rats weighing 150-250 g were used. Pertussis toxin was purified as previously described (Martínez-Olmedo and García-Sáinz, 1983). Rats were injected i.p. with the toxin (50 μ g/100g) or vehicle three days before the experiment was performed. The day of the experiment the rats were anesthetized (to the stage of surgical anesthesia) with one of the following agents: ether, pentobarbital 3.5 mg/100 g, ketamine 10 mg/100 g, inaktin 10 mg/100 g, urethane 80 mg/100 g or chloralose 5 mg/100g. When propranolol or yohimbine were used they were administered at a dose of 100 μ g/ 100g, subcutaneously, 30 min before anesthesia. Fifteen min after the administration of the anesthetics the animals were sacrificed by decapitation, the blood was collected and the plasma separated by centrifugation. Plasma renin concentration was assayed quantifying the generation of angiotensin I from an excess of substrate (plasma from nephrectomized rats) during an incubation of 1 hour at 37°C; the basal angiotensin I (1 hour incubation at 4°C) was subtracted. Angiotensin I was quantified by radioimmunoassay. The results are expressed as the means \pm S.E.M. of at least 5 determinations using different animals. Statistical comparison between groups was performed by the Student's t test.

RESULTS

All the anesthetics tested stimulated renin secretion in the control group (table 1); this stimulation was markedly magnified by the administration of pertussis toxin (table 1). It was observed that pertussis toxin alone significantly stimulated plasma renin concentration (table 1). In our previous study (Pedraza-Chaverrí, et al, 1984) we were unable to observe any effect of pertussis toxin alone on plasma renin activity which suggests that the amount of endogenous substrate could have limited the reaction. In order to further investigate the participation of the adrenergic system, propranolol, a β -adrenergic antagonist, or yohimbine, an α_2 -adrenergic antagonist, were administered to the rats. Yohimbine was unable to mimic the effect of pertussis toxin and only increased significantly renin secretion in rats anesthetized with pentobarbital or ketamine (table 1). On the other hand, propranolol significantly diminished renin secretion under basal partially blocked the effect of the following agents in the control group: ether, ketamine, urethane and α chloralose. In the pertussis-treated group propranolol markedly diminished the effect of all the anesthetics tested (table 1).

EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN AND ADRENERGIC ANTAGONISTS ON ANESTHESIA-INDUCED RENIN SECRETION

| TREATMENT | PLASMA RENIN CONCENTRATION (ng ANGIOTENSIN I ml ⁻¹ h ⁻¹): | | | | | | |
|-----------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | NO ANESTHESIA | ETHER | PENTOBARBITAL | INAKTIN | KETAMINE | URETHANE | CHLORALOSE |
| Control | 58 ± 6 (7) | 250 ± 49 ^a (6) | 116 ± 8 ^a (5) | 140 ± 34 ^b (5) | 206 ± 12 ^a (6) | 528 ± 57 ^a (8) | 250 ± 28 ^a (6) |
| + Prop | 22 ± 3 ^c (8) | 106 ± 14 ^c (8) | 146 ± 25 (6) | 186 ± 20 (5) | 96 ± 14 ^c (8) | 124 ± 22 ^c (7) | 94 ± 27 ^c (5) |
| + Yoh | 68 ± 11 (7) | 308 ± 46 (8) | 344 ± 69 (7) | ND | 345 ± 72 ^d (6) | 778 ± 123 (5) | 262 ± 40 (7) |
| Pertussis | 86 ± 7 ^e (5) | 829 ± 31 ^{e,f} (8) | 826 ± 32 ^{e,f} (5) | 433 ± 72 ^{e,f} (5) | 598 ± 82 ^{e,f} (6) | 1438 ± 269 ^{3,f} (6) | 1079 ± 64 ^{e,f} (6) |
| + Prop | 20 ± 3 ^g (5) | 178 ± 28 ^g (5) | 160 ± 21 ^g (6) | 149 ± 2 ^h (5) | 39 ± 6 ^g (7) | 168 ± 35 ^g (7) | 400 ± 13 ^g (6) |

Prop (propranolol), Yoh (yohimbine), ND (not determined); number of animals in parenthesis.

^aP < 0.005 compared to the basal of control group

^bP < 0.01 " " the basal of control group

^cP < 0.005 " " the basal of control group

^dP < 0.005 " " its respective control group

^eP < 0.005 " " its respective control group

^fP < 0.005 " " the basal of the pertussis toxin group

^gP < 0.005 " " its respective pertussis toxin group

^hP < 0.025 " " its respective pertussis toxin group

DISCUSSION

The mechanisms by which anesthetics stimulate renin secretion are diverse and depend on the pharmacological properties of each agent (Keeton and Campbell, 1980). However, adrenergic mechanisms seem to play an important role in the increase of renin secretion produced by most anesthetics (Keeton and Campbell, 1981). Our results support this contention and emphasize the importance of β -adrenergic receptors in this effect.

The data clearly show that pertussis toxin potentiates anesthesia-induced renin secretion by magnifying β -adrenergic action. This is not unexpected since it has been observed in several models that pertussis toxin amplifies the cellular response to agents that stimulate adenylate cyclase. (Martínez-Elmedo and García Sáinz, 1983; Pushpendran et al, 1983; Reinsine et al, 1983, Pedraza-Chaverrí et al, 1984). However, mediators other than catecholamines may also play a role in the activation of renin secretion by anesthetics. The increase in renin secretion due to pentobarbital or inaktin was not blocked by propranolol but in contrast the magnification of this effect of the anesthetics by pertussis toxin was significantly decreased by propranolol. These data suggest that the adrenergic system and other mediator (s) are probably involved in the action of these anesthetics on renin secretion. The toxin seems to magnify mainly the action through the adrenergic system. It is also noteworthy that propranolol did not decrease anesthesia-induced secretion to the level observed in the control animal which do not allow us to discard a role of other (non-adrenergic) mediators.

In our previous study we observed that the administration of pertussis

toxin blocked the α_2 -adrenergic effect of catecholamines and magnified the β -adrenergic response. In the present study the main action of pertussis toxin was to magnify by β -adrenergic action. Significant differences exist in the methodology employed in these studies; in our previous work adrenergic agonists were administered whereas in the present study the effects are due to endogenous mediators. However, both effects of pertussis toxin i.e. blockage of α_2 -adrenergic action and magnification of β -adrenergic effects seem to be due to the ADP-ribosylation of Ni which alters the interaction of Ni with the cyclase and the interplay of the subunits (β and γ) of the guanine nucleotide regulatory proteins (Ni and Ns) (Katada et al, 1984) .

REFERENCES.

- Katada, T., G.M. Bokoch, M.D. Smigel, M. Ui and A.G. Gilman. 1984. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 3586.
- Keeton, T.K. and W.B. Campbell. 1980. The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32, 81.
- Martínez-Olmedo, M.A. and J.A. García-Sáinz. 1983. Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 760,215.
- Pedraza-Chaverri, J., M.C. Alatorre-González, M.E. Ibarra-Rubio, J.C. Peña and J.A. García-Sáinz. 1984. Effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. *Life Sci.* 35, 1683.
- Pushpendran, C.K., S. Corvera and J.A. García-Sáinz, 1983. Effect of pertussis toxin on the hormonal responsiveness of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 160, 198.
- Reisine, T.D., Y.L. Zhang and R.D. Sekura. 1983. Pertussis toxin blocks somatostatins inhibition of stimulated cyclic AMP accumulation in anterior pituitary tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 794.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by a Grant from Fondo de Estudios e Investigaciones "Ricardo J. Zevada". We thank Ms. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript.

PERTUSSIS TOXIN ENHANCES THE BETA-ADRENERGIC AND BLOCKS THE ALPHA,
ADRENERGIC REGULATION OF RENIN SECRETION IN RENAL CORTICAL SLICES

José Pedraza-Chaverri^{a,b}, M. Carmen Alatorre-González^b, José Carlos
Peña^b and J. Adolfo García-Sáinz^{a,c}

^aDepartamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600,
04510, México, D.F. and ^bDepartamento de Nefrología y Metabolismo
Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán",
Vasco de Quiroga # 15, Delegación Tlalpan, 14000, México, D.F.

Summary

The adrenergic regulation of renin secretion was studied in renal cortical slices from control and pertussis toxin-treated rats. It was observed that isoproterenol and epinephrine stimulated renin secretion and that clonidine decreased both basal and isoproterenol stimulated renin secretion in the control group. Pertussis toxin: a) increased significantly basal renin secretion, b) displaced to the left the concentration-response curve for isoproterenol and epinephrine and magnified the response to epinephrine and c) abolished the inhibitory effect of clonidine on renin secretion. This work confirms our previous results obtained *in vivo* and suggests a direct effect of pertussis toxin on the cells that secrete renin.

Pertussis toxin, an exotoxin produced by *Bordetella pertussis*, blocks the transfer of inhibitory information from hormone receptors to adenylate cyclase (1-8). The action of the toxin seems to be due to ADP-ribosylation of a protein of MW 41,000, the alpha subunit of Ni (6-9). We have previously shown that pertussis toxin markedly affects the adrenergic regulation of renin secretion *in vivo* (10) and potentiates anesthesia-induced renin secretion (11). It was observed that pertussis toxin increases the beta-adrenergic responsiveness and abolishes the inhibitory action of alpha₂-adrenergic agents on this parameter (10,11). The purpose of the present work was to study the effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of renin secretion in a simpler system than the whole animal, i.e. in renal cortical slices.

Material and Methods

(-) Isoproterenol, (±) propranolol, (-) epinephrine and bovine serum albumin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Clonidine was a generous gift from Boehringer Ingelheim. The radioimmunoassay kits used for the determination of angiotensin I were obtained from New England Nuclear (Boston, MA). Pertussis toxin was purified from whole pertussis vaccine by gel filtration, adsorption and ion-exchange chromatography (2) or by the method of Sekura *et al* (12), both procedures result in identical preparations.

^cTo whom all correspondence should be addressed.

Male Wistar rats weighing 150-250 g were used in this work. Pertussis toxin was administered intraperitoneally in a single dose (50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) three days before the experiment was performed. Rats were decapitated and exsanguinated, the kidneys were removed, decapsulated and placed in incubation medium of the following composition: 128 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgSO_4 , 1.3 mM KH_2PO_4 , 14 mM NaHCO_3 , 2.1 mM CaCl_2 , 100 mM glucose and 1 mg/ml of bovine serum albumin, equilibrated at 37°C (pH 7.4) with a mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%). The adrenergic agents were dissolved in this medium and prepared fresh each day. The slices were made with a Stadie-Riggs microtome. From each kidney, two slices were obtained that were additionally cut in three smaller slices, weighing 8-12 mg. In a typical experiment the slices of eight kidneys were pooled, kept in incubation medium at room temperature and washed. The slices were incubated in Erlen-Meyer flasks (two slices per flask in a final volume of 10 ml), during 1 hour in an oscillatory incubator at 37°C and gassed continuously (5 l/min). After incubation an aliquot of 1 ml of media was obtained and centrifuged at 4°C. The supernatant was frozen until the assay of renin activity was performed. The slices were dried and weighed. Renin in the incubation medium was quantified by its capacity to produce angiotensin I. Incubations were for 1 hour at 37°C with a large excess of homologous substrate (plasma from 24-hours nephrectomized rats). The production of angiotensin I was linear for up to 60 min in such incubations. Renin activity in the medium is expressed as nanograms of angiotensin I generated in 1 hour of incubation with substrate, per milliliter of sample ($\text{ng AI ml}^{-1}\text{ hr}^{-1}$). The amount of renin secreted to the medium during the incubation of the slices was calculated as the renin activity of the medium multiplied by the total volume (in milliliters) of the medium and divided by the tissue dry weight (in milligrams) yielding units = $\text{ng AI mg}^{-1}\text{ hr}^{-1}$. Angiotensin I was assayed by radioimmunoassay according to Haber *et al* (13) using a commercial kit. The results are expressed as the mean \pm S.E.M. of at least 5 experiments performed in duplicate. Statistical significance of the difference between comparable groups was determined by Student's t test.

Results

Basal renin secretion was increased from $239 \pm 13\text{ ng AI mg}^{-1}\text{ hr}^{-1}$ in the controls to $309 \pm 8\text{ ng AI mg}^{-1}\text{ hr}^{-1}$ in slices from pertussis toxin-treated rats (mean \pm S.E.M. of 44 and 35 determinations in each case, $p < 0.001$). The effect of adrenergic agonists and antagonists was studied. The concentration-response curves to the beta-adrenergic agonist isoproterenol are presented in Fig. 1. It can be observed that in slices from control animals isoproterenol produced a concentration-dependent increase in renin secretion. The maximal effect was approximately a 2-fold increase, and the EC_{50} was approximately $5 \times 10^{-8}\text{ M}$. In slices from toxin-treated rats isoproterenol produced also a concentration-dependent increase in renin secretion of similar magnitude (approximately 2-fold increase). However, the curve was clearly shifted to the left as compared to the control curve; the EC_{50} was approximately $1 \times 10^{-9}\text{ M}$. Interestingly the curve was also steeper which results in a shift to the left of 1.5 - 2 order of magnitude. In the slices from toxin-treated rats the maximal effect on renin secretion was obtained at a concentration of $1 \times 10^{-8}\text{ M}$; higher concentrations decreased the effect of the beta agonist. The reason for such decrease is unknown at the present. It is worth mentioning that the effect of isoproterenol in slices from both control and pertussis toxin animals can be blocked by 10^{-5} M propranolol (data not shown).

Epinephrine produced in the control slices an small (25% increase over basal) but consistent stimulation of renin secretion (Fig. 2). The effect of epinephrine was much bigger (65% increase over basal) in slices from pertussis toxin-treated rats. The concentration-response curve was much steeper and shifted to the left with an EC_{50} of approximately $1 \times 10^{-9}\text{ M}$. Again, after the

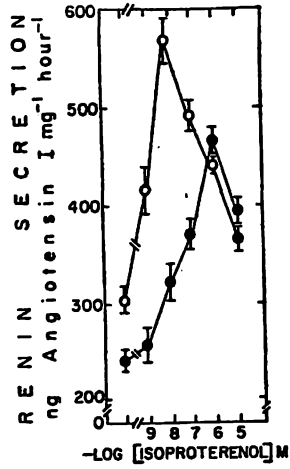


Figure 1

Concentration-response curve to isoproterenol in renal cortical slices from control (●) and pertussis toxin treated rats (○). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of at least 5 experiments performed in duplicate.

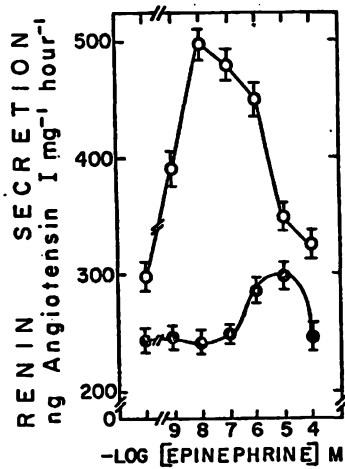


Figure 2

Concentration-response curve to epinephrine in renal cortical slices from control (●) and pertussis toxin-treated rats (○). Other indications as in Fig. 1.

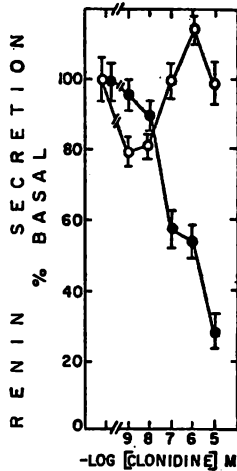


Figure 3

Concentration-response curve to clonidine in renal cortical slices from control (●) and pertussis toxin-treated rats (○). The slices were incubated for 60 min in the presence of different concentrations of clonidine. The results are expressed as % of control values. Absolute 100% values are plotted in Fig. 1. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of at least 5 experiments performed in duplicate.

maximal response was reached (at 1×10^{-8} M), higher concentrations markedly diminished the effect (Fig. 2). The stimulatory effect of epinephrine was blocked by propranolol (data not shown). The effect of the α_2 -adrenergic agonist, clonidine is presented in Figure 3. This agonist clearly decreased basal renin secretion in the renal slices from control rats. The inhibitory action was very dramatic reaching as much as a 70% inhibition at 1×10^{-5} M (Fig. 3). The inhibitory action of clonidine was blocked by pertussis toxin-treatment (Fig. 3). Similar results were observed when the action of clonidine on isoproterenol-stimulated renin secretion was studied, i.e. a clear diminution of renin secretion was produced by clonidine in the control slices (70-80%) which was completely blocked by pertussis toxin treatment (Fig. 4).

Discussion

Renal cortical slices have been used largely to study the regulation of renin secretion (14-18). This system permits the study of renin secretion in a direct form, in the absence of extrarenal factors that may influence it. In this system it has been demonstrated that renin secretion is regulated by adrenergic agents (19-21). We previously shown that adrenergic agents modify renin secretion *in vivo* and that pertussis toxin blocks the α_2 -adrenergic inhibition and potentiates the beta-adrenergic stimulation of renin secretion (10,11). In the present study we used renal cortical slices to test more directly our previous findings *in vivo* (10,11).

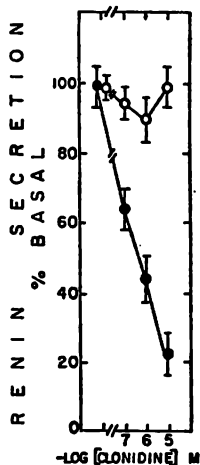


Figure 4

Concentration-response curve to clonidine in renal cortical slices from control (●) and pertussis toxin-treated rats (○). The slices were incubated for 60 min in the presence of 1×10^{-6} M isoproterenol and different concentrations of clonidine. The results are expressed as % of the value obtained with 1×10^{-6} M isoproterenol alone. Absolute 100% values are plotted in Fig. 2. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of at least 5 experiments performed in duplicate.

The stimulation of renin secretion produced by isoproterenol was blocked by propranolol indicating that is mediated through beta-adrenoceptors. In control slices epinephrine also stimulated renin secretion. As expected epinephrine was less potent than isoproterenol (characteristic order of potency for beta-adrenergic mediated effects) and it was also less effective. This latter fact is not surprising either, if we consider that epinephrine is both an α_2 and beta-adrenergic agonist. Alpha₂-adrenergic agonist, such as clonidine, decreased renin secretion. We tried to block the alpha₂-adrenergic effects of epinephrine and clonidine with yohimbine. However the results were ambiguous because yohimbine alone increase renin secretion (data not shown). It is not clear if the effect of yohimbine was due to the action of the antagonist itself or to the presence of a small amount of catecholamines in the slices. The results with the control slices confirm our findings *in vivo* and stresses the importance of the interplay between alpha₂- and beta-adrenoceptors in the adrenergic regulation of renin secretion.

Pertussis toxin treatment blocks the action of alpha₂-adrenergic agents as evidenced by the blockade of the action of clonidine and magnification of the action of epinephrine (i.e. expression of its full beta-adrenergic activity). This is consistent with our previous findings *in vivo* (10,11) and with the fact that treatment of rats with the toxin decreased the formation of the high affinity state for agonists of renal alpha₂-adrenoceptors (22). A prominent action of pertussis toxin was to magnify the beta-adrenergic

responsiveness of the slices; this was evident in the concentration-response curves in two aspects: a) The curves were shifted to the left 1.5-2.0 orders of magnitude and b) the curves were much steeper. The shifts to the left are so pronounced that suggests that the coupling of the beta-adrenoceptor with adenylate cyclase could have been enhanced in such a way that activation of a small fraction of the beta-adrenoceptors might trigger the response. The change in the slope of the concentration-response curve is also consistent with this interpretation. Alternatively, a large increase in the number of beta-adrenoceptors may have taken place as a consequence of the administration of the toxin. The large variety of cell types in the kidney slices precludes addressing this possibility directly. Nevertheless the second possibility seems unlikely; we (2,3,23) and others (4-8) have observed, consistently that the response to agents that activate adenylate cyclase is enhanced in a variety of cells treated with the toxin. This effects seems to be a consequence of an altered interplay between the subunits of the guanine nucleotide-binding regulatory proteins due to ADP-ribosylation of the alpha subunit of Ni (24).

It is generally accepted that beta-adrenoceptors are coupled activatorily to adenylate cyclase whereas alpha₂-adrenoceptors are coupled inhibitorily (25). Our results strongly suggest a role of cyclic AMP in renin secretion. Others authors have suggested a key role of calcium in renin secretion (14,16,17,21,26). It is possible that these two signalling systems (calcium and cyclic AMP) could be intimately related in the regulation of renin secretion as observed in many other biological processes (27). It has been suggested that an increase in the levels of cyclic AMP may diminish the intracellular concentration of calcium (21).

Finally, the remarkable similarity between the results obtained *in vivo* (10,11) and those using renal cortical slices strongly suggest that the effects of pertussis toxin are due to a direct action on the cells that secrete renin.

Acknowledgements

This research was partially supported by a Grant from CONACYT (PCSBANA 22620). J.A. Garcia-Sáinz is a 1985-1986 Guggenheim Fellow. The authors want to thank to Ms. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript.

References

1. J.A. GARCIA-SAINZ, FEBS Lett. 126, 306-308 (1981).
2. M.A. MARTINEZ-OLMEDO and J.A. GARCIA-SAINZ, Biochim. Biophys. Acta 760, 215-220 (1983).
3. M.A. MARTINEZ-OLMEDO and J.A. GARCIA-SAINZ, Eur. J. Pharmacol. 99, 115-118 (1984).
4. M.J. CRONIN, A.D. ROGEL, G.A. MYRES and L. HEWLETT, Endocrinology 113, 209-215 (1983).
5. H. KUROSE, T. KATADA, T. AMANO and M. UI, J. Biol. Chem. 258, 4870-4875 (1983).
6. T. KATADA and M. UI, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 3129-3133 (1982).
7. T. KATADA and M. UI, J. Biol. Chem. 257, 7210-7216 (1982).
8. T. MURAYAMA and M. UI, J. Biol. Chem. 258, 3319-3326 (1983).
9. C.C. MALBON, P.J. RAPIEJKO and J.A. GARCIA-SAINZ, FEBS Lett. 176, 301-306 (1984).
10. J. PEDRAZA-CHAVERRI, M.C. ALATORRE-GONZALEZ, M.E. IBARRA-RUBIO, J.C. PEÑA and J.A. GARCIA-SAINZ, Life Sci. 35, 1683-1689 (1984).
11. J. PEDRAZA-CHAVERRI, M.E. IBARRA-RUBIO, M.C. ALATORRE-GONZALEZ, J.C. PEÑA and J.A. GARCIA-SAINZ, Eur. J. Pharmacol. In press.
12. R.G. SEKURA, F. FISH, C.R. MANCLARK, B. MEADE AND Y-L. ZHANG, J. Biol. Chem. 258, 14647-14651 (1983).

13. E. HABER, T. KOERNER, L.D. PAGE, B. KLIMAN and A. URNODE, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 1349-1355 (1969).
14. P.C. CHURCHILL and M.C. CHURCHILL, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213, 144-149 (1980).
15. P.C. CHURCHILL, *J. Physiol. (Lond)* 294, 123-134 (1979).
16. M.C. CHURCHILL and P.C. CHURCHILL, *J. Physiol. (Lond)* 300, 105-114 (1980).
17. P.C. CHURCHILL, F.D. McDONALD and M.C. CHURCHILL, *Life Sci.* 29, 383-389 (1981).
18. P.C. CHURCHILL, F.D. McDONALD and M.C. CHURCHILL, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211, 615-619 (1979).
19. B.J. MORRIS, I.A. REID and W.F. GANONG, *Eur. J. Pharmacol.* 59, 37-45 (1979).
20. P.C. CHURCHILL AND M.C. CHURCHILL, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 541-545 (1980).
21. P.C. CHURCHILL and M.C. CHURCHILL, *Life Sci.* 30, 1313-1319 (1982).
22. J.L. BOYER, A. GARCIA, C. POSADAS and J.A. GARCIA-SAINZ, *J. Biol. Chem.* 259, 8076-8079 (1984).
23. C.K. PUSHPENDRAN, S. CORVERA and J.A. GARCIA-SAINZ, *FEBS Lett.* 160, 198-202 (1983).
24. T. KATADA, G.M. BOKOCH, M.D. SMIGEL, M. UI and A.G. GILMAN, *J. Biol. Chem.* 259, 3586-3595 (1984).
25. J.N. FAIN and J.A. GARCIA-SAINZ, *Life Sci.* 26, 1183-1194 (1980).
26. C.J. PARK, D.S. HAN and J.C.S. FRAY, *Am. J. Physiol.* 240, F70-F74 (1981).
27. H. RASMUSSEN and D.B.P. GOODMAN, *Physiol. Rev.* 57, 421-509 (1977).

Running Title:

Pertussis Toxin and Renin Secretion.

Key Words:

Renal Cortical Slices

Renin Secretion

Pertussis Toxin

Adrenergic Receptors

IV. RESUMEN DE RESULTADOS

-

IV RESUMEN DE RESULTADOS

En este trabajo se estudia el efecto de la toxina pertussis sobre una de las funciones renales: la secreción de la enzima proteolítica renina, tanto *in vivo* como *in vitro*. El trabajo realizado *in vivo* subraya la importancia fisiológica de los hallazgos, mientras que el trabajo *in vitro* nos permite estudiar el fenómeno de una manera más directa. Por otra parte el trabajo realizado *in vitro* confirma los hallazgos encontrados *in vivo*. Los resultados encontrados fueron:

I. RESULTADOS *IN VIVO*.

1. La toxina pertussis modifica la regulación adrenérgica de la secreción de renina (TRABAJO NUMERO 1).

- a) La epinefrina no modificó la secreción de renina en ratas controles, pero la aumentó importantemente en ratas tratadas previamente con la toxina pertussis. El efecto estimulador de la epinefrina es dependiente de la dosis. Este resultado sugiere que la epinefrina (agonista beta y alfa₂) en presencia de la toxina pertussis se manifiesta como un agonista beta puro, al ser bloqueada la respuesta alfa₂ adrenérgica sobre la secreción de renina.
- b) El efecto de la epinefrina en las ratas tratadas con toxina pertussis fue reproducido en ratas controles cuando se administró el antagonista alfa₂ adrenérgico yohimbina previo a la epinefrina. Este resultado apoya la sugerencia hecha en a) en el sentido de que la toxina pertussis bloquea los efectos inhibitorios (alfa₂ adrenérgicos) de la epinefrina sobre la secreción de renina.
- c) El efecto de la epinefrina fue bloqueado por propranolol (antagonista beta adrenérgico). Este dato confirma que el efecto estimulador de la epinefrina sobre la secreción de renina es debido a la estimulación beta adrenergica.
- d) El agonista beta adrenergico puro isoproterenol aumentó en mayor proporción la secreción de renina en los animales tratados con toxina pertussis que en los controles. Este dato, junto con el bloqueo de la secreción de renina por propranolol (punto c), confirma que la secreción de renina es estimulada por agonistas beta adrenérgicos. Por otra parte la potenciación de la secreción de renina observada en animales tratados con toxina, confirma otros hallazgos reportados previamente en la literatura (citados en el trabajo número 1).

- e) La clonidina (agonista α_2 adrenérgico) disminuyó en mayor proporción de renina en las ratas control que en las tratadas con toxina pertussis. Este dato confirma que la estimulación α_2 adrenérgica disminuye la secreción de renina y que este efecto es bloqueado por la toxina pertussis.
- f) La yohimbina no modificó los valores basales de la secreción de renina en las ratas control y en las tratadas con toxina pertussis.
- g) El propranolol disminuyó los valores basales de la secreción de renina en las ratas control y en las tratadas con toxina pertussis

2. La toxina pertussis potencia la secreción de renina inducida por anestesia.
(TRABAJO NUMERO 2).

- h) Los anestésicos usados (éter, pentobarbital, inactina, cetamina, uretano y cloralosa) estimularon la secreción de renina en las ratas control, este dato confirma sataos previos de la literatura. En las ratas tratadas con toxina pertussis este efecto fue aumento en todos los casos. El aumento en la secreción de renina varió de un anestésico a otro. El anestésico que más estimuló la secreción de renina fue el uretano.
- i) La yohimbina no modificó el aumento en la secreción de renina inducida por por los anestésicos. La yohimbina no pudo reproducir el efecto de la toxina pertussis.
- j) El propranolol bloqueó el aumento en la secreción de renina inducido por los anestésicos tanto en las ratas control como en las tratadas con toxina pertussis. Este resultado confirma la participación beta adrenérgica en la estimulación de la secreción de renina inducida por anestesia. Por otra parte en este modelo de estimulación de la secreción de renina, la toxina pertussis la potencia principalmente debido a estimulación beta adrenérgica.

II. RESULTADOS *IN VITRO*.

1. La toxina pertussis potencia la respuesta beta adrenérgica y bloquea la regulación α_2 adrenérgica de la secreción de renina en rebanadas de corteza renal.
(TRABAJO NUMERO 3).

- k) El isoproterenol estimuló de una manera dependiente de la concentración la secreción de renina en rebanadas de corteza renal de ratas control. La secreción máxima de renina se obtuvo a una concentración 1×10^{-6} M de isoprote-

renol. Esta estimulación fue de aproximadamente 2 veces el valor basal. Este resultado confirma otras observaciones sobre un efecto directo de los agonistas beta adrenérgicos en las células que secretan renina; además confirma las observaciones hechas en los trabajos 1 y 2.

- l) La curva de concentración-respuesta al isoproterenol en las rebanadas de corteza renal de ratas tratadas con toxina pertussis esta desplazada a la izquierda. Bajo estas condiciones la secreción máxima de renina se obtuvo a una concentración de 1×10^{-8} M de isoproterenol. Este dato sugiere un efecto directo de la toxina pertussis sobre las células que secretan renina y confirma los resultados obtenidos *in vivo*.
- m) La epinefrina estimuló la secreción de renina en rebanadas de corteza renal en ratas control. La concentración óptima de epinefrina que estimuló la secreción de renina fue de 1×10^{-5} M. En estas condiciones la estimulación de la secreción de renina fue de aproximadamente del 25% sobre el valor basal. Esta estimulación, así como la producida por el isoproterenol fue bloqueada por el propranolol lo cual sugiere que es debida a una estimulación beta adrenérgica.
- n) La curva conceyración-respuesta para epinefrina está desplazada a la izquierda en rabanadas de corteza renal de ratas tratadas con toxina pertussis, la secreción máxima de renina se observa ahora a una concentración de 1×10^{-8} M y es del 65% sobre el valor basal. La epinefrina se comporta ahora como un agonista beta puro, al igual que en el trabajo realizado *in vivo*.
- o) La clonidina disminuyó la secreción basal de renina y la estimulada por isoproterenol en rebanadas de corteza renal de ratas control. Este resultado confirma los hallazgos reportados en el trabajo 1 y sugiere un efecto directo de la clonidina (vía estimulación alfa₂ adrenérgica) sobre las células que secretan renina.
- p) El efecto inhibitorio de la clonidina observado en ratas control fue bloqueado en ratas tratadas previamente con la toxina pertussis. Estos resultados obtenidos *in vitro* confirman los hallazgos obtenidos *in vivo* y sugieren un efecto directo de la toxina pertussis sobre las células que secretan renina.

V. DISCUSION GENERAL

V DISCUSION GENERAL

En este trabajo se presentan tres enfoques diferentes para el estudio del efecto de la toxina pertussis sobre la secreción de renina. El primero es un modelo *in vivo*, en ratas despiertas en el cual se administran los agentes adrenérgicos subcutáneamente (administración exógena). El segundo es un modelo *in vivo* en ratas anestesiadas en donde hay una liberación endógena de catecolaminas. El tercero es un modelo *in vitro* en rebanadas de corteza renal en donde los agentes adrenérgicos son adicionados al medio de incubación. A pesar de que son modelos diferentes, los resultados obtenidos en conjunto, son consistentes con la conclusión general del trabajo: la toxina pertussis bloquea la regulación alfa₂ adrenérgica de la secreción de renina y potencia la secreción de esta enzima debido a la estimulación beta adrenérgica. Estos resultados confirman y extienden los resultados obtenidos en otros sistemas en los cuales se ha usado la toxina pertussis para aclarar mecanismos de transducción de la señal hormonal

La aportación básica del trabajo es asignar un papel clave a los receptores beta y alfa₂ adrenérgicos renales en la regulación de la secreción de renina. El papel de los receptores alfa₂ adrenérgicos sobre la secreción de renina, no había sido señalado ni demostrado experimentalmente en una forma tan clara. El uso de la toxina pertussis como herramienta permitió conocer el papel funcional de los receptores alfa₂ y beta adrenérgicos renales sobre la secreción de renina. Por lo tanto, estos resultados apoyan el papel del AMPc como segundo mensajero estimulador en la secreción de renina. La manera en que la toxina pertussis modifica la acción de otros mediadores (adenosina, vasopresina, angiotensina II, etc.) sobre la secreción de esta enzima está siendo estudiado en nuestro sistema de rebanadas de corteza renal.

Los resultados obtenidos en esta tesis son consistentes con estudios realizados en nuestro grupo, acerca del efecto de la toxina pertussis sobre la regulación del estado de afinidad de los receptores alfa₂ adrenérgicos renales (61).

En cuanto al segundo mensajero que regula la secreción de renina hay evidencias que apoyan tanto el papel del AMPc como del calcio. Aunque el aumento en las concentraciones intracelulares de calcio generalmente media el aumento en la actividad de células secretoras (67) varias líneas de evidencia apoyan la hipótesis de que el calcio intracelular juega un papel de segundo mensajero inhibitorio en la secreción de renina. La secreción de renina es inhibida por un número de sustancias a través de un incremen-

to de la concentración del calcio intracelular; incluyendo ionóforos de calcio (68,69), angiotensina II (70), vasopresina (71), ouabaína (72,74), vanadato (73) y concentraciones de potasio extracelular que despolarizan la membrana (72). Estos efectos inhibitorios son bloqueados por la remoción y/o quelación del calcio extracelular (68-71, 73-76) y/o por antagonistas de la entrada de calcio tales como metoxiverapamil (71,75), verapamil (77), diltiazem (71) sugiriendo que el incremento en la concentración intracelular de calcio media los efectos inhibitorios.

Por el contrario la secreción de renina es estimulada por un número de sustancias que disminuyen las concentraciones intracelulares de calcio, entre los que se encuentran quelantes de calcio (70-76), el magnesio que es un antagonista inorgánico del calcio (79), la fenitofina (80), el isoproterenol (81-83). Consistentemente los efectos estimulatorios de muchos de estos agentes son antagonizados por sustancias que incrementan el calcio intracelular, entre los que se encuentran la ouabaína y el vanadato (73), la angiotensina II y la vasopresina (84) y la despolarización por potasio (81,84). Por otra parte varias líneas de evidencia indican que el AMPc es el segundo mensajero estimulatorio en la secreción de renina. La estimulación beta adrenérgica y el glucagon estimulan la secreción, más probablemente por la activación de la adenilato ciclasa. Varios inhibidores de las fosfodiesterasas estimulan la secreción de renina, AMPc exógeno y principalmente dibutiril AMPc (84). Debido a que muchas sustancias al incrementar el calcio intracelular (vasopresina, angiotensina II, altas concentraciones de potasio extracelular, ouabaína y vanadato) antagonizan los efectos estimulatorios sobre la secreción de renina del isoproterenol, el dibutiril AMPc e inhibidores de las fosfodiesterasas, se ha sugerido que el AMPc como segundo mensajero estimula la secreción de renina disminuyendo las concentraciones intracelulares de calcio en las células yuxtglomerulares (84), así como en las células de músculo liso (85), las células de las cuales derivan las células yuxtglomerulares (86). Evidentemente las investigaciones que forman parte de esta tesis abren nuevas posibilidades para el estudio y la caracterización de los papeles que estos segundos mensajeros (calcio y AMPc) juegan en la regulación de la secreción de renina.

VI. CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

El uso de la toxina pertussis como herramienta en este estudio nos permite concluir que los receptores adrenérgicos renales (beta y alfa₂) juegan un papel muy importante en la regulación de la secreción de renina. Los efectos mediados a través de la estimulación de estos receptores, tanto el aumento en la secreción de renina (por estimulación de los receptores beta adrenérgicos), como la inhibición de la secreción de esta enzima (por estimulación de los receptores alfa₂ adrenérgicos), son debidos a la estimulación o inhibición de la adenilato ciclasa, ya que ambos tipos de receptores están acoplados a esta enzima, los beta de una manera estimuladorio y los alfa₂ de una manera inhibitoria. Por otra parte también podemos concluir que los receptores beta adrenérgicos son tan importantes como los alfa₂ adrenérgicos en la regulación de la secreción de renina, y que la activación o inhibición de la adenilato ciclasa juega un papel central en el proceso. Por lo tanto podemos concluir, aunque de una manera indirecta, que el AMPc es un segundo mensajero estimuladorio en la secreción de renina.

VII. REFERENCIAS

VII REFERENCIAS

1. Peach, M.J. Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action. *Physiol. Rev.* 57: 313-370, 1977.
2. Tigerstedt, R. y Bergmann, P.G. Niere und Kreislauf. *Scand. Arch. Physiol.* 8: 223-271, 1898. Citado en la referencia 1.
3. Goldblatt, H., Lynch, J., Haizal, R.F. y Summerville, W.W. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59: 347-379, 1934.
4. Goldblatt, H. The renal origin of hypertension. *Physiol. Rev.* 27: 120-165, 1947.
5. Goldblatt, H. The renal origin of hypertension. Charles C. Thomas, Springfield, ILL, 1948.
6. Page, I.H. y Helmer, O.M. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* 71: 29-42, 1940.
7. Braun-Menéndez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F. y Muñoz, J.M. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98:283-298, 1940.
8. Kahn, J.R., Skeggs, L.T. Jr., Shumway, N.P. y Winsenbaught, P.E. The assay of hypertensin from the arterial blood of normotensive and hypertensive human beings. *J. Exp. Med.* 95: 523-529, 1952.
9. Wakerlin, G.E., Bird, R.B., Brennam, B.B., Frank, M.H., Kremman, S., Kuperman, F. y Skom, J.H. Treatment and prophylaxis of experimental renal hypertension with "renin". *J. Lab. Clin. Med.* 41: 708-728, 1953.
10. Kremen, S.H. y Wakerlin, G.E. Renin and antirenin in treatment of long term experimental hypertension in the dog. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 99-104, 1955.
11. Wakerlin, G.E. antibodies to renin as proof of the pathogenesis of sustained renal hypertension. *Circulation* 17: 653-657, 1958.
12. Skeggs, L.T. Jr., Marsk, W.H., Kahn, J.R. y Shumay, N.P. The purification of hypertensin. *J. Exp. Med.* 100: 363-370, 1954.
13. Peart, W.J. The isolation of a hypertensin. *Biochem. J.* 62: 520-527, 1956.
14. Skeggs, L.T. Jr., Marsh, W.H., Kahn, J.R. y Schumway, N.P. The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.* 99: 275-282, 1954.
15. Keeton, T.K. y Campbell. The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32: 81-227, 1980.
16. Misono, K.S., Chang, J-H., e Inagami, T. Amino acid sequence of mouse submaxillary gland renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4858-4862, 1982.

17. Panthier, J.-J., Foote, S., Chambreud, B., Strosberg, A.D., Corvol, P. y Rougeon, F. Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298: 90-92, 1982.
18. Murakami, K., Hirose, S., Miyazaki, H., Imai, T., Hori, H., Hayashi, T. Kogenyama, R., Ohkubo, H. y Nakanishi, S. Complementary DNA sequences of renin. State of the art review. *Hypertension* 6 (suppl 1) : 1-95-1-100, 1984.
19. Ohkubo, H., Kageyama, R., Ujihara, M., Hirose, T., Inayama, S y Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc. - Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2196-2200, 1983.
20. Doolittle, R.F. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombinovalbumin family. *Science* 222: 417-419, 1983.
21. Tewksbury, D.A. Angiotensinogen. En *Biochemical Regulation of blood pressure*. Editado por Richard L. Soffer. John Wiley & Sons pp. 95-120, 1981.
22. Campbell, D.J., Bouhnik, J., Ménard, J. y Corvol, P. Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. *Nature* 308: 206-208, 1984.
23. Nasjletti, A., y Masson, G.M.C. Stimulation of angiotensinogen formation by renin and angiotensins. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 142: 307-310, 1973.
24. Murakami, E., Hiwada, K. y Kokubu, T. Effects of insulin and glucagon on production of renin substrate by the isolated rat liver. *J. Endocrinol.* 85 151-153, 1980.
25. Weigand, K., Wernze, H. y Falge, C. Synthesis of angiotensinogen by isolated rat liver cells and its regulation in comparison to serum albumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75: 102-110, 1977.
26. Murakami, E., Eggena, P., Barrett, J.D., y Sambhi, M.P. Heterogeneity of renin substrate released from hepatocytes and in brain extracts. *Life Sci.* 34: 385-392, 1984.
27. Dzau, V.J. y Herrmann, H.C., Hormonal regulation of angiotensinogen production. *Life. Sci.* 30: 577-584, 1982.
28. Caluser, E., Bouhnik, J., Coezy, E., Corvol, P. y Menard, J. Synthesis and release of immunoreactive angiotensinogen by rat liver slices. *Endocrinology* 112: 1188-1193, 1983.
29. Soffer, R.L. Angiotensin-converting enzyme. En *Biochemical regulation of blood pressure*. Editado por Richard L. Soffer. John Wiley & Sons; pp. --- 123-164, 1981.
30. García Sáinz, J.A. y Fain, J.N. Regulation of adipose tissue metabolism by catecholamines: roles of alpha, and beta adrenoceptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 3: 201-203, 1982.
31. Fain, J.N. y García-Sáinz, J.A. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lip. Res.* 24: 945-966, 1983.

32. Ariens, E.J., Beld, A.J., Miranda, J.F.R. y Simonis, A.M. The pharmacoreceptor-effect concept. En: Receptors, Vol. I General Principles and procedures. Editado por D.O' Brien. Plenum Press, N.Y. 33-91, 1979 .
33. Fain, J.N. y García-Sáinz, J.A. Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 and adenylyl cyclase inhibition in α_2 effects of catecholamines. *Life Sci.* 26: 1183-1194, 1980.
34. García-Sáinz, J.A., Corvera, S., Villalobos-Molina, R. y Huerta-Bahena, J. Modulación adrenérgica del metabolismo hepático. *Boletín de Educación Bioquímica, Facultad de Medicina , UNMA*, 1: 1-8, 1982.
35. Huerta-Bahena, J. y García-Sáinz, J.A. Possible involvement of two mechanism of signal transduction in α_1 -adrenergic action. Selective effect of cicloheximide. *Biochem. Biophys. Acta.* 845: 131-137, 1985.
36. McGrath, J.C., Evidence form more than one type of postjunctional α -adrenoceptor. *Biochem. Pharmacol.* 31: 467-484, 1982.
37. Lefkowitz, R.J. Alpha and beta adrenergic receptors: En: *Biochemical regulation of blood pressure*. Editado por Richard L. Soffer. John Wiley & Sons. pp. 283-299, 1981.
38. Motulsky, H.J. e Insel, P.A. Adrenergic receptors in man. *J. Clin. Invest.* 307: 18-29, 1982.
39. Muñoz, J.J. y Bergman, R.K. Biological activities of Bordetella pertussis. En: *International symposium on pertussis*. Editado por Manclarck, C.R. e Hill, J.C. U.S. DHEW Publication No. (NIH) 79-1830, p 143-150, 1979.
40. Morse, S.I. y Morse J.H. Isolation and properties of the leukocytosis and lymphogtosis promoting factor of Bordetella pertussis: *J. Exp. Med.* 143: 1483-1502, 1976.
41. Yajima, M., Hosoda, K., Kanbayashi, Y., Nakamura, T., Nogimori, K. Mizushima, Y., Nakase, Y. y Ui. M. Islets-activating protein (IAP) in Bordetella pertussis that potentiates insulin secretory responses of rats. Purification and characterization. *J. Biochem.* 83: 295-303, 1978.
42. Sekura, R.D., Fish, F., Manclarck, C.R., MEade, B. y Zhang, Y.L. Pertussis toxin Affinity purification of a new ADP-ribosiltransferasa. *J. Biol. Chem.* 258: 14647-14651, 1983.
43. García-Sáinz, J.A., Ruiz-Puente J., Jiménez-Paredes, J., González-Pacheco, M. y Villalba-Posada, H. Comparative biological activites of whole cell pertussis vaccine and a new acellular preparation.. *Vaccine* 3: 23-26, 1985.
44. García-Sáinz, J.A. Decreased sensitivity to α_2 adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from hamsters treated with pertussis vaccine. *FEBS Lett* 126: 306-308, 1981.

45. Katada, T. y Ui. M. Perfusion of the pancreas isolated from pertussis-sensitized rats. Potentiation of insulin secretory responses due to beta-adrenergic stimulation. *Endocrinology* 101: 1247-1255, 1977.
46. Martínez-Olmedo, M.A. y García-Sáinz, J.A. Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 760:215-220, 1983.
47. Martínez-Olmedo, M.A. y García Sáinz, J.A. Direct Action of pertussis toxin in isolated hamsters fat cells. *Eur. J. Pharmacol.* 99: 115-118, 1984.
48. Katada, T. y Ui. M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase - system by islet activatin protein due to ADP-ribosylation of membrane protein. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 79: 3129-3133, 1982.
49. Katada, T. y Ui. M. ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 257: 7210-7216, 1982.
50. Stryer L. *Biochemistry*. W.H. Freeman & Co. 2nd. Ed, 1983.
51. Kurose, H., Katada, T., Amano, T. y Ui. M. Specific uncoupling by islet activatin protein, pertussis toxin, of negative signal trasduction via alpha- -- adrenergic, cholinergic and opiate receptors in neuroblastomá x glioma hibrid cells. *J. Biol. Chem.* 258: 4870-4875, 1983.
52. Hazeki, O. y Ui, M. Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells *J. Biol. Chem.* 256: 8310-8317, 1981.
53. Katada, T y Ui. M. Islet-activating protein. A modifier of receptor-mediated regulation of rat islet adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256:8310-8317, 1981.
54. Murayama, Y. y Ui. M. Loss of the inhibitory function the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet activating protein, pertussis toxin in adypocite membrane. *J. Bio. Chem.* 258: 3319,3326, 1983.
55. Boyer, J.L. Cárdenas, C., Posadas, C. y García Sáinz, J.A. Pertussis toxin induces tachicardia and imparied increase in blood pressure produced by alpha₂ adrenergic agonist. *Life Sci.* 26: 2627-2633, 1982.
56. Boyer, J.L., Posadas, C. y García-Sáinz, J.A. Effect of pertussis vaccine on alpha adrenoceptor of the circulatory sistem of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 83:12-126, 1982.
57. Pushpendran, C.K., Corvera, S. y García-Sáinz, J.A. Effect of pertussis toxin on hormonal responsiveness of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 160:1983-202, 1983.
58. Cronin, M.J., Rogol, A.D., Myres, G.A. y Hewlett, E.L. Pertussis toxin blocks the somatostatin-induced inhibition of growht hormone release and adenosine 3',5' monophospate accumulation. *Endocrinology* 113:209-215, 1983.

59. Cronin, J.J., Myers, G.A., MacLeod, R.M., Hewlett, E.L. Pertussis toxin uncouples dopamine agonist inhibition of prolactin release. *J. Physiol.* 244 (Endocrin. Metab. 7): E499-E504, 1983.
60. García-Sáinz, J.A., Boyer, J.L., Thomas, M., Sawyer, D., Stiles, G.L., Dohlman, H. y Lefkowitz, R.J. Effect of pertussis toxin on alpha₂-adrenoceptors: decreased formation of high affinity state. *FEBS Lett.* 172: 95-98, 1984.
61. Boyer, J.L., García, A., Posadas, C. y García-Sáinz, J.A. Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonist of renal alpha₁ and alpha₂-adrenoceptors. *J. Biol. Chem.* 259: 8076-8079, 1984.
62. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. e Ishi, S. Subunit structure of islet-activating protein pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21: 5516-5522, 1982.
63. Moss, J., Stanley, S.J., Burns, D.L., Hsia, J.A., Yost, D.A., Myers, G.A. y Hewlett, E.L. Activation by thiol of the latent NAD glycohydrolase and ADP ribosyltransferase activities of *Bordetella pertussis* toxin (islet-activating protein). *J. Biol. Chem.* 258: 11879-11882, 1983.
64. Katada, T., Tamura, M. y Ui, M. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 290-298, 1983.
65. Tamura, M., Nogimori, K., Yajima, M., Ase, K. y Ui, M. A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin in development of the biological effects on intact cells. *J. Biol. Chem.* 258: 6756-6761, 1983.
66. Manning, D.R., Fraser, B.A., Kahn, R.A. y Gilman, A.G. ADP-ribosylation of transducin by islet-activating protein. *J. Biol. Chem.* 259: 749-756, 1984.
67. Rubin, P. Calcium and cellular secretion. Plenum Press. N.Y., 1982.
68. Baubach, L. y Leyssac, P.P. Studies on the mechanism of renin release from isolated superfused glomeruli: effects of calcium, calcium ionophore and lanthanum. *J. Physiol. (Lond.)* 273:745-764, 1977.
69. Fynn, M., Onomakpome, N. y Peart, W.S. The effects of ionophores (A 13187 and R02-2985) on renin secretion and renal vasoconstriction. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Soc.* 199: 199-212, 1977.
70. Van Dongen, R. y Pearts, W.S. Calcium dependency of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 50: 125-129, 1974.
71. Churchill, P.C. Calcium dependency of the inhibitory effect of antidiuretic hormone on in vitro renin secretion in rats. *J. Physiol. (Lond.)* 315:21-30, 1981.
72. Park, C.S. y Malvin, R.L. Calcium in the control of renin release. *Am. J. Physiol.* 235: F 22- F 25, 1978.

73. Churchill, P.C., y Churchill, M.C. Vanadate inhibits renin secretion from rat kidney slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213: 144-149, 1980.
74. Churchill, P.C. Possible mechanism of the inhibitory effect of ouabain on renin secretion from rat renal cortical slices. *J. Physiol. (Lond)* 294: 123-134, 1979.
75. Churchill, P.C. Effect of D-600 on inhibition of in vitro release in the rat by high extracellular potassium and angiotensin II. *J. Physiol. (Lond)* 304: 449-458, 1980.
76. Churchill, M.C. y Churchill, P.C. Separate and combined effects of ouabain and extracellular potassium on renin secretion from rat renal cortical slices. *J. Physiol. (Lond)* 300: 105-114, 1980.
77. Park, C.J., Han, D.S. y Fray, J.C.S. Calcium in the control of renin secretion. Calcium influx as an inhibitory signal. *Am. J. Physiol.* 240: F70-F74, 1981.
78. Churchill, P.C., McDonald, y Churchill, M.C. Effect of diltiazem, a calcium antagonist on renin secretion from rat kidney slices. *Life Sci.* 29: 383-389, 1981.
79. Churchill, P.C. y Lyons, H.H. Effect on intrarenal arterial infusion of magnesium on renin release in dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152: 6-10, 1976.
80. Churchill, P.C., McDonald F.D. y Churchill, M.C. Phenytoin stimulates renin secretion from rat kidney slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 615-619, 1979.
81. Churchill, P.C. y Churchill, M.C. Biphasic effect of extracellular potassium on isoproterenol-stimulated renin secretion from rat kidney slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214: 541-545, 1980.
82. Fray, J.C.S. Stimulus secretion coupling of renin. *Circ. Res.* 47: 485-492, 1980.
83. Peart, W.S. Intra-renal factors in renin release. *Contrib. Nephrol.* 12: 5-15, 1978.
84. Churchill, P.C. y Churchill, M.C. Isoproterenol-stimulated renin secretion in the rat. Second messenger roles of Ca and cyclic AMP. *Life Sci.* 30: 1313-1319, 1982.
85. Mueller, E. y Van Breemen, C. Role of intracellular Ca²⁺ sequestration in beta adrenergic relaxation of a smooth muscle. *Nature (Lond)* 281: 683-683 1979.
86. Barajas, L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol.* 237: - - F333-F343, 1979.