

2 of 153



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Ciencias

REGULACION INTRACELULAR DE LA
SEGRECION DE RENINA

T E S I S

Que para obtener el título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

Silvia Ivette Moreno Muñiz

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989



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 está 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.

RESUMEN

En este trabajo se describen aspectos sobre la bioquímica, biosíntesis, y secreción de la enzima renina, así como el control intracelular de su liberación. Esta enzima forma parte del sistema renina-angiotensina, que tiene un papel importante en el mantenimiento del volumen y la presión arterial. La renina es una aspartil proteinasa altamente específica que es sintetizada y almacenada en células especializadas de más de un órgano o tejido. La renina libera la angiotensina I (AI), a partir de su sustrato la glucoproteína angiotensinógeno, la AI tiene poca o nula actividad biológica, pero es convertida por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) a el octapéptido activo angiotensina II (AII), el cual tiene todos los efectos periféricos del sistema. La acción enzimática de la aminopeptidasa A libera el ácido aspártico (Asp), produciendo el heptapéptido angiotensina III (AIII), que es menos potente que la AII. La renina es producida principalmente en células modificadas de músculo liso de la arteriola aferente del glomerulo renal, las células yuxtglomerulares (YG) exhiben aspectos de células de músculo liso tales como miofibrillas y de células endócrinas tales como gránulos secretores, por esto, se consideran como células mixoendócrinas. El citoplasma de estas células contiene gránulos de secreción unidos a la membrana, la renina intracelular se localiza en los gránulos maduros (60%), el resto de la actividad se localiza en la membrana plasmática, retículo endoplásmico y en el espacio soluble citoplásmico. Otro aspecto estructural de las células YG es la presencia de vacuolas ligadas a la membrana. Estas vacuolas no están generalmente asociadas con

el complejo de Golgi, como se observa en otros sistemas, pero sí, con el retículo endoplásmico, lo que representa un camino paralelo de la síntesis y transporte de la renina que esquiva al Golgi. Las células granulares YG tienen un papel fundamental de respuesta a una caída de la presión arterial secretando renina, que al producir AII actúa elevando la presión arterial hasta valores normales.

Los genes de renina de humano, rata y ratón han sido clonados y secuenciados. El gen de renina humano tiene un tamaño aproximado de 12.5 Kb, contiene 10 exones y 9 intrones. Esto difiere de los genes de rata y ratón los cuales contienen solo 9 exones. Existen entre la renina y otras proteasas de aspartato homología en la estructura del gen así como en la secuencia de aminoácidos (aa). La estructura tridimensional de la renina sugiere que esta es una proteína con dos lóbulos simétricos, donde se pueden predecir 10 dominios estructurales, los dominios de la primera mitad de la proteína pueden ser pareados con aquellos en la segunda mitad, basados en su estructura secundaria y sus posiciones simétricas, en relación al sitio de unión del sustrato. Como se mencionó anteriormente, la renina es una proteasa de aspartato, contiene dos residuos de Asp en el sitio activo, que son esenciales para su función. La renina es activa a pH neutro, tiene grupos SH libres y es altamente selectiva para su sustrato.

Actualmente se conoce la secuencia de aa de la renina de la glándula submaxilar de ratón (GSM), de riñón de ratón, de rata y de humano (A partir de su secuencia de bases de su ADNc). La

prepro-renina renal humana consta de 406 residuos de aa y un PM de 45,067 Da, la renina procesada tiene un PM de 37,235 Da y consta de 340 residuos de aa. La prepro-renina de la GSM de ratón, consta de 401 residuos de aa y un PM de 42,209 Da. La renina procesada consta de dos cadenas una ligera y una pesada, y la molécula completa tiene un PM de 36,494 Da. La prepro-renina renal de ratón consta de 402 aa. La diferencia principal entre la renina de la GSM de ratón y de la de riñón es la presencia de tres sitios de glucosilación en la enzima renal. A diferencia de la renina renal de ratón la renina renal de rata, al igual que la renina renal humana, consta de solo una cadena.

La biosíntesis y el procesamiento de la prepro-renina ha sido estudiado en la GSM de ratón y riñón de de ratón y humano normal. El producto primario de la traducción de ARNm (prepro-renina) es hidrolizado para producir el zimógeno pro-renina.

En el riñón humano normal la pro-renina puede seguir una de las dos vías:

1. Secretarse por vía constitutiva directamente del Golgi o del protogranulo.
2. Empaquetarse en granulos inmaduros donde es procesada adicionalmente a la renina madura y activa, esta es liberada de los granulos secretores de una manera regulada.

La renina, al igual que otras protefmas de secreción, ha sido identificada, en el reticulo endoplasmico rugoso, aparato de Golgi, granulos secretores y membrana plasmática.

El incremento de la síntesis y secreción de la renina, se hace evidente por la expansión del reticulo endoplasmico rugoso,

posteriormente pasa al aparato de Golgi en donde se termina el proceso de glucosilación iniciado en el retículo endoplásmico y se realizan modificaciones adicionales para empaquetar a las proteínas hacia su propio destino. En el Golgi toman lugar dos procesos separados de vesiculación. Un proceso envuelve la formación de vesículas o gránulos los cuales son totalmente translúcidos. Se piensa, que estos gránulos secretan su contenido por exocitosis en una manera constitutiva, no regulada, con una vida media entre síntesis y liberación de 10 minutos. La secreción constitutiva es rápida y continua. Las proteínas liberadas no se concentran apreciablemente ni permanecen en la célula por más de un minuto, por el contrario, la secreción regulada es disparada episódicamente por señales específicas.

Existen tres modelos de secreción, para la renina: exocitosis granular, solubilización intracitoplásmica y un tipo lisosomal (fusión gránulo-gránulo).

En la exocitosis se presentan cuatro eventos:

1. Aumento del Ca citosólico después de la estimulación .
2. Fusión de los gránulos con la membrana plasmática.
3. Hinchamiento de los gránulos inmediatamente después de la fusión.
4. Fisión o descarga de los contenidos granulares dentro del espacio extracelular.

Los dos últimos eventos se han confirmado para la secreción de renina.

El modo de secreción de renina por solubilización

citoplásmica sugiere: un incremento en la permeabilidad de la membrana a la renina, debido a un aumento del hinchamiento, que hace posible que el gránulo libere su producto secretorio en el espacio citoplásmico. Los gránulos pierden su material denso de su periferia y al mismo tiempo la membrana del gránulo, se alarga y algunas veces desaparece, los gránulos se unen y liberan su contenido al espacio citoplásmico.

El destino final de la renina en el espacio citosólico tiene varias posibilidades: regresar a los gránulos o a los lisosomas, y otra posibilidad es que la renina tome el camino a la membrana plasmática donde ésta es descargada de la célula.

Otro modo de secreción es la "Secreción Lisosomal" en la que se sugiere a los gránulos de renina como lisosomas, por contener fosfatasa ácida. No se sabe mucho acerca de los mecanismos celulares que liberan las enzimas lisosomales, pero la presencia de una proteína de enlace (receptor) en el Golgi, en el prelisosoma (vacuola?), en la membrana plasmática y presumiblemente en el espacio soluble citoplásmico sugieren un mecanismo que involucra una exportación directa de la célula.

Los mensajeros intracelulares involucrados en la regulación de la secreción de renina (SR) de las células YG son el calcio (Ca), el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y el guanosin monofosfato cíclico (GMPC). Contrario a lo que pasa en la mayoría de los sistemas secretores, el aumento en la concentración intracelular de Ca y la activación de la proteína cinasa C y de la calmodulina, no estimulan sino que inhiben la SR.

La concentración intracelular de Ca de las células YG puede modificarse si: 1) Se alteran los mecanismos normales de

extrusión de Ca de estas células (el intercambio Na-Ca depende del gradiente de sodio entre el espacio extracelular y el espacio intracelular, el cual es mantenido por la actividad de la ATPasa de Na-K). Cuando esta última es bloqueada por inhibidores tales como la ouabaina y el vanadato, o por la disminución de la concentración extracelular de potasio, se detiene la salida de Ca de las células, aumenta la concentración intracelular y se inhibe la SR. Por el contrario, la estimulación de la ATPasa de Na-K por fenitoína estimula la salida de Ca y aumenta la SR. La ATPasa de Ca es inhibida por el vanadato y estimulada por una cinasa de proteínas dependiente de AMPc.

- 2) Se bloquea la salida de Ca con lantano.
- 3) Se abren o cierran los canales de Ca sensibles a voltaje. Estos canales pueden ser abiertos por despolarización de las células por altas concentraciones de potasio extracelular (60 nM) esto aumenta la concentración de Ca intracelular y produce inhibición de la SR. Este efecto inhibitorio es bloqueado por la quelación de Ca extracelular o con bloqueadores de estos canales tales como el verapamil, el metoxiverapamil, el diltiazem, o la nifedipina.
- 4) Se modifica la captación o liberación de Ca del retículo endoplásmico. El TMB-8 bloquea la liberación de Ca de los reservorios intracelulares y estimula la SR.
- 5) Se hace permeable la membrana plasmática al Ca con ionóforos tales como el A23187.
- 6) Las células YG son estimuladas por hormonas que aumentan la concentración intracelular de Ca y activan a la proteína cinasa C tales como la AII, la vasopresina o los agonistas alfa-1 adrenérgicos. Los ésteres de frobol activan directamente a la proteína cinasa C e inhiben la SR.
- 7) Se

aumenta o se disminuye la concentración extracelular de Ca.

Los inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc y las hormonas y los agentes que activan a la adenilato ciclasa (agonistas beta adrenérgicos, bradicinina, histamina, forskolina y N etilcarboxamida adenosina) aumentan el contenido de AMPc, y los niveles de este correlacionan directamente con el aumento de la SR. Por el contrario, las hormonas y agentes que inhiben a la ciclasa tales como los agonistas alfa-2 adrenérgicos, el neuropéptido Y, la AII y la coclohexil adenosina inhiben la SR. La toxina pertussis aumenta la secreción basal de renina, bloquea la inhibición producida por agentes que inhiben a la adenilato ciclasa y potencia la estimulación producida por los agonistas beta adrenérgicos.

En las células YG, el péptido natriurético atrial inhibe la SR, aumenta los niveles de GMPC y disminuye los de AMPc. El aumento de GMPC correlaciona con la inhibición de la SR.

INDICE

	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	1
1.1. APARATO YUXTAGLOMERULAR, MACULA DENSA Y CELULAS YUXTAGLOMERULARES.....	3
1.2. RENINA.....	7
1.3. BIOQUIMICA Y FORMACION DE LA RENINA.....	8
1.3.1. GEN.....	8
1.3.2. ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS DE RENINA.....	12
1.3.3. SECRECION.....	22
1.3.3.1. EXOCITOSIS.....	25
1.3.3.2. SOLUBILIZACION CITOPLASMICA.....	28
1.3.3.3. SECRECION LISOSOMAL.....	29
2. TRANSDUCCION HORMONAL.....	30
2.1. SISTEMA ADENILATO CICLASA.....	31
2.2. SISTEMA FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.....	37
2.3. PROPAGACION INTRACELULAR.....	40
3. REGULACION INTRACELULAR DE LA SECRECION DE RENINA.....	43
3.1. EL PAPEL DEL CALCIO EN LA SECRECION DE RENINA.....	46
3.2. EL PAPEL DEL AMPc EN LA SECRECION DE RENINA.....	57
3.3. EL PAPEL DEL GMPc EN LA SECRECION DE RENINA.....	62
3.4. INTERACCIONES AMPc-Ca ⁺² Y Ca ⁺² -AMPc.....	64
4. CONCLUSIONES.....	68
5. BIBLIOGRAFIA.....	72

I. INTRODUCCION

1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

El sistema renina angiotensina (SRA), es un sistema enzimático hormonal que controla el balance de electrolitos, el volumen y la presión arterial (1) (figura 1). La renina (E.C. 3.4.99.19) es una enzima producida principalmente por las células granulares yuxtglomerulares (YG) del riñón, y es limitante de la velocidad del SRA. La renina libera el decapeptido angiotensina I (AI) contenido en el extremo amino de su sustrato, la glucopeptina angiotensinógeno, cuyo principal sitio de síntesis es el hígado. La AI tiene poca o nula actividad biológica, pero cuando pasa a través de la circulación pulmonar es convertido por la ECA al octapeptido angiotensina II (AII) (2) el cual tiene las siguientes acciones fisiológicas: 1) es un potente vasoconstrictor, 2) estimula la liberación de la hormona aldosterona de las glándulas suprarrenales la que promueve la reabsorción de sodio y agua en el túbulo renal, 3) actúa directamente en el cerebro para: a) incrementar la presión sanguínea mediante el sistema nervioso simpático y parasimpático, b) estimular la sed, y c) estimular la secreción de vasopresina y de la hormona adrenocorticotrópica, 4) inhibe la secreción de renina, 5) estimula la secreción de angiotensinógeno, 6) aumenta la secreción de catecolaminas de las glándulas suprarrenales y facilita la transmisión adrenérgica (3).

La AII tiene una vida media muy corta (30 seg.) y su producción continua depende de la presencia del sustrato de

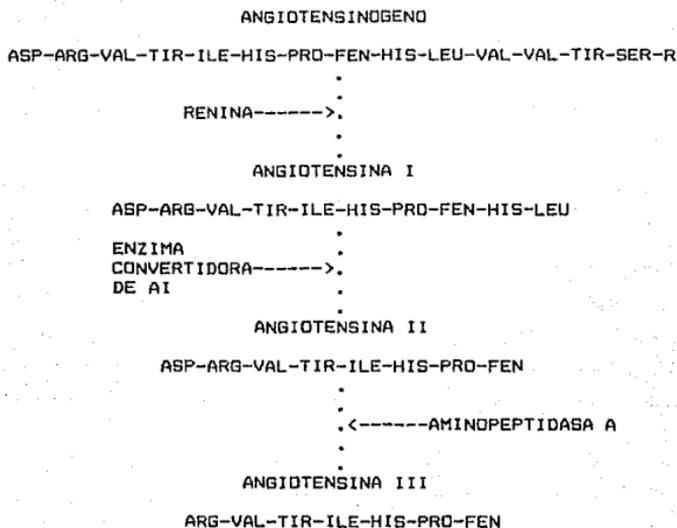


FIGURA 1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

renina que generalmente tiene una concentración constante.

La acción enzimática de la aminopeptidasa A libera el ácido aspártico (Asp), grupo amino terminal (N terminal) de la molécula de AII, produciendo el heptapéptido angiotensina III (AIII) que es menos potente que la AII para estimular la biosíntesis de aldosterona y posee solo una quinta parte de su potencia vasopresora (figura 1). Por lo tanto, el sistema es vasoconstrictor y antinatriurético (evita la pérdida de sodio a través de la orina), y en condiciones normales actúa con sistemas vasodilatadores para mantener la presión arterial constante a pesar de los cambios en el consumo de sodio y en la actividad física del sujeto.

La renina también se ha localizado en varios tejidos tales como el útero, la placenta, el cerebro, el hipotálamo, la glándula pineal, la pared de arterias y venas, en la glándula submaxilar (GSM) de ratón y en ciertos tumores (4-16).

1.1 APARATO YUXTAGLOMERULAR, MACULA DENSA Y CELULAS YUXTAGLOMERULARES

El aparato yuxtaglomerular (AYG) consiste de un componente vascular que incluye las arteriolas aferentes y eferentes de los glomérulos, un componente tubular definido del túbulo distal conocido como la mácula densa y una región recientemente descrita de células peripolares que contienen gránulos (17-20) (figura 2). Más del 90% de la renina en el AYG se localiza en las arteriolas aferentes y menos del 1% en las arteriolas eferentes (21).

La mácula densa es la región proximal del túbulo distal

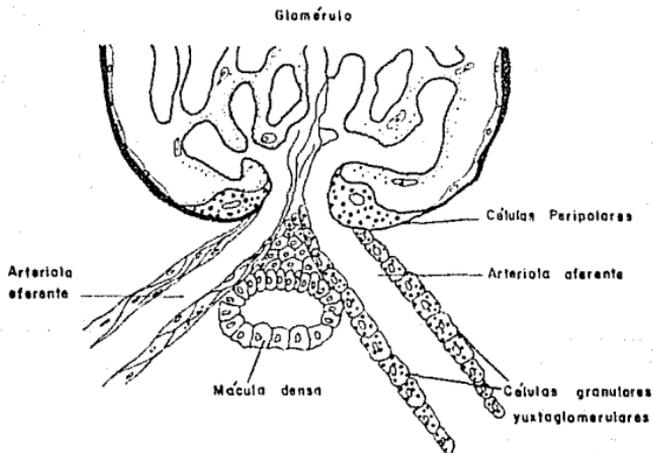
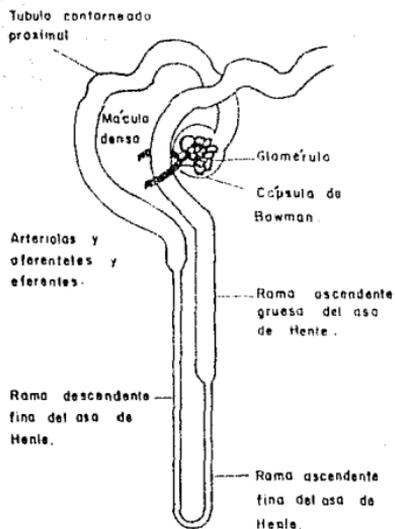


Figura 2
Diagrama del aparato yuxtaglomerular .

yuxtapuesta a las arteriolas aferentes y eferentes, y está en estrecho contacto con las células granulares YG (22-24). Como ya se mencionó, las células granulares YG, localizadas en la pared de la arteriola aferente, sintetizan, almacenan y secretan renina (21). Las células granulares YG se conocen también como células epiteloides para distinguirlas de las células agranulares que no manifiestan actividad secretora de renina. Las células granulares reemplazan a las células de músculo liso en la arteriola aferente. Los detalles ultraestructurales de la transformación de las células de músculo liso a células YG no están determinados, pero sí está claro que las células granulares YG exhiben aspectos de células de músculo liso tales como las miofibrillas y de las células endócrinas tales como gránulos secretores, los cuales se tinen con colorantes como el rojo neutro (22,26-29). No está claro si la característica fisiológica de las células granulares YG es de células de músculo liso o de células endócrinas, pero se ha sugerido que las células YG deben ser consideradas como células mioendocrinas ya que poseen ambas características.

El citoplasma de las células granulares YG contiene gránulos de secreción unidos a la membrana. Estos gránulos son más grandes, están en menor cantidad que en otras células secretoras y pueden variar en madurez, tamaño y localización. Los gránulos maduros varían de 0.8-1.2 micras de diámetro y están localizados principalmente en la periferia de la célula (18,26). Los gránulos más pequeños, de homogeneidad variable, se encuentran más frecuentemente en racimos en el interior de la célula alrededor del complejo de Golgi (26,30). Cerca del 60% de la actividad de

la renina intracelular se localiza en los gránulos maduros (31). El resto de la actividad se localiza en la membrana plasmática (32-35), retículo endoplásmico (32,33) y en el espacio soluble citoplásmico (36).

Los gránulos de las células granulares Y6 tienen ciertos aspectos en común con los lisosomas: capacidad autofágica, secuestro de fosfatasa ácida y acumulación de indicadores exógenos que esquivan al Golgi (37,38). Los gránulos también contienen catepsina B y D, enzimas lisosomales, con propiedades similares a la renina (39,40). En los primeros estudios, se identificaron a los gránulos de renina como lisosomas, (29,41) pero Morris y Jhonson (42) encontraron que los gránulos de renina pueden ser distintos de los lisosomas. Sin embargo, la evidencia arriba citada (39-40) y la presencia de enzimas y colorantes específicos para lisosomas en las células granulares Y6, apoyan fuertemente la conclusión de que los gránulos de renina son lisosomas.

La mayor parte de los lisosomas son gránulos intracelulares, que bajo circunstancias normales no son ocupados en la secreción exocitótica (43). Aunque sus contenidos son procesados intracelularmente, pueden también ser observados en el espacio extracelular (44).

Otro aspecto ultraestructural de las células granulares Y6 es la presencia de vacuolas ligadas a la membrana. Estas son mucho más pequeñas que los gránulos secretores y están frecuentemente incorporadas en los gránulos. (26,37).

En algunas ocasiones las vacuolas pueden contener un

material floculento con o sin un núcleo denso, pero estas han mostrado contener renina (45). Estas vacuolas no están generalmente asociadas con el complejo de Golgi, como se observa en otros sistemas (46), pero sí con el retículo endoplásmico rugoso (45). Dichas observaciones sugieren que estas vacuolas, representan un camino paralelo de la síntesis y transporte de renina que esquiva el procesamiento en el Golgi. La evidencia de un camino paralelo de procesamiento y síntesis de renina ha sido obtenida por estudios de Pratt y col. (47) en la GSM y de Galen y col. (48) en las células YG tumorales.

El número de vacuolas aumenta con las condiciones que incrementan el contenido renal de renina y su secreción, por lo tanto, pueden representar un importante depósito de almacenamiento para la renina durante la depleción de sodio (21, 49, 50, 51).

Las células YG tienen un papel fundamental de respuesta a una caída de la presión arterial secretando renina, lo cual activa al SRA, eleva los niveles de AII (figura 1) y aumenta la presión arterial hasta valores normales. Este efecto no es permanente por que la cantidad extra de sodio en la sangre y el aumento de presión dentro de la arteriola, actúan haciendo que las células YG disminuyan su actividad secretora. Estos mecanismos de retroalimentación negativa evitan que la presión arterial se conserve en valores excesivamente altos.

1.2. RENINA.

Aunque la renina fue descubierta por Tigersted y Bergman en

1898 (52) su importancia no fue apreciada sino hasta después de los trabajos de hipertensión renovascular experimental de Harry Goldblatt en 1934 (2,52). Goldblatt observó que la hipertensión experimental era causada por una o más sustancias humorales liberadas por el riñón. Posteriormente se buscó el agente responsable de la elevación de la presión en la hipertensión, descubriéndose así la renina descrita mucho tiempo antes por Tigersted y Bergman.

Alrededor de 1940, dos grupos independientes (Page y Helmer en E.U. (53) y Braun-Menéndez en Argentina (54)) demostraron que la renina por sí misma no era vasoconstrictora sino que era un componente inicial de la activación del SRA, esto es, la renina actuaba sobre una sustancia presente en el plasma (angiotensinógeno) para producir otra sustancia estable al calor, vasoconstrictora y de corta duración (angiotensina I, y a partir de esta, angiotensina II) (figura 1).

1.3. BIOQUIMICA Y FORMACION DE LA RENINA.

1.3.1.GEN.

Los genes de renina de humano, de rata y de ratón han sido clonados y secuenciados. Un solo locus de renina ha sido identificado en humanos y en ratas. En ciertos tipos de ratón que producen bajas cantidades de renina en la GSM tienen un solo locus, mientras que otros tipos que contienen una alta actividad de la renina de la GSM tienen una duplicación estructural del gen

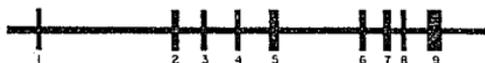
(Ren-1 y Ren-2). Los genes de renina de ratón han sido localizados en el cromosoma 1. La relevancia fisiológica de la duplicación del gen de ratón no se conoce. El gen de renina de humano tiene un tamaño aproximado de 12.5 kb. Como muchos genes en los eucariontes superiores, los exones de renina son interrumpidos por los intrones cuya función no se conoce. El gen de renina de humano contiene 10 exones y 9 intrones. Esto difiere de los genes de rata y ratón los cuales contienen solo 9 exones. El exón adicional en el gen humano llamado exón 5A, codifica solo 3 aminoácidos (aa) y su función no se conoce.

En base al conocimiento de la estructura del gen de renina de humano y de la información derivada del modelo computarizado de la renina de humano se pueden predecir 10 dominios estructurales de esta proteína globular. La renina y otras proteasas de aspartato tienen una homología significativa a nivel de la estructura del gen, y de la secuencia de aa. La comparación entre la renina de humano y la pepsina descrita por Hobart y col. (55) ilustra lo anterior. Existe una marcada similitud entre la estructura intrón/exón de los genes de estas dos proteínas relacionadas. La comparación de la estructura 1a. de estas dos proteasas de aspartato demuestra que tanto tamaño y secuencia de estos dominios están bien conservados. La estructura tridimensional de renina sugiere que esta es una proteína con dos lóbulos simétricos. Es interesante notar que los dominios en la primera mitad de la proteína pueden ser pareados con aquellos en la segunda mitad basados en su respectiva estructura secundaria y sus posiciones simétricas en relación al sitio de unión del

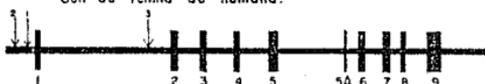
sustrato. Hobart y col. (55) arreglaron en pares los respectivos dominios basados en la posición del dominio dentro del modelo y la similitud de la estructura secundaria, así el dominio del exón 2 puede ser pareado con el del exón 6, el del exón 3 con el del exón 7, etc. Los 2 residuos de ácido Asp del sitio catalítico están dentro de los dominios de los exones 3 y 7. Este apareamiento de dominios y simetría se observa con otras proteasas de aspartato y conduce a la sugerencia de que la simetría resulta de la duplicación de un gen ancestral de 4 exones. Se ha propuesto que el exón que codifica al péptido señal se adicionó subsecuentemente como exón 1 cuando estas enzimas se convirtieron en zimógenos secretores.

Morris (56) ha sugerido que el gen de la renina humana tiene tres elementos potenciales promotores (secuencias TATA) donde la ARN polimerasa puede unirse produciendo cuatro formas de precursores de renina (figura 3). El promotor 1 es el usado predominantemente en el riñón humano y produce un precursor con un péptido hidrofóbico N-terminal (péptido señal) que dirige el producto recién sintetizado al interior del retículo endoplásmico para la secreción eventual de las células YG. Sin embargo, hay posibilidades totalmente diferentes las cuales pueden operar en mayor o menor grado en el riñón y tejidos extrarrenales, cuando se usan los otros promotores. El promotor 2, localizado 48 pares de bases antes del promotor 1 tiene un potencial para producir un precursor de renina con 27 residuos de aa adicionales (57,58). El promotor 3, localizado en el primer intrón, puede producir, un precursor de renina que carece de 48 residuos de aa

Gen de renina de ratón.



Gen de renina de humana.



Productos de la expresión del gen de renina.

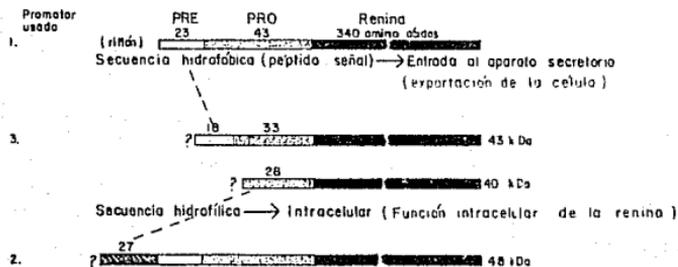


Figura 3
 Gen de renina humana y de ratón. II

(55) el cual se produce por la pérdida del péptido señal que consta de 23 residuos de aa y la mitad de la proregión N-terminal (59), o bien un precursor con un péptido señal con una secuencia principal hidrofóbica de 23 residuos de aa, los cuales pueden ser potencialmente removidos por segmentación de un par dibásico para producir el primero. El precursor largo (que resulta del promotor 2) y el precursor corto (que resulta del promotor 3) pueden tener cada uno una secuencia principal hidrofóbica N-terminal, y por lo tanto no pueden entrar en el compartimento secretorio de la célula y esta renina no puede secretarse de la célula y probablemente cumpla con funciones intracelulares.

Otro camino en el cual diferentes proteínas pueden surgir del mismo gen es por empalme diferencial. Se sabe que este mecanismo se presenta en varios genes (prolactina, calcitonina) y comprende mecanismos de procesamiento alternativos en el corte y empalme de la transcripción primaria de ARNm en el núcleo por medio de los cuales los intrones son removidos normalmente. Sin embargo, no hay evidencia para el empalme diferencial de la transcripción primaria de ARNm del gen de renina.

El gen de renina es expresado en varios tejidos, está presente en todas las células, pero solo algunas tienen los mecanismos auxiliares necesarios para transcribirlo.

En todas las especies la expresión del gen es muy alta en las células granulares YB del riñón (60).

1.3.2. ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS DE RENINA.

Como ya se mencionó la enzima renina es una proteasa de

aspartato, que al igual que otras enzimas de ésta familia (pepsina, quimosina, penicil pepsina y catepsina D), contiene dos residuos de Asp en el sitio activo que son esenciales para su función. Aunque la renina comparte características muy similares a las proteasas de aspartato desde el punto de vista estructural (activación del precursor en medio ácido, peso molecular (PM) de la forma activa y estructura primaria y terciaria) y funcionales ((inhibición con pepstatina, (61) e inactivación con el ester metálico de diazo acetil-norleucina en la presencia del ión cúprico y por 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)-propano (62,63)), la renina difiere de estas proteasas en varios aspectos: es activa a pH neutro, tiene grupos SH libres y es altamente selectiva para su sustrato (limitada estrictamente a un enlace peptídico del angiotensinógeno).

La renina ha sido purificada de varias especies (64). El punto isoeléctrico de la renina renal humana está entre 5.2 y 5.8 y su pH óptimo para la reacción con el sustrato homólogo es de 5.5-6.0.

Actualmente se conoce la secuencia de aa de la renina de la GSM de ratón, y de riñón de ratón, de rata y de humano.

La estructura primaria de la renina de la GSM de ratón (ratones macho Swiss-Webster) fué obtenida en 1982 por Misono e Inagami por los métodos clásicos de secuenciación de aa (65,66). En el mismo año, Panthier y col. (57) obtuvieron la secuencia de aa de la prepro-renina de la GSM de ratón a partir de la secuencia de bases del ADNc.

La prepro-renina de la GSM de ratón consta de 401 residuos

de aa (67), tiene un segmento pre de 18 residuos de aa y un segmento pro de 45 residuos de aa (segmento prepro de 63 residuos de aa) (figura 4). El PM calculado es de 42,209 Da (57). La renina procesada consta de una cadena ligera y una pesada. La cadena ligera tiene 48 residuos de aa y un PM de 5458 Da. La cadena pesada consta de 288 residuos de aa y tiene un PM de 31,036 Da. La molécula completa consta de 336 residuos de aa y tiene un PM de 36,494 Da (65,66). La homología con pepsina porcina es de 43% y los residuos de Asp en el sitio activo se encuentran en la cadena pesada (residuos 38 y 226). La homología de aa entre la renina y la pepsina alrededor de estos dos residuos es cercana al 90%. Aunque varios estudios bioquímicos e inmunológicos han mostrado que la renina de la GSM y la renina de riñón de ratón son muy parecidas, actualmente sabemos que las dos moléculas no son idénticas. Wilson y Taylor (68) han mostrado que la renina de la GSM es termolábil, mientras que la renina de riñón es termoestable. Inagami y col. (69) mostraron que, en contraste a la renina renal, la renina de la GSM no está glucosilada.

Holm y col. (70) aislaron el gen de renina renal de ratón, y obtuvieron la secuencia de bases del gen, del ARNm y la secuencia de aa. Al comparar 1427 nucleótidos de la secuencia de los ARNm de renina renal y de la GSM se encontró que había solo 45 sustituciones de bases que explican cambios en 21 aa, mientras que las otras 24 sustituciones no producen cambios.

La prepro-renina renal de ratón consta de 402 aa, sin embargo, no se ha definido experimentalmente la extensión del segmento pre y del segmento pro. Los dos residuos dibásicos;

Lis62-Arg63 y Arg352-Arg353 involucrados en la maduración de la renina de la GSM, se encuentran en la posición 62, 63, y 352, 353, respectivamente en la secuencia de la renina renal. La principal diferencia entre la renina de la GSM y la renina renal de ratón es la presencia de tres sitios potenciales de glucosilación en la enzima renal localizada en los residuos de aa 61, 139, y 319. Esta información sugiere que la renina renal activa es una proteína glucosilada constituida de 2 cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro.

La estructura primaria de la prepro-renina renal de rata fue obtenida por Burnham y col. en 1987 (71) a partir de la secuencia de bases de su ADNc. El ARNm consta de 1434 nucleótidos que codifican para 402 residuos de aa (PM 44,375 Da). Burnham y col. (71) demostraron que en la rata existe solo una copia del gen de renina. También demostraron que la renina de rata tiene una homología de 85% con la isoenzima de riñón de ratón (renina-1) y 81% con la isoenzima de renina de GSM de ratón (renina-2) y 66% con la renina humana.

El punto de ruptura del péptido señal no ha sido determinado, tampoco se conoce el extremo amino de la molécula, sin embargo, Burnham y col. (71) sugieren, por analogía con la ruptura en el ratón, que el extremo amino debe ser el residuo de serina número 65 (ruptura proteolítica después de los residuos de 63 y 64 de lisina). De esta manera, la renina renal procesada de rata constaría de 338 aa correspondientes a un PM de 36,905 Da (71). La renina renal de rata contiene 3 sitios potenciales de glucosilación (Asn-X-Tre/Ser): residuos 69, 139 y 320 (71). Los aa que son cruciales para la actividad de proteasas de aspartato

están conservados en la renina de rata: los residuos de Asp en las posiciones 102 y 287, así como la tirosina 147 y el triptofano 109 (71). Se piensa que la renina renal de rata consta, al igual que la renina renal humana, de solo una cadena ya que carece de la secuencia Arg354/Asp355 que es hidrolizado en la renina renal de ratón para producir la cadena ligera (71).

La estructura primaria de la prepro-renina renal humana se dedujo de la secuencia de bases de su ADNc. El ADNc se preparó del ARNm poliadenilado aislado de 26 g de riñón humano de un paciente con hipertensión renovascular severa (72). El precursor de renina renal humana consiste de 406 residuos de aa. La extensión del segmento pre es de 23 residuos de aa y la extensión del segmento pro es de 43 residuos de aa (segmento prepro de 66 residuos de aa) (figura 4). El PM del precursor calculado de esta composición de aa es de 45,067 Da. La renina renal procesada consta de 340 residuos de aa y tiene un PM de 37,235 Da. La ruptura proteolítica entre la glicina 23 y la leucina 24 produce la pro-renina; y la ruptura proteolítica entre la arginina 66 y la leucina 67 produce la renina activa de una cadena. La secuencia de los primeros 19 aa de la renina renal pura han confirmado la secuencia de aa deducida del ADNc y el sitio de ruptura del segmento pro para producir la renina madura (73,74). La homología de la prepro-renina renal humana y de la prepro-renina de la GSM de ratón es de 68% (75). La renina humana difiere de la renina de la GSM de ratón (Renina-2), pero no de la renina renal de ratón (Renina-1) y de rata, en que tiene dos sitios de glucosilación (Asn-X-Thr) en los residuos 71 a 73 y

141 y 143 del precursor. Los residuos de Asp del sitio activo están localizados en las posiciones 104 y 292 del precursor (residuos 38 y 226 de la renina madura).

Los modelos de procesamiento del precursor de renina de la GSM de ratón y de riñón humano mencionados anteriormente han recibido apoyo experimental. La traducción del ARNm de renina en los polisomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico produce prepro-renina (47,76). La remoción cotraduccional del péptido señal y la glucosilación subsecuente ocurre durante la transferencia de la prepro-renina en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso. Galen y col. (48) han confirmado en tumor de células YB de humano que la renina es sintetizada como un precursor inactivo de 55 kDa que es convertido a renina activa de 44 kDa. Estos PM son mayores que los obtenidos de la secuencia de aa del ADNc, lo que puede ser explicado por la naturaleza glucoproteica de la renina renal. La secuencia de aa de la pro-renina radiactiva de riñón humana de este precursor muestra que esta molécula se genera por la ruptura entre la glicina 23 y la leucina 24, lo que produce la ruptura de la región pre (77-79).

La pro-renina puede seguir una de las dos siguientes vías: 1) Secretarse por vía constitutiva directamente del Golgi o del protogranulo; 2) empaquetarse en gránulos inmaduros donde es procesada adicionalmente a la renina madura y activa de 41 kDa, que es un polipéptido glucosilado de una cadena. Este proceso ocurre durante la condensación y maduración de los gránulos secretorios.

En el riñón humano la conversión de pro-renina a renina madura es un proceso relativamente lento. Sin embargo, en el

riñón isquémico, la velocidad de conversión de pro-renina a renina activa es muy alta (79). La renina activa es liberada de los gránulos secretores maduros de una manera regulada.

También se ha estudiado la biosíntesis y procesamiento de la prepro-renina de la GSM y de riñón de ratón (78,80,81). Catanzaro y col. (80) y Pratt y col. (47) estudiaron la biosíntesis de renina en la GSM. La renina se marcó con Met-35S y el curso temporal del experimento mostró que la secuencia del procesamiento fué: prepro-renina (45 kDa) ----> pro-renina (43 kDa) ----> renina de una cadena (36.5 kDa) ----> renina de dos cadenas (36.5 kDa). La prepro-renina normalmente es hidrolizada cotraduccionalmente en minutos a pro-renina en el lumen del retículo endoplásmico rugoso. En el Golgi de las células de la GSM de ratón, la pro-renina se convierte rápidamente (15 min.) en un polipéptido de una sola cadena, que es enzimáticamente activo y parece que se secreta del Golgi o de los proto-gránulos por una vía constitutiva. La renina de una cadena puede convertirse en una enzima madura de dos cadenas unidas por un puente disulfuro durante la condensación y maduración de los gránulos secretores (12 horas). La renina activa de una y de dos cadenas es secretada por exocitosis de estos gránulos secretores (82,83).

En resumen, el producto primario de la traducción de ARNm (prepro-renina) es hidrolizado para producir el zimógeno pro-renina, el cual es entonces empaquetado en gránulos de almacenamiento donde pasa por una maduración postraduccional incluyendo la activación de pro-renina a renina por división proteolítica y glucosilación.

En el riñón de ratón, el procesamiento biosintético se lleva a cabo de una manera similar, sin embargo, hay varias diferencias. El procesamiento de la renina renal de ratón a renina madura parece que ocurre a una velocidad menor, en consecuencia, la pro-renina puede ser detectada en el riñón y secretarse por la vía constitutiva junto con la renina de una cadena. Al igual que en la GSM, la renina madura es de dos cadenas, la cual es almacenada en gránulos secretores y liberada por una vía regulada. Otra diferencia entre el procesamiento de la renina renal de ratón y la renina de la GSM es la glucosilación de la renina renal de ratón, pero no de la renina de la GSM. La glucosilación no parece producir un gran cambio en el procesamiento intracelular o en la secreción, los carbohidratos parecen contribuir al metabolismo extracelular de la renina en vez que al tráfico intracelular y a la secreción. Yamamoto y col. (84,85) han mostrado que la renina no glucosilada tiene una vida media alta en la circulación y es principalmente metabolizada en el riñón, mientras que la renina glucosilada tiene una vida media mucho más corta y es metabolizada en el hígado. El procesamiento de la renina renal de rata y de perro no se ha estudiado en detalles. En el ratón el procesamiento intracelular es muy rápido y la renina es secretada principalmente en forma activa y madura, en el humano el procesamiento es mucho menor y la renina y la pro-renina son secretadas.

Para mayor información se estudió el procesamiento de la prepro-renina de la GSM de ratón y de riñón humano en dos líneas celulares de fibroblastos (CHO y L929) y una línea celular

endócrina de ratón (AtT-20) que fueron transfectadas con vectores conteniendo el gen de renina humana o de ratón (86,87). Las células L929 y CHO transfectadas secretan casi exclusivamente pro-renina de ratón o humana. Las células AtT-20 exhibieron un patrón diferente de secreción de renina. La pro-renina de ratón se procesó a una velocidad considerablemente menor en las células AtT-20 que en el riñón de ratón o en la GSM. Además, no hubo evidencia para el procesamiento a la forma de dos cadenas en la célula AtT-20, por lo tanto, la velocidad del procesamiento de la prepro-renina es dependiente parcialmente de factores específicos de la célula o de los tejidos. Sin embargo, aunque la renina de ratón se procesó más lento en la célula AtT-20 que en el riñón o en la GSM, ésta se procesó más aprisa que la renina humana en la célula AtT-20. Por lo tanto, la velocidad de procesamiento de la renina es también independiente de las diferencias estructurales codificadas genéticamente.

La secreción de pro-renina, a diferencia de la secreción de renina, no es influenciada por estímulos agudos. Sin embargo, los estímulos crónicos, que aumentan los niveles de ARNm de renina (aumento de la transcripción del gen), aumentan también la secreción constitutiva de pro-renina.

Se ha observado que la mayor parte (90%) de la renina circulante se encuentra en estado inactivo y tiene un PM superior a la renina madura o activa (88). Existen también en varios tejidos, una o varias formas de renina de mayor PM (presumiblemente su precursor biosintético) (89,90). El plasma humano y extractos de riñón contienen una forma de 46-51 kDa que

es consistente con el tamaño de la pro-renina, pero también contienen cantidades iguales de una forma de 52-62 kDa mucho más grande y con una actividad parcial (56). Estas formas de renina inactiva llegan a constituir en plasma un porcentaje mayor que la renina activa por algunos de los siguientes procedimientos: acidificación, acción de la tripsina o exposición prolongada a temperaturas comprendidas entre 0 y 5 grados C (91-93).

Se piensa que la kalikreina plasmática es el activador fisiológico más probable de la pro-renina (88,91). La inspección de sitio de activación de la secuencia de pro-renina explica por que diferentes proteasas pueden activar a la renina inactiva (56). Se ha sugerido que la conversión de pro-renina a renina activa puede ser un paso regulado que influye en la determinación del nivel de renina circulante. Se ha propuesto que la pro-renina puede convertirse en renina en los tejidos periféricos (p.e. en los vasos sanguíneos). Entre las enzimas que se han propuesto como activador de la renina están: activador de plasminógeno tisular (94), catepsina G y elastasa de los neutrófilos (95).

1.3.3. SECRECIÓN.

La renina, al igual que otras proteínas de secreción, ha sido identificada en retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, gránulos secretores y membrana plasmática.

Alrededor del 20% del total de renina se ha localizado en el complejo de Golgi y en el espacio citoplásmico, el 60% está en los gránulos (32), el 5% en el retículo endoplásmico rugoso y el 15% en la membrana plasmática (32,33).

El retículo endoplásmico rugoso se encuentra frecuentemente como pequeños sacos que están dispersos a través del citoplasma (53). Sin embargo, durante la depleción de NaCl, cuando la secreción de renina está aumentada, el retículo endoplásmico rugoso está generalmente más dilatado y sus cisternas contienen material más denso a los electrones (renina) que los animales normales (45,53)

En otros sistemas secretores el incremento de la síntesis y secreción de estas proteínas, al igual que con la renina, se hace evidente por la expansión del retículo endoplásmico rugoso. Estas proteínas pasan al aparato de Golgi en donde se termina el proceso de glucosilación iniciado en el retículo endoplásmico y se realizan modificaciones adicionales (96,97) para empaquetar a las proteínas hacia su propio destino (figura 5). En el Golgi toman lugar dos procesos separados de vesiculación. Un proceso envuelve la formación de vesículas o gránulos totalmente translúcidos. Se piensa que estos gránulos secretan su contenido por exocitosis en una manera constitutiva, no regulada (figura 5) con una vida media entre síntesis y liberación de 10 minutos (97) (figura 5). El segundo proceso de vesiculación involucra la formación de gránulos más maduros que funcionan como almacén a partir de donde se libera a las proteínas bajo estímulos apropiados (secreción regulada) el cual en la mayoría de las células es el calcio. La secreción constitutiva es rápida y continua. Las proteínas liberadas no se concentran apreciablemente ni permanecen en la célula por más de un minuto, por el contrario, la secreción regulada es disparada

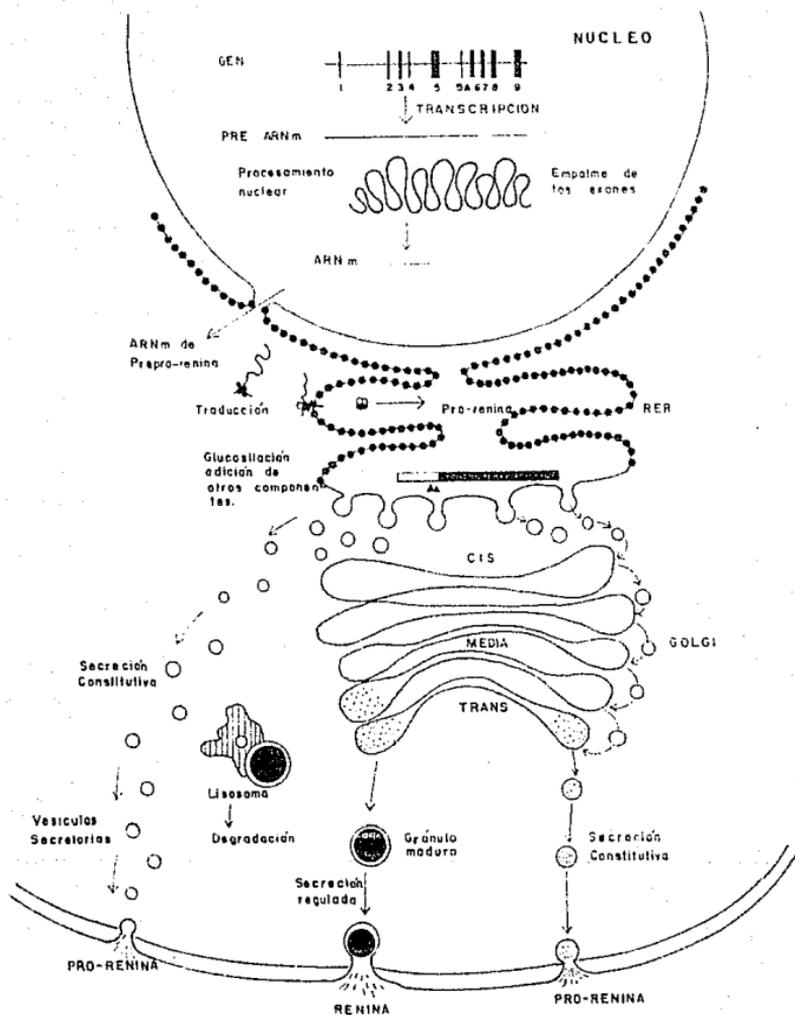


Figura 5

Esquema de la biosíntesis y secreción de la renina renal humana.

episódicamente por señales específicas. Las proteínas son almacenadas en forma altamente concentrada (hasta 200 veces más altas que en el retículo endoplásmico) lo que produce vesículas de apariencia opaca al microscopio electrónico. Las proteínas de secreción son enviadas a las vesículas constitutivas o reguladas en la porción trans del Golgi. Se ha mostrado la participación de receptores en este proceso con el uso de cloraquina, que, al evitar el reciclaje de estos receptores hace que las proteínas que son secretadas regulatoriamente, se secreten de manera constitutiva. Chung y col. (98) han identificado recientemente a unas proteínas de 25 kDa del Golgi, presumiblemente los receptores arriba citados.

Roullier y Drci (26) han concluido, basados en una revisión de literatura, que por lo menos existen tres modelos de secreción para la renina: exocitosis granular, solubilización intracitoplásmica y un tipo lisosomal (fusión gránulo-gránulo).

1.3.3.1. EXOCITOSIS.

Se han postulado cuatro distintos eventos en la cascada de exocitosis de los contenidos de los gránulos secretorios (99-101). El primer evento es el aumento inmediato del Ca^{2+} citosólico después de la estimulación. Esto se ha demostrado en una gran variedad de células secretoras (101-105). De igual forma, en células artificialmente permeabilizadas para facilitar el acceso del Ca^{2+} al citosol, existe una relación directa entre la concentración de Ca^{2+} y la secreción exocitótica granular (103-104). El segundo evento es la fusión de los gránulos con la

membrana plasmática. Se ha postulado al Ca^{2+} como el catión divalente requerido para facilitar el proceso de fusión (106,107) en vista de que hay una relación directa entre la tasa de fusión y la concentración de Ca^{2+} (108). No está claro como el Ca^{2+} promueve la fusión, pero se ha sugerido que este se une a la superficie granular y a la cara interior de la membrana plasmática, con lo cual se reduce la barrera de energía y se facilita la fusión (100-107). El Ca^{2+} también puede provocar la unión de un gránulo a otros gránulos, aunque se ha demostrado que la concentración de hidrogeniones también puede disparar la fusión de los gránulos entre sí (109-111). El tercer evento en la cascada excitotónica es el hinchamiento de los gránulos inmediatamente después de la fusión. Un solo contacto, sin embargo, es insuficiente para el hinchamiento, y fusión (107,112-114). Debe existir un gradiente osmótico entre el citosol y el espacio intracelular antes de que ocurra la fusión. Entonces el citosol hiperosmótico acarrea agua dentro de la célula y subsecuentemente dentro del gránulo, lo cual produce el hinchamiento (112,115,116). No se conoce el mecanismo exacto responsable para la inducción del hinchamiento del gránulo que es un prerequisite para la exocitosis (114-118). Se han identificado áreas floculentas en el núcleo del gránulo y se supone que estas áreas claras son bolsas de agua incorporadas en el gránulo como resultado del hinchamiento osmótico (119). El Ca^{2+} induce el hinchamiento granular (114-120) pero no se sabe cual es el mecanismo por el que el Ca^{2+} media esta respuesta. El hinchamiento ocurre antes de la fusión (112). Esta demostración

conduce a la conclusión de que alguna señal intracelular -muy probablemente el Ca^{2+} - puede causar el hinchamiento de la membrana granular. El cuarto evento de la cascada de la exocitosis es la fisión o descarga de los contenidos granulares dentro del espacio extracelular. Evidencias morfológicas apoyan esta observación (46,97). Los dos últimos eventos de la cascada excitósica se han confirmado para la secreción de renina. El hinchamiento y la fisión han sido observados (18,26,37) lo cual representa una demostración clara de los eventos finales de la exocitosis en la cascada secretoria de las células YB. Sin embargo, el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} inhibe la secreción de renina, en vez de estimularla como sucede en la mayoría de los sistemas. Esta "paradoja" será discutida más adelante.

La fusión gránulo-gránulo no ha sido observada frecuentemente en células YB, especialmente durante la estimulación para la secreción de renina. Barajas (30) fue el primero en dar una clara evidencia para este proceso de fusión. El observó la fusión gránulo-gránulo durante la constricción de la arteria renal, y estas observaciones han sido confirmadas por Roullier y Orci (26). La fusión gránulo-gránulo ha sido también demostrada en la depleción de NaCl (17,50,51,53,121,122), el síndrome de Bartter's (123) y en la diabetes (26). Aun en células YB en cultivo la fusión gránulo-gránulo es muy pronunciada y estas células demuestran un actividad secretoria de renina muy alta (124). El mecanismo responsable de la fusión gránulo-gránulo es desconocido, pero estos eventos de fusión pueden ser aumentados con Mg^{2+} (109,111) o con iones H^+ (125). Altas

concentraciones de Mg^{2+} o iones H^+ han mostrado que estimulan la secreción de renina.

1.3.3.2. SOLUBILIZACION CITOPLASMICA.

Este modo de secreción de renina, primero sugerido por Lee y col. (126) ha recibido mucho apoyo experimental, Lee y col. mostraron que el contenido granular puede disminuir por una depleción de volumen sanguíneo (126). Durante horas después de la depleción de volumen, los gránulos grandes pierden el material denso de su periferia y al mismo tiempo la membrana del gránulo se alarga y algunas veces se disgrega, los gránulos se unen y liberan su contenido en el espacio citoplásmico. Estudios en el microscopio electrónico en otros sistemas muestran que cuando los gránulos pierden su material denso, han liberado su contenido y se han disuelto (120). Zavagli y col (123), han observado que en la fusión de los gránulos, estos pierden su membrana limitante y su contenido sale al espacio citoplásmico. Roullier y Orci (26) apoyan esta evidencia sugiriendo que un incremento en la permeabilidad de la membrana a la renina, debido a un aumento del hinchamiento, hace posible que el gránulo libere su producto de secreción en el espacio citoplásmico. Zavagli y col (123) han mostrado que los gránulos se disuelven en el citoplasma. Esta observación ha sido apoyada por Thurau y Levine (127) y por Baumbach y Leyssac (128). Se ha mostrado actividad de renina en el espacio soluble citosólico (32,50,129), y también se ha demostrado la unión de una proteína a la renina (130-134). El

hecho de que esta unión haya sido demostrada exclusivamente en el espacio citosólico soluble y la observación adicional de que la concentración del complejo (renina-proteína) sea mayor que la de la renina sugiere que el modo de solubilización puede ser de importancia en los caminos de la secreción de renina (134). El hecho de que la concentración del complejo es más grande que la de renina sugiere que una gran cantidad de ésta escapa de los gránulos, cuando están sujetos a cambios osmóticos (135-138). El destino final de la renina en espacio citosólico tiene varias posibilidades: una es que la renina o el complejo regresa a los gránulos o a los lisosomas. La captación de la renina por los gránulos de secreción puede explicar la naturaleza lisosomal de los gránulos de renina (37). Otra posibilidad es que la renina o el complejo toman el camino a la membrana plasmática donde es descargada de la célula (34,35,50).

Una cantidad sustancial de renina en las células granulares YG está localizada en la membrana plasmática. De este modo parece que la membrana plasmática juega un papel en el control celular de la secreción renina. Sin embargo, no está claro si la membrana plasmática actúa como un depósito de almacenamiento o como un sitio para exportar renina de la célula.

1.3.3.3. SECRECIÓN LISOSOMAL.

Fisher (41) sugirió, que los gránulos de renina eran lisosomas por que éstos contienen fosfatasa ácida, una enzima lisosomal. Taugner y col. (37) han demostrado convincentemente ciertos aspectos comunes entre los gránulos de renina y los

lisosomas (37). A pesar de que los lisosomas nunca han mostrado actividad exocitótica, las enzimas lisosomales (por ejemplo catepsina D) (139) son transportadas fuera de las células. No se sabe mucho acerca de los mecanismos celulares que liberan las enzimas lisosomales, pero la presencia de una proteína de enlace (receptor) en el Golgi, en el prelisosoma (vacuola?), en la membrana plasmática, y presumiblemente en el espacio soluble citoplásmico (43) sugieren un mecanismo que involucra una exportación directa de la célula. Sin embargo, uno de los aspectos importantes descritos para la secreción de enzimas lisosomales no puede aplicarse a la secreción de renina. Por ejemplo, el flujo de Ca por el ionóforo A23187 estimula la secreción lisosomal (140,141) pero inhibe la secreción de renina (128,142).

2. TRANSDUCCION HORMONAL

La presencia de receptores hormonales específicos en la membrana plasmática de las células, es indispensable para que las hormonas que no penetran a la célula, actúen. La interacción hormona-receptor es el primer paso en la acción de la hormona. Dicha interacción ocurre en el exterior de la célula y los efectos tienen lugar en el interior.

Ya que la hormona no penetra a la célula, es necesario que se genere una señal en el interior de ésta (segundo mensajero). Transducción es el proceso que se lleva a cabo desde el momento de la activación del receptor hasta la formación del segundo

mensajero. Existen varios sistemas de traducción hormonal, a continuación se describen los sistemas mejor caracterizados.

2.1. EL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.

En los años 60's el grupo del doctor Sutherland llegó a la conclusión de que bajo la acción de la adrenalina o del glucagón, se formaba un compuesto en el interior de las células hepáticas que era el responsable de los efectos producidos por las hormonas anteriormente mencionadas.

Poco tiempo después el grupo lo identificó como el AMP cíclico (AMPC) y lo nombró segundo mensajero (ya que el primer mensajero es la hormona). En las células bajo la acción de algunas hormonas se incrementan los niveles de AMPC y este compuesto induce una serie de reacciones en cadena hasta que se produce el efecto. Se ha observado que algunas hormonas producen un efecto opuesto, es decir, disminuyen los niveles de este segundo mensajero. Por lo tanto, las hormonas actúan como moduladores, esto es, aumentan o disminuyen los niveles de AMPC en el interior de la célula blanco. Al estudiar a la enzima que genera al AMPC (adenilato ciclasa) se observó que esta al igual que el receptor hormonal es una proteína integral de la membrana plasmática. Se pensó entonces que cada receptor tenía una enzima adenilato ciclasa asociada, pero muchos experimentos mostraron que la activación simultánea de varios tipos de receptores que estimulan a la enzima no resultaba en una acumulación aditiva del segundo mensajero. Esto sugería que los receptores capaces de

activar a la adenilato ciclasa comparten una poza comun de enzima, con la cual interactúan al desplazarse en la membrana plasmática. Rodbell (143) sugirió que no solo se requiere al receptor y a la adenilato ciclasa para que se produzca la activación de dicha enzima, sino que participaba un tercer elemento igualmente localizado en la membrana: una proteína la cual acopla al receptor con la adenilato ciclasa. Esta proteína acopladora ha recibido el nombre de proteína "G" o "N", por requerir para su funcionamiento nucleótidos de guanina (144-150). Así como hay hormonas que activan y otras que inhiben a la ciclasa, se ha demostrado que hay dos tipos de proteínas G, unas que actúan sobre la enzima en forma activatoria, llamadas Gs y otras que lo hacen en forma inhibitoria, llamadas Gi (figura 6). Su funcionamiento comienza al acoplarse un agonista a su receptor, este último sufre una modificación conformacional, de modo que ahora ya es capaz de interactuar con su respectiva proteína G, si se trata de un agente que activa a la adenilato ciclasa su receptor interactuará con Gs, mientras que si se trata de uno que inhibe a la ciclasa, su receptor lo hará con Gi. De este modo, existe un reconocimiento selectivo en la membrana plasmática, unos receptores actúan sobre Gs y otros sobre Gi. La interacción del receptor activado con la proteína G respectiva hace que esta pase a la forma activada y a su vez modifique, mediante activación o inhibición, de la enzima adenilato ciclasa.

Resumiendo: el agonista hace que el receptor se active, éste una vez activado, hace que la proteína G también se active, y son precisamente estas proteínas quienes, regulan la actividad de la adenilato ciclasa, ya sea activándola o inhibiéndola, según se

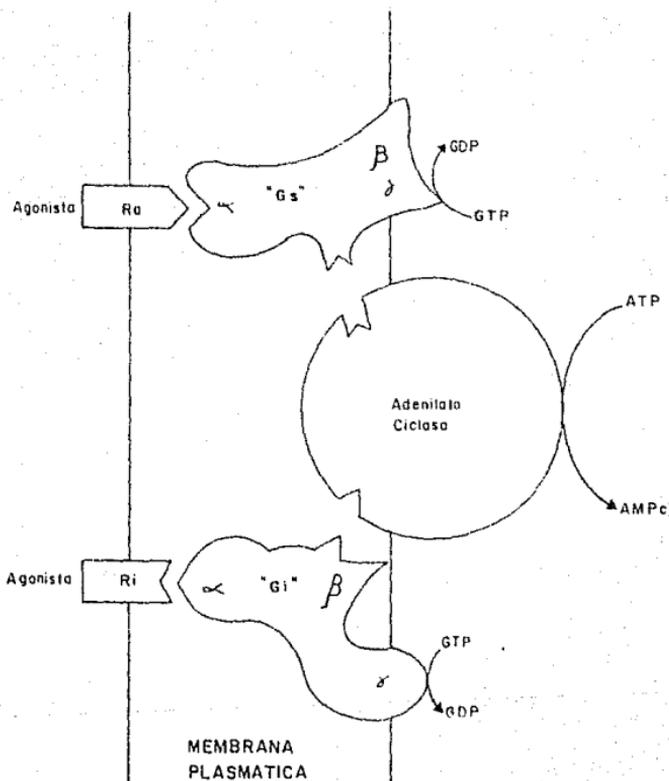


Figura 6.
Modelo de la adenilato-ciclaso.

Ra = Receptor activador.
Ri = Receptor inhibidor.

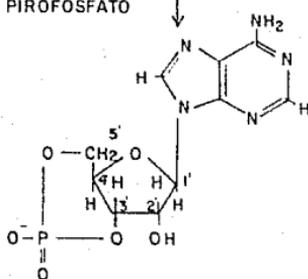
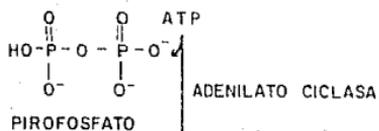
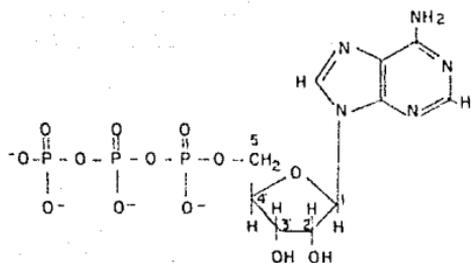
Gs = Proteína activadora.
Gi = Proteína inhibidora.

trate de Gs o Gi respectivamente. La separación del agonista de su receptor hace que gran parte del proceso se revierta y el efecto cese. El mismo segundo mensajero, el AMPc, se transforma a 5'-AMP (no cíclico) por una enzima llamada fosfodiesterasa, y de este modo se susperde la señal intracelular (figura 7).

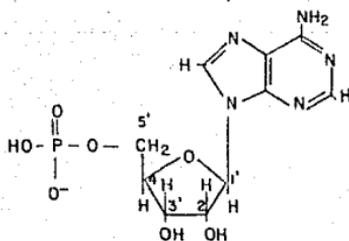
Las proteínas G han sido muy estudiadas en los últimos años. Algunas toxinas bacterianas han constituido una herramienta de gran utilidad para su estudio. El cólera causado por la bacteria Vibrio cholerae cuya toxina viaja por la luz del intestino grueso se fija a las células de la mucosa, lentamente atraviesa la membrana plasmática y una vez adentro de la célula, con la utilización del NAD intracelular, le agrega una parte de esta molécula (la fracción ADP-ribosa) a la proteína Gs, así la proteína queda permanentemente activa, estimulando a la adenilato ciclasa de las células intestinales. El aumento sostenido en el AMPc bloquea el funcionamiento normal de las células de la mucosa, impidiendo que absorban los líquidos intestinales, dando como resultado la diarrea (figura 8).

La Escherichia coli produce una toxina que actúa en forma similar a la del cólera. Bajo condiciones experimentales (adición de las toxinas a organismos íntegros o a células en cultivo) las células desquician su funcionamiento al acumular grandes cantidades de AMPc. Estos experimentos han ayudado a establecer el papel acoplador de la proteína Gs y a su identificación en la membrana.

Las proteínas Gs y Gi están formadas por tres componentes o subunidades: alfa, beta y gama. Las toxinas bacterianas atacan a



3' 5' AMP CICLICO



5' AMP

Figura 7

Esquema de la síntesis y degradación de AMP c

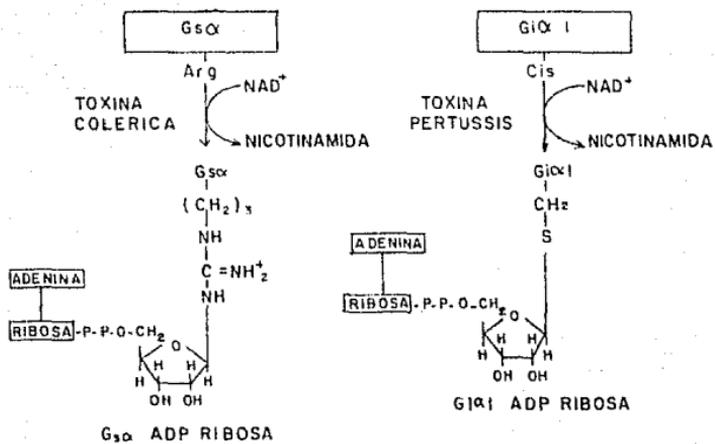


Figura 8
Esquema de ADP Ribosilación.

la subunidad alfa (figura 6 y 8).

La toxina pertussis actúa en forma similar a la toxina del cólera y a la de E. coli. Esta toxina al igual que la del cólera, se fija a las células, penetra, y utilizando el NAD produce la ADP-ribosilación de una proteína G, sólo que en este caso el blanco de la toxina es la subunidad alfa de Gi. La ADP-ribosilación de Gi conduce al bloqueo de su acción, bloquea toda inhibición de la adenilato ciclasa, y aumenta los niveles de AMP cíclico (figura 8).

2.2. SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.

En su porción lipídica la membrana plasmática está formada básicamente por fosfolípidos. Uno de estos es el fosfatidil inositol (PI) el cual puede ser fosforilado a fosfatidil inositol monofosfato (PIP) y a fosfatidil inositol bifosfato (PIP2). Existe una relación estrecha entre el recambio (síntesis y degradación) de PI y las variaciones en la concentración intracelular de calcio libre. El receptor activa a la proteína transductora Gx, esta a su vez activa a una fosfolipasa C (PL-C) que hidroliza al fosfatidil inositol bifosfato PIP2 de la membrana, para convertirlo en diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP3).

El IP3 activa la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico. El Ca²⁺, el IP3 y los diacilglicéridos actúan en forma conjunta (Figura 9 y 10).

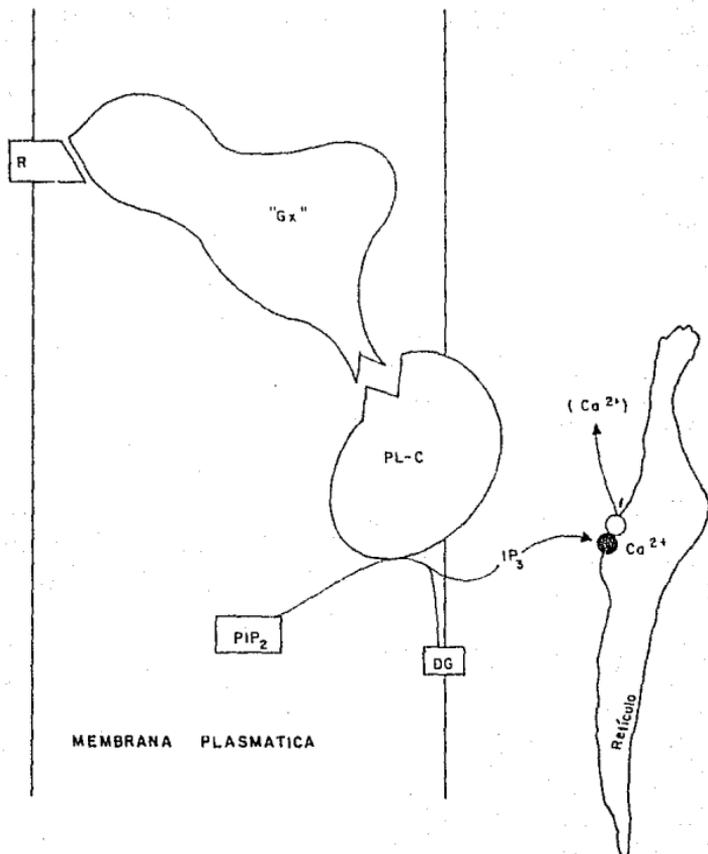


Figura 9

Esquema de la transducción por el sistema calcio fosfolinosítidos.

R = Receptor

Nx = Proteína transductora

PL-C = Fosfolipasa C

PIP₂ = Fosfatidilinositol bifosfato.

DG = Diacilgliceridos.

IP₃ = Inositol trifosfato.

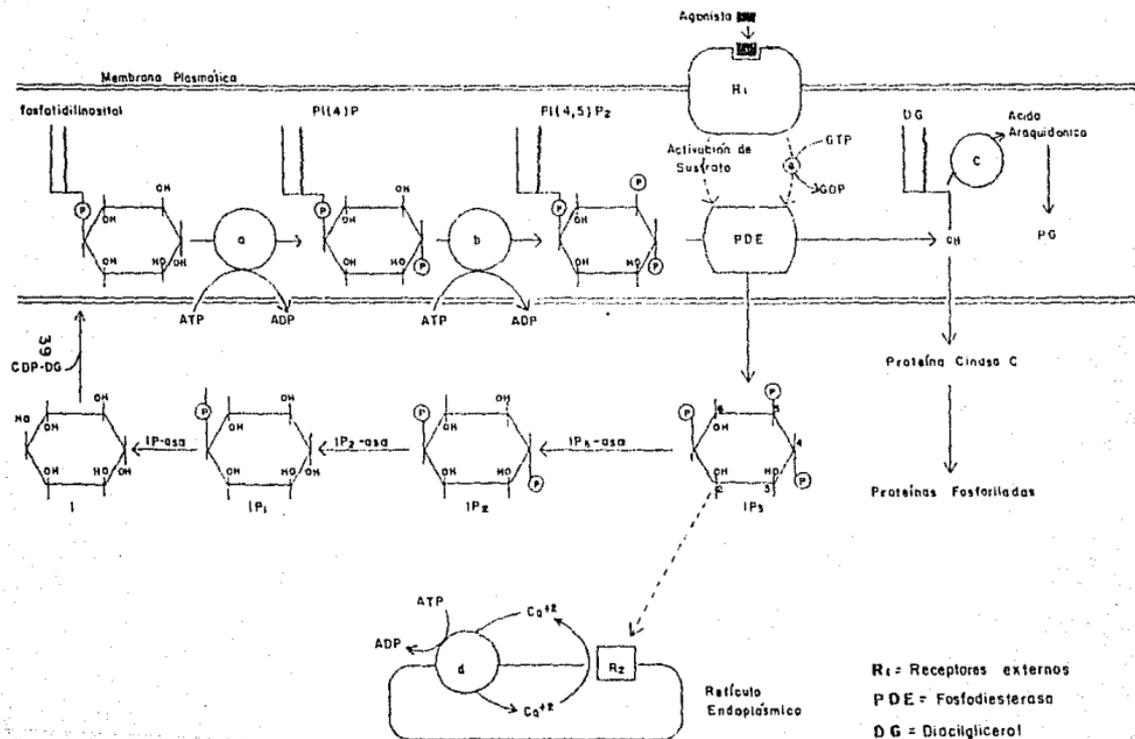


Figura 10

Esquema del papel del inositol trifosfato como un segundo mensajero intracelular.

2.3. PROPAGACION INTRACELULAR.

El primer paso para que se lleve a cabo la acción de una hormona es el acoplamiento con su receptor de membrana, posteriormente sigue la activación del receptor para que a su vez, interaccione con un sistema transductor que genera la señal intracelular o segundo mensajero. Este no actúa directamente, sino que es reconocido por un sistema receptor intracelular formado por proteínas que tienen una extraordinaria afinidad y especificidad y participan en la propagación de la señal, que se lleva a cabo en forma de "amplificación en cascada". Un ejemplo de esto es el mecanismo de acción del glucagón. El AMPc generado es reconocido por su receptor en el citoplasma: la proteína cinasa A que tiene dos tipos de subunidades "R" (reguladoras) y "C" (catalíticas). Las subunidades "R" mantienen inhibida a la enzima. Cuando los niveles de AMPc aumentan, éste se une a las subunidades "R" e induce la separación de las subunidades "R" y "C" quedando libres la subunidad "C" de la proteína cinasa A que se encarga de fosforilar a algunas de las proteínas del citoplasma celular, lo que modifica su actividad. Algunas de estas proteínas son cinasas de proteína, que al activarse van a fosforilar a otras proteínas, las cuales modifican su actividad. Así sigue desencadenándose la cascada de fosforilaciones y por lo tanto amplificándose la señal en la célula. La activación de las proteínas cinasas provoca la fosforilación de una serie de proteínas, no todas las proteínas de la célula, solamente aquellas que son sustrato de la cinasa (figura 11).

El sistema se activa y desactiva con facilidad, tiene la

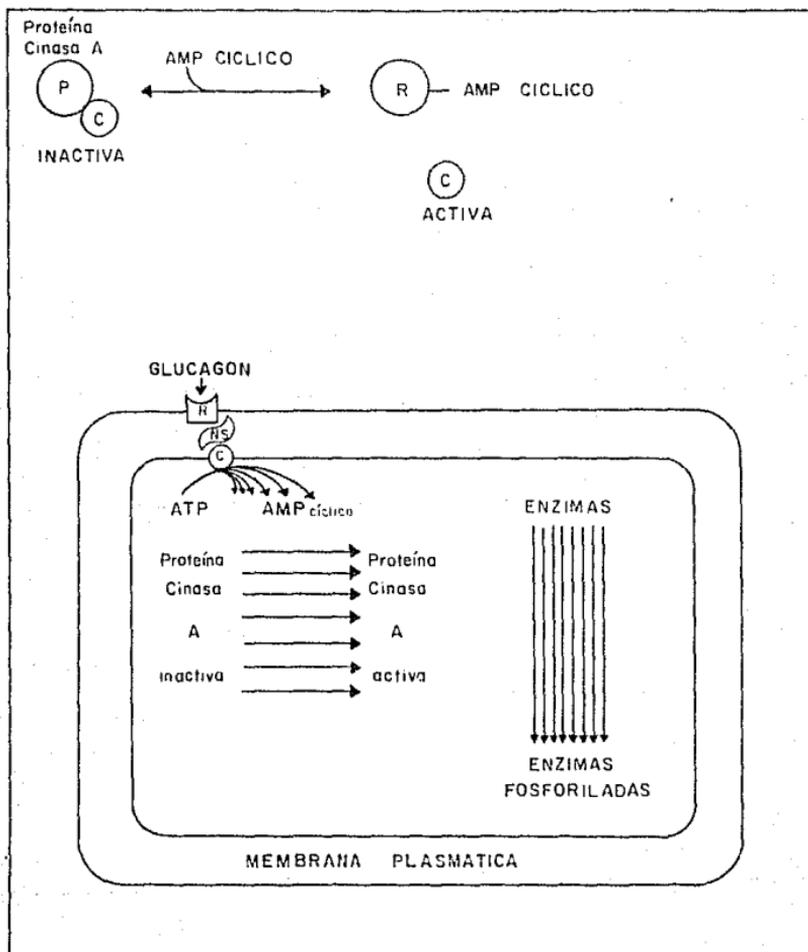


Figura II.
Esquema de disociación de las subunidades de la proteína cinasa y "cascada" de activación.

R = subunidad reguladora. C = subunidad catalítica.

característica de tener una acción muy rápida, pero también se desactivan muy rápidamente.

Las enzimas que habían sido fosforiladas, son desfosforiladas, mediante la participación de fosfatasa, regresando así a su actividad basal.

Otra propagación de la señal intracelular por medio de otro mecanismo es: el de calcio-inositol trifosfato. En este sistema el receptor activado por la hormona estimula a una fosfolipasa C a través de una proteína G α . Esta fosfolipasa rompe al fosfatidil inositol bifosfato en dos productos: el IP3 y el diacilglicerol. El IP3 actúa sobre el retículo endoplásmico provocando la liberación de calcio, este ejerce su acción como segundo mensajero activando una serie de proteínas cinasas y a otras enzimas. Posteriormente la cascada de amplificación de la señal se lleva a cabo por medio de la fosforilación de enzimas.

Por otro lado, el diacilglicerol, activa en forma conjunta con el calcio a otra enzima: la proteína cinasa C que colabora en el proceso de propagación y amplificación de la señal hormonal, junto con las cinasas dependientes de calcio.

3. REGULACION INTRACELULAR DE LA SECRECION DE RENINA.

La actividad del SRA es regulada principalmente por la velocidad de liberación de renina por el riñón (1,2,150-162). Como ya se mencionó, las células YG son el sitio de síntesis, almacenamiento y liberación de renina renal (17,19,163-166).

Se han descrito cuatro mecanismos fisiológicos de regulación de la liberación de renina del riñón (21,167-189):

1. El baroreceptor intrarrenal: la secreción de renina es inversamente proporcional a la presión sanguínea.

2. La mácula densa: la secreción de renina es inversamente proporcional a la cantidad de sodio y/o cloro que pasa por el segmento de la mácula densa del túbulo distal.

3. El sistema nervioso simpático: la secreción de renina es directamente proporcional a la actividad del sistema nervioso simpático.

4. Agentes humorales y hormonales tales como las catecolaminas, la AII, la vasopresina, el péptido atrial natriurético, la adenosina, el calcio y el potasio.

Sin embargo hay varias razones por las cuales a pesar del vigoroso esfuerzo que se ha hecho, no se han podido elucidar los mecanismos intracelulares involucrados en la secreción de renina:

a) Las células que sintetizan renina representan solamente el 0.01% del total de células renales (56,190).

b) Hay una gran cantidad y variedad de factores humorales y hormonales que afectan la secreción de renina (21,167-170,173-175,182) lo cual dificulta enormemente cualquier estudio.

c) El mecanismo de secreción de renina varía en las diferentes especies de animales en donde se ha estudiado.

d) La mayoría de los estudios se han hecho en sistemas complejos (animal completo, riñón aislado y perfundido, fragmentos de corteza renal, glomérulos aislados con arteriola aferente, suspensión de células renales) en donde las células productoras de renina tienen la influencia de factores hemodinámicos y/o forman parte de una red celular compleja, por lo que es difícil atribuir el efecto observado directamente sobre las células YG.

Por otra parte, no había sido posible preparar una suspensión de células renales altamente enriquecida en células YG y cultivarlas a corto plazo sino hasta 1984 cuando Kurtz y col. (191-193) prepararon inicialmente una suspensión de células renales de rata con un 50% de células YG y en 1986 (124-194-196) lograron enriquecer su preparación hasta en un 90%, sin embargo, las células YG no proliferaron y solo ha sido posible mantenerlas en cultivo a corto plazo (193). Por otra parte, se ha logrado la proliferación de las células YG humanas transformadas por el virus de simio 40 (SV40) que secretan principalmente pro-renina (197-199). Esto ha permitido el establecimiento de líneas celulares que mantienen su estado diferenciado y que son útiles para estudiar la regulación intracelular de la secreción de renina. Los estudios realizados con las preparaciones anteriores han permitido asegurar que las hormonas y drogas usadas, modifican la secreción de renina por un efecto directo. Otra ventaja adicional de las células YG puras, es que se han podido medir los niveles de los mensajeros intracelulares involucrados

en la secreción de renina en respuesta a las hormonas y agentes que la modifican (21,56,124,183-196,198,199).

Por otra parte, el proceso de secreción de renina tiene otras particularidades: a) la secreción de renina no solo responde a señales químicas sino también a señales físicas como la presión arterial y b) la característica más desconcertante de la secreción de renina es lo que se conoce como la "paradoja del calcio": en contraste a casi cualquier otro proceso endócrino, exocrino o neurosecretor, un incremento en el calcio intracelular tiene una función inhibitoria sobre la secreción de renina, en vez de ser un prerequisite para su secreción.

La membrana de las células VG es el sitio que recibe las señales hormonales, humorales o físicas y a su vez las transduce al interior de la célula generando mensajeros intracelulares, los cuales modifican la secreción de renina. Estos eventos de membrana (los receptores y sus mecanismos de acoplamiento y transducción para la generación de los mensajeros intracelulares) están mejor caracterizados que los mecanismos por medio de los cuales los mensajeros intracelulares estimulan o inhiben la secreción de renina.

Los mensajeros intracelulares que modifican la secreción de renina son el calcio y el AMPc (200-203). El aumento en el calcio intracelular inhibe, mientras que el aumento en AMPc estimula la secreción de renina (21,174,200-203). Además el GMPc también ha sido considerado como un mensajero inhibitorio de la secreción de renina (124,194,195,202).

3.1. EL PAPEL DEL CALCIO EN LA SECRECIÓN DE RENINA.

Las células YG están bañadas con el fluido extracelular cuya concentración de calcio ionizado es aproximadamente 1 mM. Las células YG están eléctricamente polarizadas (204-206). La concentración intracelular de calcio libre en el citoplasma de las células renales se estima en 57 nM (207). Kurtz y col. (124) han encontrado que la concentración de calcio citosólico en las células YG en reposo es alrededor de 300 nM; por arriba de este valor la secreción de renina se inhibe, y por abajo se estimula (21). Las células YG poseen sistemas de expulsión de calcio para mantener este enorme gradiente (201).

Park y col. (208) y Fray y col. (209-211) han encontrado, al igual que otros autores (175,212-217), que existe una relación inversa entre el calcio y el medio de incubación o del plasma sanguíneo y la secreción de renina. En células YG aisladas se ha encontrado que la liberación de renina está relacionada inversamente con el flujo de calcio transmembranal (124,193-196).

Ya que existe un enorme gradiente de concentración del calcio entre el fluido extracelular y el citosol de las células YG, la concentración intracelular de calcio puede modificarse cuando: 1. se alteran los mecanismos normales de extrusión de calcio de estas células (la ATPasa de calcio y el intercambio sodio calcio, que depende finalmente de la actividad de la ATPasa de sodio-potasio) (21,201); 2. se bloquea la salida de calcio de las células YG con sustancias como el lantano (201); 3. se abren

o cierran los canales de calcio sensibles a voltaje (21,201); 4. se modifica la captación o liberación del calcio por los reservorios intracelulares tales como el retículo endoplásmico (21,201); 5. se hace permeable la membrana plasmática con ionóforos de calcio (201); 6. las células YG son estimuladas por hormonas que movilizan calcio (21,193,201); 7. se alteran las concentraciones extracelulares de calcio (191,216).

El intercambio sodio-calcio depende del gradiente de sodio transmembranal, el cual es mantenido por la ATPasa de sodio-potasio. Cuando esta última es inhibida, se bloquea el intercambio sodio-calcio debido a que aumenta la concentración intracelular de sodio, por lo tanto, aumenta la concentración intracelular de calcio y se inhibe la secreción de renina. Por el contrario, la estimulación de la ATPasa de sodio-potasio disminuye el sodio intracelular, estimula el intercambio sodio-calcio por lo que disminuye el calcio intracelular y aumenta la secreción de renina (figura 12).

La inhibición de la ATPasa de sodio-potasio por ouabaina (218-230), vanadato (221,231,232), y concentraciones extracelulares bajas de potasio (218,219,224,230,233,234) inhiben la secreción de renina. Por el contrario, la estimulación de la ATPasa de sodio-potasio por fenitofina (225,235) estimula la secreción de renina (figura 12). El vanadato también inhibe la ATPasa de calcio (236) y sus efectos inhibitorios sobre la secreción de renina también pueden ser explicados por esta acción.

El mediador intracelular de los efectos del calcio sobre la secreción de renina parece ser la calmodulina, debido a que la

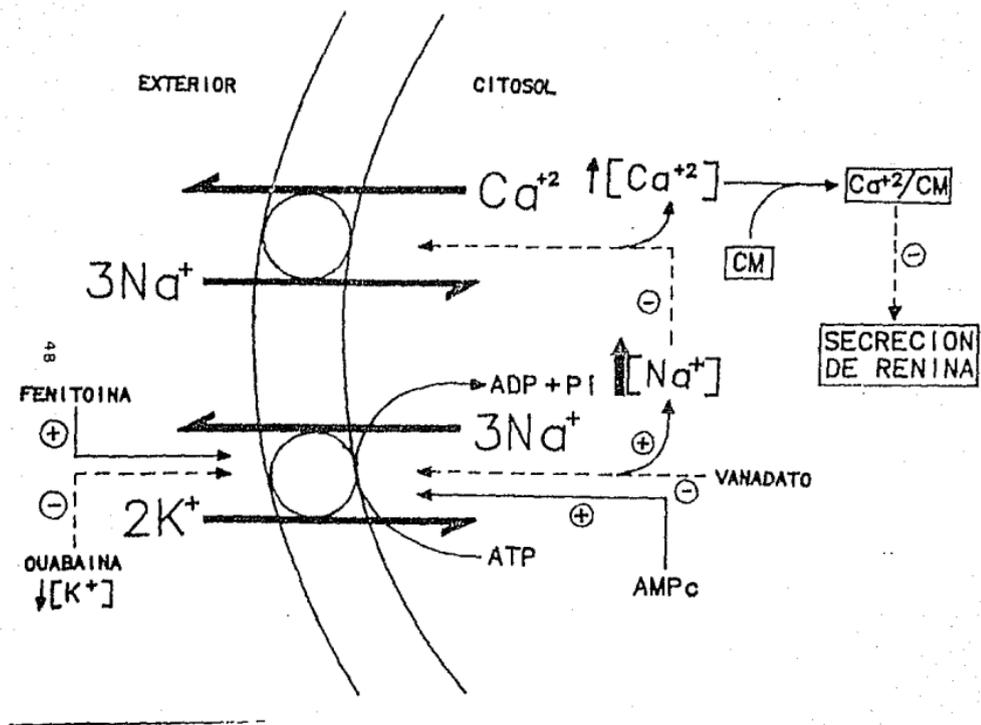


Figura 12.

Papel de la actividad de la bomba de Na-K y del intercambiador Na-Ca.

inhibición de esta por fenotiazinas tales como la trifluoperazina, el calmidazolium, o el W-7 estimulan la secreción de renina producida por agentes que aumentan el calcio citosólico (21,200,237-241).

La despolarización de las células YG por altas concentraciones de potasio (60 mM) abre canales de calcio sensibles a voltaje (242-244) y esto causa la inhibición de la secreción de renina (figura 13). El potasio a estas concentraciones inhibe la secreción de renina en el riñón aislado perfundido (230,245), porciones de corteza renal (201,208,219,228,229,233,246-250) y glomerulos aislados (128). La quelación del calcio extracelular bloquea el efecto inhibitorio de altas concentraciones de potasio (229,251). La participación del calcio en la inhibición de la secreción de renina por altas concentraciones de potasio (despolarización) es apoyada también por el hecho de que los agentes que bloquean los canales de calcio sensibles a voltaje tales como el verapamil (251), el diltiazem (252) y el metoxiverapamil (D 600) (248, 251) bloquean el efecto inhibitorio de la despolarización (figura 13). La nifedipina, otro bloqueador de los canales de calcio, también estimula la secreción basal de renina en porciones de corteza renal (238). Se ha sugerido que el aumento en la presión despolariza las células YG y de esta manera el aumento en la presión de perfusión inhibe fisiológicamente a la secreción de renina (21). La trifluoperazina, el calmidazolium, y otros agonistas de la calmodulina bloquean el efecto inhibitorio de una alta presión de perfusión y de concentraciones despolarizantes de potasio (208,237,241,253). lo que sugiere un posible papel de

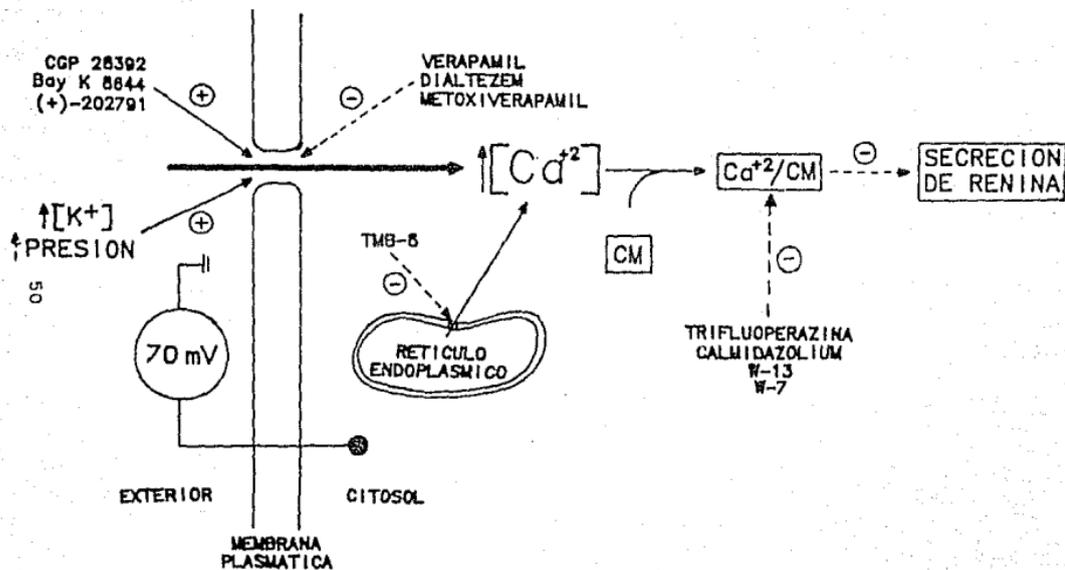


Figura 13.

Apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje por agonistas, despolarización o altas concentraciones extracelulares de potasio.

la calmodulina en la inhibición (figura 13).

La inhibición de la secreción de renina por una alta presión de perfusión o por concentraciones despolarizantes de potasio tienen características similares: ambas son dependientes de calcio, bloqueadas por verapamil (230) y por inhibidores de la calmodulina (253) revertidas por forskolina (253). Además, la estimulación de la secreción de renina por isoproterenol es bloqueada tanto por una alta presión de perfusión como por concentraciones despolarizantes de potasio (245).

Se ha sugerido que la disminución de la presión de perfusión aumenta la secreción de renina porque disminuye la concentración intracelular de calcio en las células YG. Ya que una baja de presión de perfusión hiperpolariza al músculo vascular liso (254), se puede suponer que una hiperpolarización similar ocurre en las células YG, lo cual disminuye la permeabilidad al calcio (figura 14). Otro mecanismo por medio del cual puede disminuir la concentración intracelular de calcio al disminuir la presión de perfusión, es aumentando el flujo de calcio, lo cual ha quedado evidenciado por el hecho de que la ouabaina bloquea la secreción de renina producida por una baja presión de perfusión (255,256). Por otra parte, se ha sugerido, no se ha demostrado definitivamente, que las prostaglandinas son los mediadores del aumento en la secreción de renina producido por la disminución de presión de perfusión (21).

Hay otro grupo de agentes que son los agonistas de los canales de calcio y que inhiben la secreción de renina tales como el BAY K 8644 (206,257-259) y el CGP 28 392 (260). Si se quita el calcio extracelular, el activador del canal pierde su

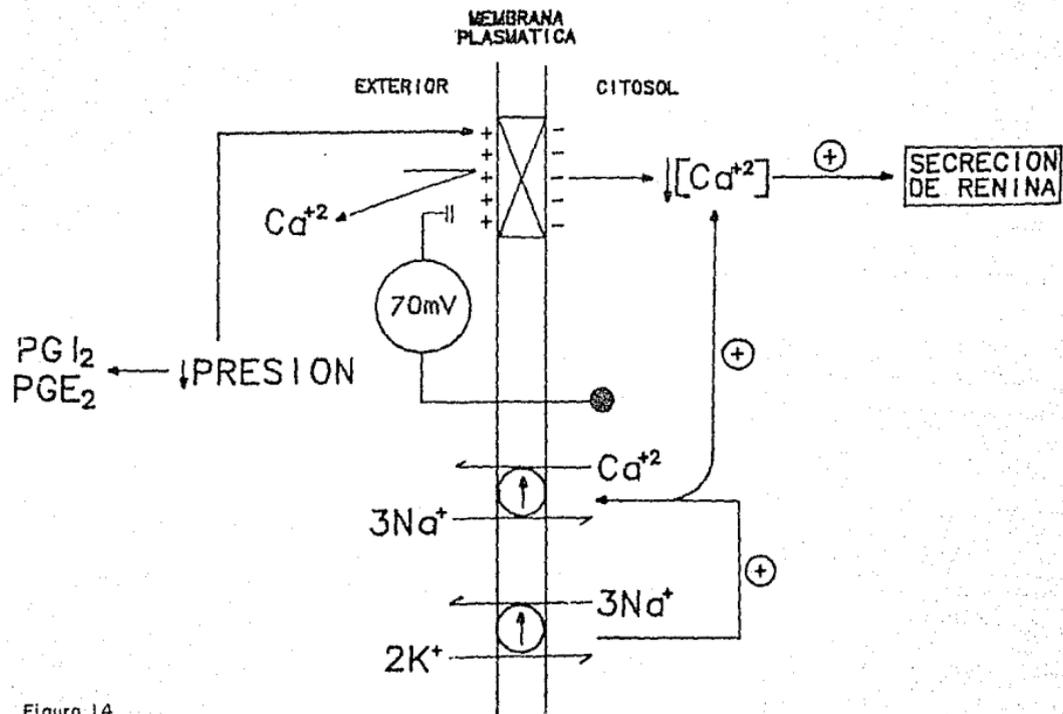


Figura 14 .
Cierre de los canales de calcio sensibles a voltaje por hiperpolarización

efectividad de inhibir la secreción de renina (249,257). La acción inhibitoria de BAY K 8644 y de CGP 28 392 es bloqueada por la nifedipina y por el verapamil, y atenuada por trifluoperazina y el calmidazolium (260).

El efecto inhibitorio de BAY K 8644 sobre la secreción de renina no es observado en riñón perfundido, lo cual puede deberse a efectos hemodinámicos, ya que el BAY K 8644 disminuyó la secreción de sodio, lo cual debe aumentar la renina por el mecanismo de la mácula densa (261).

El TMB-8 estimula la secreción de renina, probablemente por que disminuye el calcio citosólico al bloquear la liberación de calcio de los reservorios intracelulares (177,203,246,262,263). El TMB-8 estimula la secreción de renina en presencia de concentraciones despolarizantes de potasio, lo que sugiere que la liberación de calcio de fuentes intracelulares es importante en la inhibición de la secreción de renina por la despolarización (238) (figura 13).

La concentración intracelular de calcio también puede aumentar por la acción de varias hormonas tales como la AII, la vasopresina, los agonistas alfa-1 adrenérgicos y el factor activador de plaquetas con la consecuente inhibición de la secreción de renina. El efecto inhibitorio de la AII, la vasopresina, la norepinefrina, la metoxamina y fenilefrina sobre la secreción de renina es dependiente del calcio extracelular (247,249,263-267).

Estas hormonas transmiten su información a través de una proteína de la familia G (144-149), a la enzima efectora fosfolipasa C (ver sección de transducción hormonal), la cual

cataliza la ruptura del fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol bifosfato, en diacilglicérido e inositol trifosfato (figura 15) (268, 279). El inositol trifosfato es un activador de la salida de calcio del retículo endoplásmico (270-280) y el diacilglicérido activa a la proteína cinasa C. El calcio extracelular también participa en esta respuesta hormonal, y la entrada de éste es mediada probablemente por el inositol tetrafosfato (268). El complejo calcio-calmodulina y la proteína cinasa C fosforilan a una o varias proteínas que van a producir la respuesta celular y probablemente algunas que participen en la inhibición de la secreción de renina (270-279) (figura 15).

Como ya se mencionó en la sección 1.3.3.1., en una gran variedad de células, entre las que se encuentran las de la corteza y médula suprarrenal, las de la pituitaria, las del páncreas exocrino y endocrino, los neutrófilos y las plaquetas, se ha encontrado que los procesos secretorios son disparados por el aumento en los niveles intracelulares de calcio y nucleótidos cíclicos y por la activación de la proteína cinasa C (102,281-283).

Los ésteres de frobol, sustancias promotoras de tumores encontradas en el aceite de las semillas del pequeño árbol Croton tiglium del sudeste asiático, estimulan directamente a la proteína cinasa C (figura 15), debido a su parecido estructural con el activador fisiológico de ésta, el diacilglicérido. Un ejemplo de estos agentes es el 13-acetato 12-0-tetradecanoilforbol (TPA). Por esta razón es posible inducir una respuesta secretora sostenida por la adición de TPA a las

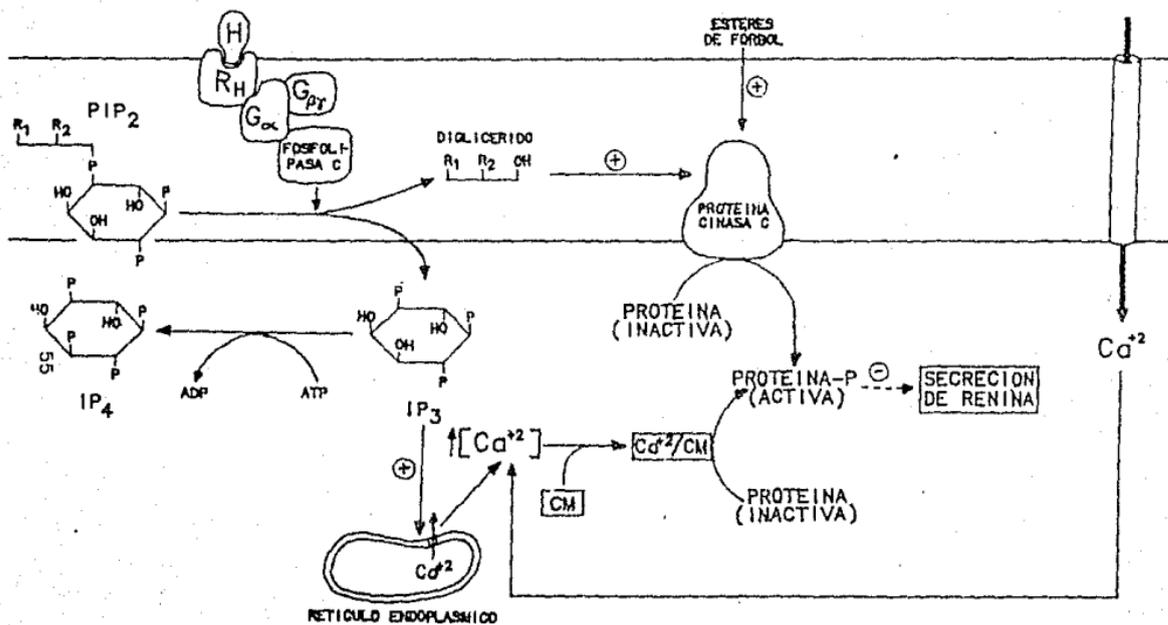


Figura 15

Estimulación de las células juxtaglomerulares por hormonas que movilizan calcio y por agentes que estimulan a la proteína cinasa C.

células. La secreción de renina, contrario a lo que pasa en la mayoría de los sistemas secretores, es inhibida por la activación de la proteína cinasa C en porciones de corteza renal (284) y en células YG aisladas (193).

Ya que el TPA a altas concentraciones puede actuar como ionóforo de calcio, es posible que su efecto inhibitorio se deba a que aumenta las concentraciones intracelulares de calcio. En las células YG aisladas aumenta el flujo de calcio y su efecto inhibitorio puede ser atenuado, o aún abolido completamente, por verapamil (193). Por lo tanto, no está totalmente claro si el TPA inhibe la secreción de renina por la fosforilación de una proteína catalizada por la proteína cinasa C. Es claro, de todos modos, que el TPA no estimula la secreción de las células YG.

La AII, la arginina, vasopresina, la norepinefrina, y el factor activador de plaquetas inhiben la secreción de renina y estimulan el recambio fosfatidilinositol bifosfato en las células YG (193). Sorprendentemente, el factor activador de plaquetas estimula la secreción de renina *in vivo* (285) y en riñón aislado y perfundido (203); esto puede ser un reflejo indirecto de su efecto vasodilatador.

Recientemente se ha encontrado que los productos del metabolismo del ácido araquidónico por vía de la lipoxigenasa juegan un papel inhibitorio en la secreción de renina (287) y que este puede ser el mecanismo intracelular por medio del cual la AII inhibe la secreción de renina (288). La AII puede promover la liberación del ácido araquidónico contenido en fosfatidilinositol bifosfato por la acción secuencial de la fosfolipasa C, que libera el diacilglicérido lipasa que hidroliza el ácido

araquidónico de este último; además puede liberarse por la activación de la fosfolipasa A2 de muchos fosfolípidos.

3.2. EL PAPEL DEL AMPc EN LA SECRECIÓN DE RENINA.

El AMPc es un segundo mensajero estimulador en la secreción de renina (21,174,185,200-203,250).

El diterpeno forskolina, una molécula orgánica aislada de las raíces de la hierba Coleus forskohlii encontrada en la India, activa directamente a la adenilato ciclasa y esta propiedad ha sido usada para purificar a esta enzima (288).

Las evidencias experimentales que apoyan el papel de segundo mensajero estimulador del AMPc en la secreción de renina son (figura 16):

I. La secreción de renina es estimulada por las siguientes hormonas y agentes farmacológicos que aumentan los niveles intracelulares de AMPc:

1) Hormonas naturales y agonistas sintéticos que estimulan a la adenilato ciclasa. Estas hormonas ejercen su acción estimuladora a través de receptores específicos colocados en la membrana celular: a) Las catecolaminas (epinefrina, norepinefrina) y los agonistas beta adrenérgicos como el isoproterenol, a través de los receptores beta adrenérgicos (beta 2 en conejo y gato, y beta 1 en ratas, perros y humanos (170,174,176,289-298)). La estimulación producida por estos agentes es bloqueada por antagonistas beta adrenérgicos tales como el propranolol (174,290,291,299). b) La dopamina a través de

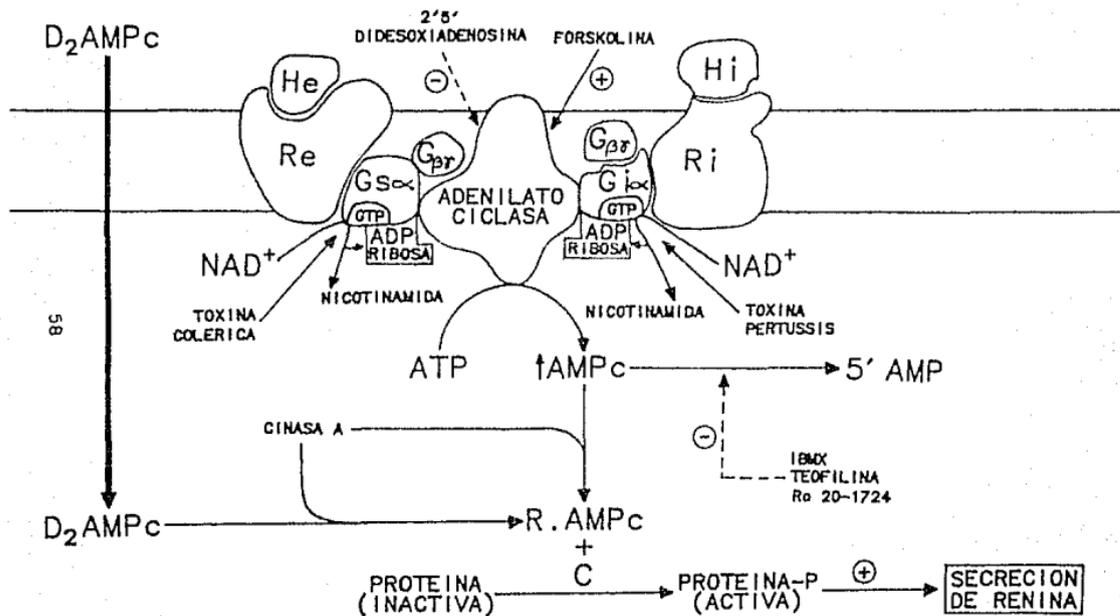


Figura 16

Hormonas y agentes que modifican los niveles de AMPc.

los receptores D1 (176,203,300-304). c) La histamina a través de los receptores H2 (198,199,203,305): la estimulación por histamina es bloqueada selectivamente por la cimetidina (antagonista H2) pero no por la difenidramina (antagonista H1) (198,199) d) La 5'N etilcarboxamida-adenosina, agonista de los receptores A2 de adenosina (185,200,202,250,306,307). e) Las prostaglandinas como la E2 y la I2 (prostaciclina) (170,175,306-312). f) El glucagón (174,315,316). Estas tres últimas actúan a través de sus receptores específicos.

2) La forskolina ya que activa directamente a la adenilato ciclasa (191,200,203,253,317,318).

3) El dibutiril-AMPC (figura 16) un análogo de AMPc soluble en grasas que penetra libremente a las células y que reproduce los efectos metabólicos del AMPc (319-322).

4. La teofilina y la isobutilmetilxantina, inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc que evitan la degradación de este a AMP-5' (322-324).

La toxina colérica, aún cuando no se ha demostrado, probablemente aumenta la secreción de renina, pues mantiene permanentemente elevada a la adenilato ciclasa produciéndose de esta forma el estímulo intracelular sin la activación de receptor alguno, tal como sucede con la forskolina.

Estos datos fueron obtenidos in vivo así como en riñón perfundido, porciones de corteza renal, glomerulos aislados y células YG aisladas.

En células YG aisladas, los activadores de la adenilato ciclasa (isoproterenol, prostaciclina y forskolina) aumentan el contenido de AMPc, y los niveles de este correlacionan

directamente con el aumento en la secreción de renina (202). Por otra parte, en células YG humanas en cultivo, los activadores de la ciclasa (histamina, epinefrina o bradiginina) aumentan la secreción de renina (198,199) y los niveles de AMPc. Las cininas también aumentan la secreción de renina en los glomérulos aislados por un mecanismo independiente de prostaglandinas (325).

El aumento paralelo de AMPc y secreción de renina en las células YG aisladas en respuesta a activadores de la ciclasa, es la única prueba directa del papel estimulador del AMPc en la secreción de renina.

II. El inhibidor de la adenilato ciclasa 2', 5' dideoxiadenosina bloquea la estimulación de la secreción de renina producida por agentes que estimulan a la adenilato ciclasa (262).

III. La secreción de renina disminuye con hormonas y agonistas que inhiben a la adenilato ciclasa, y que en muchos sistemas disminuyen la concentración intracelular de AMPc. Ya que el aumento en los niveles de AMPc aumenta la secreción de renina, es de esperarse que el decremento de los niveles del mismo la disminuya. Sin embargo, no se ha observado que la AII, la cual inhibe la adenilato ciclasa renal (326), disminuya las concentraciones intracelulares de AMPc en las células YG humanas y de rata, a pesar de que inhibe la secreción de renina (191,199). Los receptores específicos de estas hormonas están acoplados inhibitoriamente a la adenilato ciclasa por medio de la proteína Gi.

Estas hormonas y agonistas sintéticos son: 1) la N-6

ciclohexiladenosina, un agonista sintético de la adenosina (195,250,327-329); 2) Los agonistas alfa-2 adrenérgicos, tales como la clonidina (290,291,330-334); 3) La AII (156,191,193,335) y 4) El neuropéptido Y (203,236).

La inhibición de la secreción de renina producida por estos cuatro inhibidores de la ciclasa, es bloqueada por la toxina pertussis (195,290,291,329,334-337).

El neuropéptido Y inhibe a la adenilato ciclasa cardiaca este efecto es mediado por la proteína G sensible a la toxina pertussis (338).

La secreción basal de renina es estimulada por la toxina pertussis en el animal completo (336,339), en porciones de corteza renal (291,329), en riñón aislado y perfundido (335,336) y en células YG aisladas (195). Por otra parte, las acciones beta-adrenérgicas sobre la secreción de renina son potenciadas por la toxina pertussis tanto *in vivo* (290) como *in vitro* (291), lo cual puede explicar el aumento en la secreción basal de renina.

La toxina pertussis bloquea el efecto vasconstrictor de la AII (336) y del agonista alfa 2 adrenérgico guanfacina (335,336).

La inhibición de la secreción de renina por el neuropéptido Y también fue observado en porciones de corteza renal, y no pudo ser explicado por la liberación de norepinefrina de las terminales nerviosas puesto que la adición del agonista alfa 1 adrenérgico prazosina, no bloqueó el efecto inhibitorio, y tampoco pudo explicarse por el aumento en los flujos de calcio ya que ni el D-600 ni el calmidazolium bloquearon el efecto inhibitorio (336). El mecanismo más probable de la inhibición de

la secreción de renina por el neuropéptido Y es a través de la inhibición de la adenilato ciclasa. Rossi y col. (329) encontraron que la toxina pertussis fue incapaz de bloquear la inhibición de la secreción de renina producida por concentraciones despolarizantes de KCl, lo que sugiere que el sustrato de la toxina pertussis no controla los canales de calcio sensibles a voltaje. Kurtz y col. (195) han encontrado que la toxina pertussis adicionada al medio de cultivo no modifica los niveles basales de AMPc o GMPc de las células YG. Al momento no está claro si el sustrato de la toxina pertussis en las células YG es la proteína Gi u otra proteína de la familia G.

En la figura 15 se resumen las relaciones de las hormonas y agentes farmacológicos que interaccionan con la adenilato ciclasa y que modifican la secreción de renina.

3.3. EL PAPEL DEL GMPc EN LA SECRECIÓN DE RENINA.

Kurtz y col. (124,194,195,202) han propuesto que el GMPc es un segundo mensajero inhibitorio, ya que hay una relación inversa entre los niveles de GMPc y la secreción de renina. La guanilato ciclasa, la enzima que sintetiza GMPc a expensas del GTP (340), está presente en el citosol y la otra está presente en la membrana celular. La enzima soluble es activada por dos clases de vasodilatadores: los nitrovasodilatadores (nitroglicerina y nitroprusiato de sodio) y vasodilatadores dependientes de las células endoteliales (acetilcolina y bradiginina). La única hormona que se ha demostrado que activa a la guanilato ciclasa de membrana es el péptido natriurético atrial (PNA) (341).

El papel del GMPC en los procesos secretorios no está muy claro. Se ha observado que la estimulación de la secreción en varios tipos celulares se acompaña de un aumento en los niveles intracelulares de GMPC (342). Hay poca información del posible papel del GMPC en la secreción de renina, sin embargo, se ha estudiado recientemente el efecto del PNA sobre la secreción de renina y los resultados encontrados son contradictorios. Algunos autores han encontrado que el PNA inhibe la secreción de renina in vivo (343-350) e in vitro (124,194,202,350), otros han observado que no la modifica (351-356), y por último, otro grupo de autores han encontrado que la estimula (185,204,357). Las diferencias entre estos hallazgos experimentales no está clara por el momento.

El PNA aumenta la liberación de GMPC del riñón y disminuye la liberación de AMPc (350) debido a que estimula la guanilato ciclasa (341) e inhibe la adenilato ciclasa (358). En células YG aisladas también aumenta los niveles de GMPC, disminuye los niveles de AMPc e inhibe la secreción de renina (194) La inhibición de la secreción de renina por el PNA correlaciona inversamente con el aumento en la concentración intracelular de GMPC y no con la disminución de AMPc (194,202). La toxina pertussis bloquea la estimulación de los niveles de GMPC y la inhibición de los niveles de AMPc producidos por el PNA (194). Esto ha conducido a sugerir que el sustrato de la toxina pertussis está acoplado inhibitoriamente a la adenilato ciclasa y estimulatoriamente a la guanilato ciclasa (194). Sin embargo, no se ha demostrado que la guanilato ciclasa esté acoplada a una

proteína de la familia G, aunque sí se ha demostrado que una proteína G puede estar acoplada a más de un sistema efector intracelular (144,147).

La disminución en la secreción de renina producida por el PNA no puede explicarse por cambios en la concentración intracelular de calcio ya que el PNA, a diferencia de la AII, no modifica las concentraciones intracelulares de calcio medidas con quin-2 en las células YG (124).

Se ha sugerido que la inhibición de la secreción de renina producida por la adenosina también puede ser explicada por el aumento en la concentración intracelular de GMPC y no por la disminución de los niveles de AMPc, ya que la adenosina no disminuye los niveles de AMPc pero sí aumenta los niveles de GMPC en las células YG (195). La adenosina no modifica la captación de calcio por las células YG, lo cual sugiere que su efecto inhibitorio no depende del aumento en el calcio intracelular. Interesantemente la toxina pertussis bloqueó el efecto inhibitorio de la adenosina sobre la secreción de renina y sobre la estimulación de los niveles de GMPC (195).

3.4. INTERACCIONES AMPc-Ca²⁺ y Ca²⁺-AMPc.

Es posible que el AMPc no modifique la secreción de renina directamente sino a través de la disminución de los niveles citosólicos de calcio. Los posibles mecanismos por medio de los cuales el AMPc ejerce esta acción son (figura 17):

1. Aumento de la salida de calcio al estimular directamente la ATPasa de calcio e indirectamente el intercambio sodio-calcio

por medio de activación de la bomba de sodio-potasio (359-363).

2. Estimulación de la captación de calcio por los reservorios intracelulares (364).

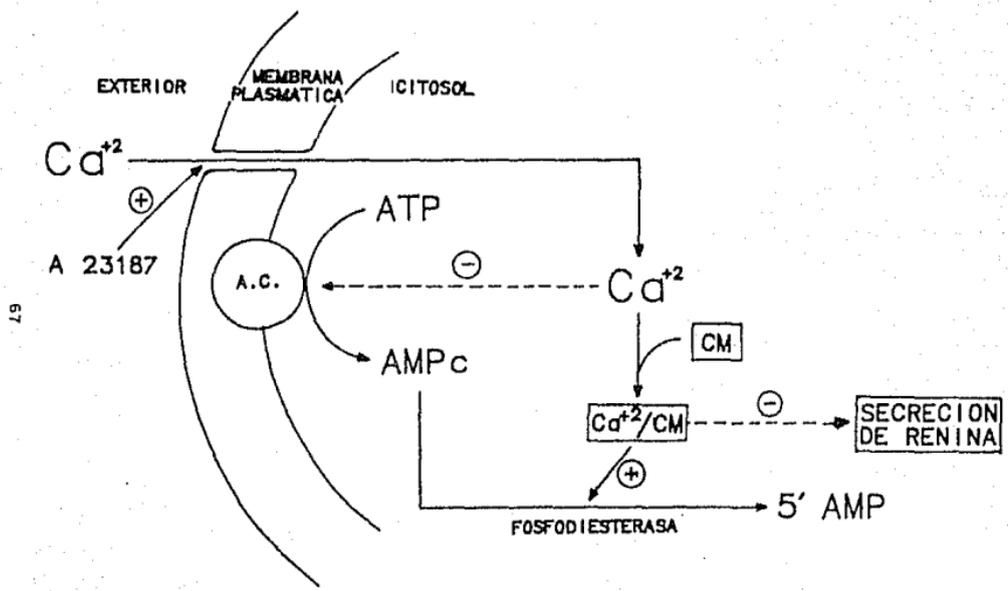
Por otra parte, el calcio puede disminuir la concentración de AMPc inhibiendo la adenilato ciclasa o estimulando la fosfodiesterasa de AMPc (281) (figura 18).

Los agonistas beta adrenérgicos estimulan la secreción de renina por el retículo endoplásmico (364). Esto puede explicar porqué el AMPc y los agonistas beta-adrenérgicos estimulan la secreción de renina en presencia de una presión de perfusión alta (253), del ionóforo de calcio A 23187 (320) ó concentraciones despolarizantes de potasio (229, 318).

La secreción de renina inducida por el aumento en AMPc no se modifica a pesar de los cambios en el calcio extra o intracelular o por bloqueadores de la calmodulina (222, 238, 253).

Por otra parte, el efecto estimulatorio sobre la secreción de renina de los agonistas beta adrenérgicos es antagonizado por hormonas y agentes que aumentan el calcio intracelular tales como los agonistas alfa-1 adrenérgicos (267), la vasopresina (222, 264), la AII (222), la ouabaina (221,222,230), las bajas concentraciones extracelulares de potasio (233), el vanadato (221,222) y la despolarización por altas concentraciones de potasio (222,233). El lantano bloquea la secreción de renina producida por el isoproterenol y el glucágon (365) lo que sugiere que el efecto estimulatorio de estas hormonas es debido a un aumento en el flujo de calcio intracelular.

Para evitar que la interpretación de los resultados dependa del orden de adición de las hormonas que modifican el AMPc o el



67

Figura 18
Influencia del calcio sobre los niveles intracelulares de AMPc

CM: Calmodulino

calcio, Fray y col. (253) hicieron un experimento en riñón perfundido en donde estimularon la secreción de renina con forskolina y después la inhibieron por despolarización al aumentar la presión de perfusión. Este experimento lo repitieron invirtiendo el orden de adición de los agentes. En otro experimento similar usaron forskolina y concentraciones despolarizantes de potasio. La forskolina aumentó la secreción de renina de 679 a 1812 nanogramos de AI / hora por gramo de riñón por 15 min (ng/h.g.15 min) y el aumento en la presión de perfusión la disminuyó a 897. La presión de perfusión alta disminuyó la secreción de renina de 555 a 118 ng/h.g.min y la forskolina la revirtió a 907. Cuando la despolarización se realizó con altas concentraciones de potasio en vez de un aumento en la presión de perfusión los resultados fueron casi idénticos. Como se puede observar, la secreción final de renina después de ambos estímulos no depende del orden en que los agentes se adicionaron. Estos resultados pueden sugerir que el calcio y el AMPc modifican la secreción de renina por vías paralelas (318).

Sin embargo, para resolver este problema, es necesario medir las concentraciones intracelulares de calcio y AMPc en respuesta a agentes que modifican el AMPc en un caso y calcio en otro en forma paralela con la secreción de renina. De esta forma se podrá precisar si el aumento en AMPc modifica o no las concentraciones intracelulares de calcio y viceversa.

4. CONCLUSIONES.

La regulación intracelular de la secreción de renina es muy compleja ya que se comporta de una manera inversa a la mayoría de los sistemas secretorios. La secreción de renina es inhibida por el aumento intracelular de calcio, por la activación de la calmodulina, por la estimulación de la proteína cinasa C y por el aumento del GMPC. La única característica que lleva en común con los demás sistemas secretorios es que es estimulada por un aumento en el AMPc. Las posibles interrelaciones entre los segundos mensajeros tales como las presentadas entre el calcio y el AMPc hacen más complejo el problema. Sin embargo, el principal obstáculo lo constituye la dificultad de obtener células puras.

El mecanismo por medio del cual varias hormonas, péptidos y neurotransmisores tales como la serotonina, la sustancia P, la somatostatina, el péptido vasoactivo intestinal y la insulina (366-371) modifican la secreción de renina, no está totalmente elucidado. Por otra parte, es necesario confirmar en células YG aisladas, el mecanismo de acción propuesto en sistemas más complejos para otras hormonas. Uno de los problemas de frontera en este campo es el de elucidar estos mecanismos totalmente, para lo cual es indispensable el uso de células YG puras, en donde se puedan medir los mensajeros intracelulares y los cambios de la actividad de algunas enzimas como la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa, la proteína cinasa C, las cinasas dependientes de AMPc, GMPC o de calcio-calmodulina, en respuesta a los diferentes estímulos. No está totalmente claro si la disminución de los niveles de AMPc sea un prerequisite para la disminución de la secreción de renina. Es necesario medir los niveles de AMPc y

la actividad de la adenilato ciclasa en respuesta a agentes que inhiben a esta enzima como el neuropéptido Y y la clonidina, con lo cual se pueda confirmar o proponer alternativas a los hallazgos realizados con la AI1 y con la adenosina (191,195).

El sustrato o los sustratos de la toxina pertussis en las células YG deben ser identificados para poder interpretar los resultados obtenidos hasta el momento con esta toxina y así seguir usándola como una herramienta en el estudio de los mecanismos de acción hormonal en la secreción de renina.

Es necesario que diversos grupos amplíen sus estudios sobre el papel del GMPC como segundo mensajero inhibitorio de la secreción de renina, debido principalmente a que no todos los grupos han encontrado que el péptido natriurético atrial, el cual estimula la guanilato ciclasa inhiba la secreción de renina.

El mecanismo detallado por medio del cual el calcio y/o el complejo calcio-calmodulina, el AMPc, el GMPC y la proteína cinasa C modifican la secreción de renina no se conoce aún. Se piensa, pero no ha sido probado, que el calcio y los nucleótidos cíclicos ejercen su efecto por la activación de cinasas de proteínas específicas (figura 15 y 16).

Los avances en este campo permiten suponer que los niveles en donde se enfocará el estudio de la regulación intracelular de la secreción de renina en los próximos años son los siguientes:

1. Elucidación de los mensajeros intracelulares en respuesta al estímulo de hormonas de mecanismo desconocido, en células YG puras y su mecanismo de acción.

2. Interacciones entre los mensajeros intracelulares ya que es necesario precisar si cada mensajero intracelular afecta por

separado la secreción de renina (mecanismos paralelos) o si solo uno de ellos es el segundo mensajero "final".

5. BIBLIOGRAFIA.

1. Vallotton, M.B.: The renin angiotensin system. Trends Pharmacol. Sci. 8: 69-74, 1987.
2. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Kahn J., Lentz, K., Levin, M.: The biochemistry of renin angiotensin system and its role in hypertension. Am. J. Med. 60: 737-748, 1976.
3. Brenner, B.M. y Rector, F.C. Jr.: The Kidney. Tercera Edición. W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp. 281-300, 1986.
4. Inagami, T., Nakamura, M., Pandey, K., Naruse, M., Naruse, K., Misono, K., Okamura, T., y Kawamura, M.: Intracellular action of renin, angiotensin production on release. J. Hypertension 4 (Supl.4): S11-S16, 1986.
5. Dzau, V.J.: Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. Am. J. Cardiol. 59: 59A-65A, 1987.
6. Chansel, D., Dussaule, J.-C., Ardaillou, N., y Ardaillou, R.: Identification and regulation of renin in human cultured mesangial cells. Am. J. Physiol. 252 (Renal fluid and electrolyte physiol. 21) : F32-F38. 1987.
7. Re, R., Fallon, J.T., Dzau, S.C., y S.C., Haber, E.: Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. Life Sci. 30: 99-106, 1982.
8. Lilly, L.S., Pratt, R.E., Alexander, W., Larson, D.M., Ellison, K.E., Gimbrone, Jr M.A., y Dzau, V.J.: Renin expression by vascular endothelial cells in culture. Circ. Res. 57: 312-318, 1985.
9. Mesterovic, N., Catanzaro, D.F., y Morris, B.J.: Detection of renin mRNA in mouse kidney and submandibular gland by hybridization with renin cDNA. Endocrinology 113: 1179-1181, 1983.
10. Dzau, V.J., Ellison, K., McGowan, D., Gross, K.W., y Gulleto, A.: Hybridization studies with a renin probe: evidence for widespread expression of renin in the mouse. J. Hypertension 2 (suppl. 3) 235-237, 1984.
11. Soubrier, F., Panthier, J.-J., Corvol, P., y Rougeon, F.: Molecular cloning and nucleotide sequence of a human renin cDNA fragment. Nucl. Acid. Res. 11: 7181-7190, 1983.
12. Pandey, K.N. Maki, M., e Inagami, T.: Detection of renin mRNA in mouse testis by hybridization with cDNA probe. Biochem. Biophys. Res. Commun. 125: 662-667, 1984.
13. Field, L.J., McGowan, R.A., Dickinson, D.P., y Gross, K.W.: Tissue and gene specificity of mouse renin expression.

Hypertension 6: 597-603, 1984.

14. Dzau, V.J., Ingelfinger, J., Pratt, R.E., y Ellison, K.E.: Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequence in mouse and rat brains. Hypertension 8: 544-548, 1986.

15. Nakamura, N., Soubrier, F., Menard, J., Panthier, J.-J., Rougeon, F., y Corvol, P.: Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content, and rat renin messenger RNA. Hypertension 7: 855-859, 1985.

16. Kim, S.-J., Shinjo, M., Fukamizu, A., Miyasaki, H., Usuki, S., y Murakami, K.: Identification of renin and renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 142: 169-175, 1987.

17. Barajas, L.: Anatomy of the juxtaglomerular apparatus Am. J. Physiol. 237: F 333-F 343, 1979.

18. Taugner, R., Buhle, C.P., y Nobilig, R.: Ultrastructural Changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. Cell Tissue Res. 237: 459-472, 1984.

19. Barajas, L., y Powers, K.: The structure of the juxtaglomerular apparatus (JGA) and the control of renin secretion; an update. J. Hypertension 2 (suppl.1): 3-12, 1984.

20. Ryan, B.B., Coghlan, J.P., y Scoggins, B.A.: The granulated peripolar epithelial cell: a potential secretory component of the renal juxtaglomerular complex. Nature 277: 655-656, 1979.

21. Fray, J.C., Park, C.G., y Valentine, A.N.: Calcium and the control of renin secretion. Endocr. Rev. 8: 53-93, 1987.

22. Harada, K.: Histochemical studies of the juxtaglomerular apparatus. Rev. Belge. Pathol. Exp. 23 : 311, 1954.

23. Taugner, C.H., Poulsen, K. Hackenthal, E., y Taugner, R.: Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. Histochemistry 62: 19-27, 1979.

24. Buhle, C., Nobilig, R., Mannek, E., Schneider, D. Hackenthal, E., y Taugner, R.: The aferent glomerular arteriole immunocytochemical and electrophysiological investigations. J. Cardiovasc. Pharmacol. 6: 5383-5393, 1984.

25. Hill, P.A., Coghlan, J.P., Scoggins, B.A., y Ryan, B.B.: Ultrastructural changes in the sheep renal juxtaglomerular apparatus in response to sodium depletion or loading. Pathology 15: 463-473, 1983.

26. Roullier, C., y Orci, L.: The structure of juxtaglomerular complex. En: Roullier C., Muller AF (eds) The Kidney, Morphology, Biochemistry, Physiology. Academic Press., New York 4: 1-80, 1971.

27. Worthington, W.C.: Vital staining of juxtaglomerular granules of the mouse kidney by neutral red. *Anat. Rec.* 129: 407, 1957.
28. Fray, J.C.S., y Laurens, N.J.: Mechanisms by which albumin stimulates renin secretion in isolated kidneys and juxtaglomerular cells. *J. Physiol. (London)* 320: 31-39, 1981.
29. Cantin, M., Veilleux, R., y Desormeaux, Y.: Lysosomal function of juxtaglomerular granules. *Experientia* 30: 794-797, 1974.
30. Barajas, L.: The development and ultrastructure of the juxtaglomerular cell granule. *J. Ultrastruct. Res.* 15: 400-413, 1966.
31. Morimoto, S., Abe, R., Fukuhara, A., Tanaka, K., y Yamamoto, K.: Effect of sodium restriction on plasma renin activity and renin granules in rat kidney. *Am. Physiol.* 237: F367-F371, 1979.
32. Nishimura, K., Alhenc-Gelas, F., White, A., y Erdos, E.G.: Activation of membrane-bound kallikrein and renin in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 77: 4975-4978, 1980.
33. Nishimura, K., Ward, P., y Erdos, E.G.: Kallikrein and renin in the membrane fractions of the rat kidney. *Hypertension* 2: 538-545, 1980.
34. Russo, S.M., y Fray, J.C.S.: A simple and rapid method for the investigation of renin release from purified rat renal cortical plasma membranes. *Physiologist* 28: 268, 1985.
35. Wilson, C.M., Ward, P.E., Erdos, E.G., y Gecse, A.: Studies on membrane-bound renin in the mouse and rat. *Circ. Res. (Suppl 2)* 38: 95-98, 1976.
36. Morimoto, S., Nakamura, N., Ito, K., y Takaoka, M.: Molecular characterization of renin in plasma and kidney of sodium-restricted rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 31: 3755-3758, 1983.
37. Taugner, R., Walley, A., Angermuller, S., Buhrlé, C., y Hackenthal, E.: Are the renin-containing granules of the juxtaglomerular epithelioid cells modified lysosomes? *Cell. Tissue Res.* 239: 557-587, 1985.
38. Taugner, R., Yokota, S., Buhrlé, C., y Hackenthal, E.: Cathepsin D coexist with renin in secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells. *Histochemistry* 84: 19-22, 1986.
39. Taugner, R., Buhrlé, C., Nobiling, R., y Kirschke, H.: Coexistence of renin and cathepsin B in epithelioid cell secretory granules. *Histochemistry* 83: 103-108, 1985.
40. Figueiredo, A.F., Takii, Y., Tsuji, H., e Inagami, T.G.: Rat kidney renin and cathepsin D: purification and comparison of

properties. *Biochemistry* 22: 5476-5481, 1983.

41. Fisher, E.R.: Lysosomal nature of juxtaglomerular granules. *Science* 152: 1752-1753, 1966.

42. Morris, B.J., y Johnston, C.I.: Isolation of renin granules from rat kidney cortex and evidence for an inactiva form of renin (prorenin) in granules and plasma. *Endocrinology* 98: 1466-1474, 1976

43. Korfeld, S.: Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J. Clin. Invest.* 77: 1-6, 1986.

44. Hasilik, A., y Neufeld, E.: Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 255: 4937-4944, 1980.

45. Lacasse, J., Ballak, M., Mercure, C., Gutkowska, J., Chappeau, C., Foote, S., Menard, J., Corvol, P., Cantin, M., y Genest, J.: Immunocytochemical localization of renin in juxtaglomerular cells. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 323-332, 1985.

46. Palade, G.: Intracellular aspects of process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358, 1975.

47. Pratt, R., Oullette, A., y Dzau, V.: Biosynthesis of renin: multiplicity of inactive and immediate forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 6809-6813, 1983.

48. Galen, F., Devaux, C., Honot, A., Menard, J., Corvol, P., Corvol, M., Gubler, M., y Camilleri, J.: Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. *J. Clin. Invest.* 73: 1144-1155, 1984.

49. Chandra, S., Hubbard, J.C., Skelton, F.R., Bernardis, L.L., y Kamura, S.: Genesis of juxtaglomerular cell granules. *Lab. Invest.* 14: 1834, 1965.

50. Desormmeaux, Y., Ballak, M., Benchimol, S., Laccasse, J., Cantin, M., y Genest, J.: Synthesis and migration of proteins and glycoproteins in juxtaglomerular cells of sodium-deficient rats. *Cell. Tissue Res.* 22: 53, 1982.

51. Barajas, L., y Latta, H.: the juxtaglomerular apparatus in adrenalectomized rats. *Lab. Invest.* 12: 1046-1059, 1963.

52. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E., y Levine, M.: Experimental renal hypertension: the discovery of the renin angiotensin system: Biochemical regulation of blood pressure. Editado por R.L. Suffer, J. Wiley, 3-71, 1981.

53. 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.

54. Braun-Menéñez, E., Fasciolo, J., Leilor, L., y Muñoz, J.: The

substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98: 283-298, 1940.

55. Hobart, P.M., Fogliano, M., Oconnor, B.A., Schaefer, I.M. y Chirgwin, J.M.: Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 5026-5030, 1984.

56. Morris, B.J.: New possibilities for intracellular renin and inactive renin now tha the structure of the human renin gene has been elucidated. *Clin. Sci.* 71: 345-357, 1986.

57. Panthier, J.J., Dreyfus, M., Tronik-le Roux, D., y Rougeon, F.: Mouse kidney and submaxillary gland renin genes differ in their 5' putative regulatory sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 5489-5493, 1984.

58. Field, L.J., Philbrick, W.M., Howles, P.N., Dickinson, D.P., McGowan, R.A., y Gross, K.W.: Expression of tissue-specific Ren-1 and Ren-2 genes of mice: comparative analysis of 5'-proximal flanking regions. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2321-2331, 1984.

59. Cumin, F., Evin, G., Fehrentz, J., Seyer, R., Castro, B., Menard, J., y Corvol, P.: Inhibition of human renin by synthetic peptides derived from its prosegment. *J. Biol. Chem.* 260: 9154-9157, 1985.

60. Catanzaro, D.F., Mesterovic, N. y Morris, B.J.: Studies of regulation of mouse renin genes by measurement of renin mRNA. *Endocrinology* 117: 872-878, 1985.

61. Corvol, P., Devaux, C., y Menard, J.: Pepstatin, an inhibitor for renin purification by affinity chromatography. *FEBS Lett.* 34: 180-192, 1973.

62. Inagami, T., Misono, K., y Michelakis, A.M.: Definitive evidence for similarity in the active site of renin and acid proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56: 503-509, 1974.

63. Misono, K., e Inagami, T. : Characterization of the active site of mouse submaxillary gland renin. *Biochemistry* 19: 2616-2622, 1982.

64. Day, R., y Haber, E.: The biochemistry of renin. *Handbook of Hypertension Vol. 8: Pathophysiology of Hypertension Regulatory Mechanisms.* A, Zanchetti and R.C. Tarazi, editors Elsevier Science Publishers B.V., 315-364, 1986.

65. Misono, K.S., e Inagami, T.: Structure of mouse submaxillary gland renin. Identification of two disulfide-linked polypeptide chains and the complete amino acid sequence of the light chain. *J. Biol. Chem.* 257: 7536-7540, 1982.

66. Misono, K.S., Chang, J.J., e Inagami, T.: Amino acid sequence of mouse submaxillary gland renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4858-4862, 1982.

67. Panthier, J-J., Foote, S., Chambred, B., Strosberg, A.D., Corvol, P., y Rougeon, F.: Complete amino acid sequence and maturation for the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298: 90-92, 1982.
68. Wilson, C.M. y Taylor, B.A.: Genetic regulation of thermostability of mouse submaxillary gland renin. *J. Biol. submaxillary gland renin. Chem.* 257: 217-223, 1982.
69. Inagami, T., Murakami, K., Yokosawa, H., Matoba, T., Yokosawa, N., Takii, Y., y Misono, K.: Purification of renin and precursors, in Enzymatic release of vasoactive peptides, Editado por Gross F. and Vogel H.F. Raven, New York, 1980.
70. Holm, I., Gillo R., Panthier, J.J., y Rougeon, F.: Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: The mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *EMBO. J.* 3, 557-562, 1984.
71. Burnham, Ch.E., Hawelu-Johnson, CH. L., Frank B.M., y Lynch, K.R.: Molecular cloning of rat renin cDNA and its gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 5605-5609, 1987.
72. Imai, T., Miyazaki, H., Hirose, S., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S., y Murakami, K.: Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 7405-7409, 1983.
73. Shinagawa, T., Do Yung-Shun, Tam, H., y Hsueh, W.A.: Complete Purification of human renal renin and sequence of the amino terminus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 139: 446-454, 1986.
74. Do, Yung-shun, Shinagawa, T., Tam, H., Inagami, T., y Hsueh, W.A.: Characterization of pure human renal renin. *J. Biol. Chem.* 262: 1037-1043, 1987.
75. Murakami, K., Hirose, S., Miyazaki, M.S., Imai, T., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, 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.
76. Deschepper, C., Bounik, J. y Ganong, W.F.: Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain. Res.* 374: 195-198, 1986.
77. Hirose, S., Kim, S., Hitoshi, M., Park, Y.S., y Murakami, K.: In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *J. Biol. Chem.* 260: 16400-16405, 1985.
78. Pratt, R.E., Carleton, J.E., Heusser, C., Richie, J., y Dzau, V.J.: Biosynthesis of multiple forms of renin in human kidney. *J. Hypertension* 4(Suppl. 6): S516-S518, 1986.

79. Pratt, R.E., Carleton, J.E., Richie, J., Heusser, C., y Dzau, V.J.: Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 7837-7840, 1987.
80. Catanzaro, D.F., Mullins, J.J., y Morris, B.J.: The biosynthetic pathway of renin in mouse submandibular gland. *J. Biol. Chem.* 258: 7364-7368, 1983.
81. Dzau, V.J., Roth, T.P., Pratt, R.E., y Carleton, J.E.: Cellular pathway and regulation of prorenin secretion in the kidney. (resumen). *Clin. Res.* 34: 477A, 1986.
82. Field, L.J., y Gross, K.W.: Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6196-6200, 1985.
83. Gibbons, G., Dzau, V.J., Fahri, E., y Barger, A.C.: Interactions of signals influencing renin release. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 291-308, 1984.
84. Kim, S.J., Iwao, H., Nakamura, N., Ikemoto, F., y Yamamoto, K.: Fate of circulating renin in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 252 (Endocrinol. Metab.15): E136-E146, 1987.
85. Nakamura, N., Iwao, H., Ikemoto, F., y Yamamoto, K.: Renal metabolism in mice of exogenously administered 125I labelled renin. *J. Hypertension* 2: 241-248, 1984.
86. Paul, M., Nakamura, N., Pratt, R.E., Burt, D.W., Flynn, J., y Dzau, V.J.: Evidence for species specific renin processing and secretion in transfected cells. (resumen). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 191: 647, 1987.
87. Pratt, R.E., Flynn, J.A., Hobart, P.M., Paul, M., y Dzau, V. J.: Different secretory pathways of renin from mouse cells transfected with human renin gene. *J. Biol. Chem.* 263: 3137-3141, 1988.
88. Sealy, J.E.: Biochemical aspects of plasma prorenin: En: *Biochemical regulation of blood pressure*. Editado por: R.L. Suffer, J. Wiley, pp. 73-94, 1981.
89. Bouhnik, J., Fehrentz, J., Galen, F., Seyer, R., Evin, G., Castro, B., Menard, J., y Corvol, P.: Immunological identification of both plasma and human renal inactive renin as prorenin. *J. Clin. Endocr. Metab.* 60: 399-401, 1985.
90. Kim, S., Hirose, S., Miyasaki, H., Nigashimori, K., Morinaga, S., Kimura, T., Sakakibara, S., y Murakami, K.: Identification of plasma inactive renin as prorenin with a site-directed antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 641-645, 1980.

91. Sealey, J.E., Atlas, S.A., y Laragh, J.H.: Prorenin and other large molecular weight forms of renin. *Endocrine Rev.* 1: 365-391, 1980.
92. Osmond, D.H., Ross, L.J., y Scaiff, K.D.: Increased renin activity after cold storage of human plasma. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 51: 705-708, 1973.
93. Sealey, L.E., Atlas, S.A., y Laragh, G.H.: Plasma prorenin-physiological and biochemical characteristics. *Clin. Sci.* 63 (suppl B): 133-145, 1982.
94. Tang, S.S., Loscalzo, J., y Dzau, V.J.: Tissue plasminogen activator activates renin-angiotensin system (resumon). *Hypertension Dallas* 10: 355, 1987.
95. Dzau, V.J., González, D., Kaemper, C., Dubin, D., y Wintroub, B.U.: Human neutrophils release serine proteases capable of activating prorenin. *Circ. Res.* 60: 595-601, 1987.
96. Stryer, L.: *Biochemistry*, Tercera Edición, Freeman, pp. 767-798, 1988.
97. Kelly, R.B.: Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230: 25-32, 1985.
98. Chung, K.-N., Walter, P., Aponte, G.W., y Moore, H.-P.H.: Molecular sorting in the secretory pathway. *Science* 243: 192-197, 1989.
99. Brown, E.M., Pazoles, C.J., Creutz, C.E., Aurbach, G.D., y Pollard H.B.: Role of anions in parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 876-880, 1978.
100. Dean, P.M.: Exocytosis modelling: an electrostatic function for calcium in stimulus-secretion coupling. *J Theor. Biol.* 54: 289-308, 1975.
101. Douglas, W.W.: Stimulus-secretion coupling the concept and clues from cromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 451, 1968.
102. Rubin, R.P.: The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol Rev.* 22: 389-428, 1970.
103. Baker, P.F., y Knight, D.E.: Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* 275: 620, 1978.
104. Knight, D.E., y Baker, P.F.: Calcium dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membrane Biol.* 68-107, 1982.

105. Ochs, D.L., Korenbrot, J.I., y Williams J.A.: Relation between free cytosolic calcium and amylase release by pancreaticacini. *Am. J. Physiol.* 249: G309-G398, 1985.
106. Davis, B., y Lazarus, N.R.: An *in vitro* system for studying insulin release caused by secretory granules-plasma membrane interaction: definition of the system. *J. Physiol. (Lond)* 256: 709-729, 1976.
107. Zimmerberg, J., Cohen, F.S., y Finkelstein, A.: Micromolar Ca²⁺ stimulates fusion of lipid vesicles with planar bilayers containing a calcium-binding protein. *Science.* 210: 906-908, 1980.
108. Yoshihara, E., y Nakae, T.: Quantitative measurement of membrane fusions with calcium and polyethylene glycol using the porin function. *FEBS Lett.* 166: 49-52, 1984.
109. Holz, R.W., y Stratford, C.A.: Effects of divalent ions on vesicle fusion studied by a new luminescence assay for fusion. *J. Membrane Biol.* 46: 331, 1979.
110. Miller, C., Arvan, P., Telford, J.N., y Racker, E.: Ca⁺⁺ induced fusion of proteoliposomes: dependence on transmembrane osmotic gradient. *J. Membrane Biol.* 30: 271-282, 1976.
111. Papahadjopoulos, D., Vail, W.J., Pagborn, W.A., y Poste G.: Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals. *Biochem. Biophys. Acta.* 448: 265-283, 1976.
112. Akabas, M.H., Cohen, F.S., y Finkelstein, A.: Separation of the osmotically driven fusion event from vesicle-planar membrane attachment in a model system for exocytosis. *J. Cell. Biol.* 98: 1063-1071, 1984.
113. Creutz, C.E., Pazoles, C.J., y Pollard, H.B.: Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 253: 2858-2866, 1978.
114. Zimmerberg, J., y Whitaker, M.: Irreversible swelling of secretory granules during exocytosis caused by calcium. *Nature* 315: 581-584, 1985.
115. Cohen, F.S., Zimmerberg, J., y Finkelstein, A.: Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. II. Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. *J. Gen Physiol.* 75: 251, 1980.
116. Zimmerberg, J., Cohen, F.S., y Finkelstein, A.: Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. I. Discharge of vesicular contents across the planar membrane. *J. Gen Physiol.* 75: 241-250, 1980.

117. Pollard, H.B., Pazoles, C.J., Creutz, C.E., Ramu, A., Strott, C.A., Ray, P., Brown, E.M., Aurbach, G.D., Tack-Goldman, K.M., y Shulman, N.R.: A role for anion transport in the regulation of release from chromaffin granules and exocytosis from cells. *J. Supramol. Struct.* 7: 277, 1977.
118. Pollard, H.B., Pazoles, C.J., Creutz, C.E., y Zinder, O.: The chromaffin granules and possible mechanism of exocytosis. *Int. Rev. Cytol.* 58: 159, 1981.
119. Ornberg, R.L., y Reese, T.S.: Beginning of exocytosis captured by rapid-freezing of limulus amoebocytes. *J. Cell Biol.* 90: 40-54, 1981.
120. Vander Meulen, J., y Grinstein, S.: Ca²⁺-induced lysis of platelet secretory granules. *J. Biol. Chem.* 257: 5190-5195, 1982.
121. Peter, S.: Ultrastructural studies on the secretory process in the apithelioid cells of the juxtaglomerular apparatus. *Cell Tissue Res.* 168: 45, 1976.
122. Ryan, G.B., Alcorn, D., Coghlan, J.P., Hill, P.A., y Jacobs, R.: Ultrastructural morphology of granule release from juxtaglomerular myoepithelioid and peripolar cells. *Kidney Int.* 22 [Suppl 12]: S3-S8, 1982.
123. Zavagli, G., Aleotti, A., y Farinelli, A.: Human renin granules: ultrastructural aspects. *Nephron.* 33: 29-33, 1983.
124. Kurtz, A., Bruna, R.D., Pfeilschifter, J., Taugner, C., y Bauer, C.: Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 4769-4773, 1986.
125. Bondeson, J., Wijkander, J., y Sundler, R.: Proton-induced membrane fusion role of phospholipid composition and protein-mediated intermembrane contact. *Biochem. Biophys. Acta.* 777: 21-27, 1984.
126. Lee, J.C., Hurley, S., y Hopper, J.: Secretory activity of the juxtaglomerular granular cells of the mouse. *Lab. Invest.* 15: 1459, 1966.
127. Thurau K., y Levine D.Z.: The renal circulation. En: Rouiller C, Muller A.F., (eds) *The Kidney.* Academic Press, New York 3: 1, 1971.
128. Baumbach, L., y Leyssac, P.P.: Studies on the mechanism of renin release from isolated perfused rat glomeruli: effects of calcium, calcium ionophore and lanthanum. *J. Physiol (Lond)* 273: 745-764, 1977.
129. Fray, J.C.S., Lush, D.J., Share, D.S., y Valentine, A.N.D.: Possible role of calmodulin in renin secretion from isolated

kidneys and renal cells: studies with trifluoperazine. *J. Physiol (Lond)* 343: 447-454, 1983.

130. Yamamoto, K., e Ikemoto, F.: High molecular weight renin and renin binding protein. *Trends. Pharmacol Sci.* 4: 381, 1983.

131. Takahashi, S., Miura, R., y Miyake, Y.: A study on renin binding protein (RnBP) in the human kidney. *J. Biochem.* 97: 671, 1985.

132. Murakami, K., Takahashi, S., Suzuki, F., Hirose, S., e Inagami, T.: Intermediate molecular weight renin and renin-binding protein(s) in the dog kidney. *Biomed. Res.* 1: 392, 1980.

133. Ikemoto, F., Takaori, K., Iwao, H., y Yamamoto, K.: Intrarenal localization of renin binding substance in rats. *Life Sci.* 31: 1011-1016, 1982.

134. Ueno, N., Miyazaki, H., Hirose, S., y Murakami, K.: A 56,000-dalton renin-binding protein in dog kidney is an endogenous renin-inhibitor. *J. Biol. Chem.* 256: 12023-12027, 1981.

135. Mannisto, P.T., y Poisner, A.M.: Further studies on properties of renin granules isolated from rat kidney cortex. *Acta Physiol. Scand.* 112: 365-371, 1981.

136. Sagnella, G.A., Peart, W.S.: Studies on the isolation and properties of renin granules from the rat kidney cortex. *Biochem. J.* 182: 301, 1979.

137. Funakawa, S., Higashio, T., y Yamamoto, K.: Renin release from renin granules in the dog. *Clin. Sci. Mol. Med.* 55: 11, 1987.

138. Sigmon, D.H., y Fray J.C.S.: Renin release from renin granules. *Physiologist* 28: 268, 1985.

139. Hasilik A., Neufeld, E.F.: Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 255: 4937-4945, 1980.

140. Kerchak, H.M., Eisenstat, B.A., Hoffstein, S.T., Dunham, P.B., y Weissmann, G.: Anion channel blockers inhibit lysosomal enzyme secretion from human neutrophils without affecting generation of superoxide anion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2721-2725, 1980.

141. Naccache, P.H., Showell, H.J., Backer, E.L., y Sha'afi, R.I.: Changes in ionic movements across rabbit polymorphonuclear leukocyte membranes during lysosomal enzyme release. Possible ionic basis for lysosomal enzyme release. *J. Cell Biol.* 75: 635-649, 1977.

142. Fynn, M., Onomakpome, N., y Peart, W.S.: The effects of

ionophores (A23187 and RO2-2985) on renin secretion and renal vasoconstriction. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* 199: 199, 1977.

143. Rodbell, N.: The role of hormone receptors in GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284: 17-22, 1980.

144. García-Sainz, J.A. "Inhibitory" receptors and ion channel effectors. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 271-272, 1988.

145. Allende, J. E.: GTP-mediated macromolecular interactions: the common features of different systems *FASEB J.* 2: 2356-2367, 1988.

146. Neer, E.J. y Clapham, D. E.: Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333: 130-134, 1988.

147. Brown, A.M. y Birnbaumer, L.: Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.* 254: H401-H410, 1988.

148. Gilman, A.G.: G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649, 1987.

149. Birnbaumer, L., Codina J., Mattera, R., Yatani, A., Scherer, N., Toro, M.J., Brown, A.: Signal transduction by G proteins. *Kidney Int.* 32 (supl. 23): S-14-S37, 1987.

150. Dparil, S., y Harber, E.: The renin angiotensin system (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 291: 389-401, 1974.

151. Peach, M.J.: Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol. Rev.* 57: 313-370, 1977.

152. Reid, I.A., Morris, B.J. y Ganong, W.F.: The renin angiotensin system. *Ann. Rev. Physiol.* 40: 377-410, 1978.

153. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Levine, M., Lentz, K.E., y Kahn, J.R.: The biochemistry of the renin angiotensin system. En Johanson, J. A. y Anderson, R.R.; *The renin angiotensin system*. Plenum, New York pp. 1-27 1980.

154. Lee, M.R.: The renin/angiotensin system. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 12: 605-612, 1981.

155. Ondetti, M.A. y Cushman, D.W.: Enzymes of the renin angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 283-308, 1982.

156. Hsueh, W.A.: Components of the renin system. *Am. J. Nephrol.* 3: 109-117, 1983.

157. Haber, E. y Carlson, W.: The biochemistry of the renin-angiotensin system. En: Genest, J., Kuchel, D., Hamet, P. y Cantin, M.: *Hypertension*. McGraw Hill, New York pp. 171, 1983.

158. Re, R.N.: Cellular biology of the renin-angiotensin systems.

Arch. Intern. Med. 144: 2037-2041, 1984.

159. Reid, I.A.: The renin-angiotensin system and body function. Arch. Intern. Med. 145: 1475-1479, 1985.

160. Ballerman, B.J., Levenson, D.J. y Brenner, B.M.: Renin, angiotensin, kinins, prostaglandins, and leukotrienes. En: Brenner, B.M. y Rector, F.C.J.; The kidney. W.B. Saunders, Philadelphia pp. 281-333, 1986.

161. Hall, J.E., Mizelle, H.L. y Woods, L.L.: The renin angiotensin system and long-term regulation of arterial pressure. J. Hypertens. 4: 387-397, 1986.

162. Re, R.N.: The renin-angiotensin systems. Med. Clin. North Am. 71: 877-895, 1987.

163. Cantin, M.: Morphopathology of the renin-angiotensin system. En: Genest, J., Kuchel, D., Hamet, P. y Cantin, M.: Hypertension McGraw Hill, New York pp. 280 1983.

164. Taugner, R., Bürle, C.P., Hackental, E., Mannek, E., y Nibiling, R.: Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanism. Contrib. Nephrol. 43: 76-101, 1984.

165. Barajas, L.: Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system. Lab. Invest. 54: 361-364, 1986.

166. Lindop, G.B.M. y Gardiner, D.S.: La Cellule humaine sécrétice de rénine. Ann. Endocrinol. 47: 133-144, 1986.

167. Vander, A. J.: Control of renin release. Physiol. Rev. 47: 359-382, 1967.

168. Davis, J.O.: The control of renin release. Am. J. Med. 55: 333-350, 1973.

169. Zanchetti, A., Stella, A., Leonetti, G., Morganti, A., y Terzoli, L.: Control of renin release: a review of experimental evidence and clinical implications. Am. J. Cardiol. 37: 675-691, 1976.

170. Davis, J.O. y Freeman, R.H.: Mechanisms regulating renin release. Physiol. Rev. 56: 1-56, 1976.

171. Peart, W.S.: Intra-renal factors in renin release. Contrib. Nephrol. 12: 5-15, 1978.

172. Fray, J.C.S.: Stimulus secretion coupling of renin: role of hemodynamics and other factors. Circ. Res. 47: 485-492, 1980.

173. Zehr, J.E.: Mechanisms controlling renin release. Adv. Exp. Med. Biol. 130: 135-170, 1980.

174. Keeton, T.K. y Campbell, W.B.: The pharmacological alterations of renin release. *Pharmacol. Rev.* 31: 81-227, 1981.
175. Freeman, R.H. y Davis, J.D.: Factors controlling renin secretion and metabolism. En: Genest, J.; Kuchel, D., Hamet, P. y Cantin, M.; *Hypertension* McGraw Hill. New York pp. 225-250, 1983.
176. Holdaas, H.: Adrenergic control of renin release. *J. Oslo City Hosp.* 33: 109-127, 1983.
177. Fray, J.C.S. y Lush, D.J.: Stretch receptor hypothesis for renin secretion: the role of calcium. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 19-23, 1984.
178. Davis, J.A. y Freeman, R.H.: Renin release mechanisms in congestive heart failure. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 89, 1984.
179. Thames, M.D.: Renin release: reflex control and adrenergic mechanisms. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 57-66, 1984.
180. Kotchen, T.A., Welch, W.J. y Ott, C.E.: The renal tubular signal for renin release. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 35-42, 1984.
181. Gibbons, G.H., Dzau, V.J., Farhi, E.R., Barger, A.C.: Interactions of signals influencing renin release. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 291-308, 1984.
182. Zehr, J.E.: Control of renin by reflex mechanisms in man and experimental animals. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 49-56, 1984.
183. Stella, A. y Zanchetti, A.: Neural control of renin secretion. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 83, 1984.
184. Itoh, S. y Carretero, O.A.: Role of the macula densa in renin release. *Hypertension* 7 (supl. 1): I-49-I-54, 1985.
185. Hackenthal, E.: La sécrétion de la renine. Mécanismes et effecteurs. *Ann. Endocrinol.* 47: 145-155, 1986.
186. Van Zwieten, P.A. y De Jonge, A.: Interaction between the adrenergic and renin-angiotensin-aldosterone-systems. *Postgrad. Med. J.*, 62 (supl. 1): 23-27, 1986.
187. Briggs, J.P. y Schnermann, J.: macula densa control of renin secretion and glomerular vascular tone: evidence for common cellular mechanisms. *Renal. Physiol.* 9: 193-203, 1986.
188. Kotchen, T.A., Welch, W.J., Lorenz, J.N., y Ott, C.E.: Renal tubular chloride and renin release. *J. Lab. Clin. Med.* 110: 534-550, 1987.
189. Skott, O. y Briggs, J.P.: Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237: 1618-1620, 1987.

190. Bohole, A., Christensen, J., Meyer, D.S., Laberke, H.G., Straus, M.: Juxtaglomerular apparatus in human kidney: correlation between structure and function. *Kidney Int.* 22 (supl. 12): S18-S23, 1982.
191. Kurtz, A., Pfeilschifter, J. y Bauer, C.: Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 359-366, 1984.
192. Pfeilschifter, J., Kurtz, A. y Bauer, C.: Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 903-910, 1985.
193. Kurtz, A., Pfeilschifter, J., Huffer, A., Bärle, C.P., Nobiling, R., Taugner, R., Hackenthal, E., y Bauer, C.: Role of protein kinase C in the inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am. J. Physiol.* 250: C563-C571, 1986.
194. Kurtz, A.: Transmembrane signalling of atrial natriuretic peptide in rat renal juxtaglomerular cells. *Klin. Wochenschr.* 64 (supl VI): 37-41, 1986.
195. Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., y Bauer, Ch.: Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* 33: 798-803, 1988.
196. Kurtz, A., Della Bruna, R. y Köhn, K.: Cyclosporina A enhances renin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 33: 947-953, 1988.
197. Pinet, F., Corvol, M., Dench, F., Bourguignon, J., Feuteun, J., Menard, J., Corvol, P.: Isolation of renin-producing human cells by transfection with three simian virus 40 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8503-8507, 1985.
198. Pinet, F., Mizrahi, J., Menard, J., Corvol, P.: Role of cyclic AMP in renin secretion by human transfected juxtaglomerular cells. *J. Hypertens.* 4 (supl. 6): S421-S423, 1986.
199. Pinet, F., Mizrahi, J., Laboulandine, I., Menard, J., y Corvol, P.: Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells. *J. Clin. Invest.* 80: 724-731, 1987.
200. Hackenthal, E., Schwertschlag, U. y Taugner, R.: Cellular mechanisms of renin secretion. *Clin. Exp. Hypertens. Part. A Theory. Pract.* 5: 975-993, 1983.
201. Churchill, P.C.: Second messengers in renin secretion. *Am. J. Physiol.*, 249: F175-F184, 1985.
202. Kurtz, A.: Intracellular control of renin release. *An*

overview. *Klin. Wochenschr.* 64: 838-846, 1986.

203. Hackenthal, E. y Taugner, R.: Hormonal signals and intracellular messengers for renin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 47: 1-12, 1986.

204. Fishman, M.C.: Membrane potential of juxtaglomerular cells. *Nature* 260: 542, 1976.

205. Böhrlé, C.P., Nobiling, R. y Taugner, R.: Intracellular recordings from renin positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am. J. Physiol.* 249: F272-F281, 1985.

206. Taugner, R., Bole, C.P., Hackenthal, E., y Nobiling, R.: Typical and atypical aspects of renin secretion from juxtaglomerular epithelioid cells. *Klin. Wochenschr.* 64: 829-837, 1986.

207. Borle, A.B. y Snowdowne, K.W.: Measurement of intracellular free calcium in monkey kidney cells with aequorin. *Science* 217: 252-254, 1982.

208. Park, C.S., Honeyman, T.W., Chung, E.S., Lee, J.S., Sigmon, D.H., y Fray, J.C.S.: Involvement of calmodulin in mediating inhibitory action of intracellular Ca^{2+} on renin secretion. *Am. J. Physiol.* 251: F1055-F1062, 1986.

209. Fray, J.C.S., Lush, D.J. y Park, C.S.: Interrelationship of blood flow, juxtaglomerular cells, and hypertension: role of physical equilibrium and Ca. *Am. J. Physiol.* 251: R643-R662, 1986.

210. Fray, J.C.S.: Stimulation of renin release in perfused kidney by low calcium and high magnesium. *Am. J. Physiol.* 232: F377-F382, 1977.

211. Fray, J.C.S. y Park, C.S.: Influence of potassium, sodium, perfusion pressure and isoprenaline on renin release induced by calcium deprivation. *J. Physiol. [Lond]* 292: 363-372, 1979.

212. Harada, E. y Rubin, R.P.: Stimulation of renin secretion and calcium efflux from the isolated perfused cat kidney by norepinephrine after calcium deprivation. *J. Physiol. [Lond]* 247: 367-379, 1978.

213. Kisch, E.S., Dluhy, R.B. y Williams, G.H.: Regulation of renin release by calcium and ammonium ions in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 1343-1350, 1976.

214. Kotchen, T.A., Maull, K.J., Luke, R.G.: Effect of calcium gluconate infusion on renin in the dog. *J. Lab. Clin. Med.* 89: 181-189, 1977.

215. Watkins, B. E., Davis, J.O., Lohmeir, T.E., y Freeman, R.H.: Intrarenal site of action of calcium on renin secretion in dogs.

Circ. Res. 39: B47-B53, 1976.

216. Johns, D. W., Carey, R.M., Gomez, A., Lynch, K., Inagami, T., Saye, J., Geary, K., Fansworth, D.E., y Peach, M.: Isolation of renin-rich rat kidney cells. Hypertension 10: 488-496, 1987.

217. Skott, O.: Calcium and osmotic stimulation in renin release from isolated rat glomeruli. Pflugers Arch. 403: 485-491, 1986.

218. 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.

219. Churchill, M. C., Churchill, P.C. y McDonald, F. D.: Comparison of the effects of rubidian and potassium on renin secretion from rat kidney slices. Endocrinology 112: 777-781, 1983.

220. 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.

221. Churchill, P.C. y Churchill, M.C.: Vanadate inhibits renin secretion from rat kidney slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213: 144-149, 1980.

222. 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.

223. Churchill, P.C. y Churchill, M.C.: Effects of trifluoperazine on renin secretion of rat kidney slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 224: 68-72, 1983.

224. Churchill, P.C., Churchill, M.C. y McDonald, F.D.: Quinacrine antagonizes the effects of Na, K-ATPase inhibitors on renal prostaglandin E-2 release but not their effects on renin secretion. Life Sci. 36: 277-282, 1985.

225. 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.

226. Churchill, P.C., Savoy-Moore, R.T. y Churchill, M.C.: Lack of relationship between prostaglandin E-2 release and renin secretion in rat renal cortical slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226: 46-49, 1983.

227. Lyons, H.J. y Churchill, P.C.: The influence of ouabain on *in vitro* renin secretion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1148-1150, 1974.

228. Park, C.S., 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.
229. Park, C.S. y Malvin, R.L.: Calcium in the control of renin release. Am. J. Physiol. 235: F22-F25, 1978.
230. Fray, J.C.S.: Mechanism by which renin secretion from perfused kidneys is stimulated by isoprenaline and inhibited by high perfusion pressure. J. Physiol. (Lond), 308: 1-13, 1980.
231. López-Novoa, J.M., García, J.C., Cruz-Soto, M.A., Benabe, J.E., Martínez-Maldonado, M.: Effect of sodium orthovanadate on renal renin secretion in vivo. J. Pharmacol. Exp. Ther. 222: 447-451, 1982.
232. Sundet, W.D., Wang, B., Hakumaki, M., y Goetz, K.: Cardiovascular and renin responses to vanadate in the conscious dog: attenuation after calcium channel blockade. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175: 185-190, 1984.
233. Churchill, P.C. y Churchill, M. C.: Biphasic effect of extracellular [K] on isoproterenol-stimulated renin secretion from rat kidney slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 214: 541-545, 1980.
234. Churchill, P.C. y Churchill, M. C.: Inhibition of in vitro renin release by low extracellular K. Life Sci. 25: 687-692, 1979.
235. Migdal, S.C., Slick, G., Abu-Hadman, D., y Mc Donald, F.: Phenytoin, renal function and renin release. J. Pharmacol. Exp. Ther., 215: 304-308, 1980.
236. O'Neal, S. G., Rhodas, D.B. y Rador, E.: Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium-ATPases and other ATPases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89: 845-850, 1979.
237. Matsumara, Y., Miyawaki, N. y Morimoto, S.: Effects of W-7 and W-5 on renin release from rat kidney cortical slices. Jpn. J. Pharmacol. 36: 268-271, 1984.
238. Antonipillai, I. y Horton, R.: Role of extra- and intracellular calcium and calmodulin in renin release from rat kidney. Endocrinology 117: 601-606, 1985.
239. Shinyama, H.: Renin release in anesthetized rats is enhanced by the calmodulin antagonist W-7. Life. Sci. 40: 1687-1694, 1987.
240. Kawamura, M. e Inagami, T.: Calmodulin antagonist stimulate renin release from isolated rat glomeruli. Endocrinology 112: 1857-1859, 1983.
241. Schwertschlag, U. y Hackenthal, E.: Trifluoperazine antagonizes inhibition of renin release by angiotensin II. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 10: 605-608, 1983.
242. Kamp, T.J., y Miller, R.J.: Voltaje-sensitive calcium

channels and calcium antagonist. ISI Atlas of Science: Pharmacology 1: 133-138, 1987.

243. Hofmann, F.: Regulation of the L-type calcium channel. Trends Pharmacol. Sci. 8: 393-398, 1987.

244. Carafoli, E.: Intracellular calcium homeostasis. Ann. Rev. Biochem. 56: 395-433, 1987.

245. Fray, J.C.S.: Stretch receptor control of renin release in perfused rat kidney: effect of high perfusate potassium. J. Physiol. [Lond] 282: 207-217, 1978.

246. Baxter, C.R., Lazzaro, V., Duggin, G.G., Horvath, J.S., y Tiller, D.J.: Stimulation of renin secretion by 8- (N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxy-benzoate (TMB-8). Biochem. Pharmacol. 34: 1523-1527, 1985.

247. Naftilan, A.J. y Oparil, S.: The role of calcium in the control of renin release. Hypertension, 4: 670-675, 1982.

248. Churchill, P.C.: Effect of D-600 on inhibition of *in vitro* renin release in the rat by high extracellular potassium an angiotensin II. J. Physiol. [Lond], 304: 449-458, 1980.

249. 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.

250. Churchill, P.C. y Churchill, M.C.: A-1 and A-2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 589-594, 1985.

251. Churchill, P.C. y Churchill, M.C.: Ca-dependance of the inhibitory effect of K-depolarization on renin secretion from rat kidney slices. Arch Int. Pharmacodyn. Ther. 258: 300-312, 1982.

252. Churchill, P.C. McDonald, F.D. y Churchill, M.C.: Effect of diltiazem, a calcium antagonist on renin secretion from rat kidney slices. Life Sci., 29: 383-389, 1981.

253. Fray, J.C.S. y Park, C.S.: Forskolin and calcium interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney. J. Physiol. (Lond.), 375: 362-375, 1986.

254. Anderson, D.K.: Cell potential and the sodium-potassium pump in vascular smooth muscle. Fed. Proc. 35: 1294-1297, 1976.

255. Churchill, P.C., y McDonald, F.D.: Effect of ouabain on renin secretion in anesthetized dogs. J. Physiol. (Lond) 635-646, 1974.

256. Tamaki, T., Fukui, K., Shoji, F., Iwao, H., Okahara, T. y Abe, Y.: Effects of ouabain on autoregulation of renal blood flow

in dogs. *Am. J. Physiol.* 250: F109-F114, 1986.

257. Churchill, P.C. y Churchill, M.C.: Bay K 8644, a calcium channel agonist, inhibits renin secretion *in vitro*. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 285: 87-97, 1987.

258. Matsumura, Y., Sasaki, Y., Shinyama, H., y Morimoto, S.: The calcium channel agonist Bay K 8644 inhibits renin release from rat kidney cortical slices. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 369-372, 1985.

259. Nay, C.N. y Peart, W.S.: Stimulation and suppression of renin release from incubations of rat renal cortex by factors affecting calcium flux. *Br. J. Pharmacol.* 89: 173-182, 1986.

260. Matsumura, Y., Uriu, T., Shinyama, H., Sasaki, Y., y Morimoto, S.: inhibitory effects of calcium channel agonists on renin release from rat kidney cortical slices, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 1000-1005, 1987.

261. Dietz, J. R.: Effects of calcium channel agonist on renin release from perfused kidneys. *Renal Physiol.* 9: 279-286, 1986.

262. Henrich, W.L. y Campbell, W.B.: Importance of calcium in renal renin release. *Am. J. Physiol.* 251: E98-E103, 1986.

263. Matsumura, T., Miyawaki, N., Sasaki, Y., y Morimoto, S.: Inhibitory effects of norepinephrine, methoxamine, and phenylephrine on renin release from rat kidney cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: 782-787, 1985.

264. Vandogen, R.: Inhibition of renin secretion in the isolated rat kidney by antidiuretic hormone. *Clin. Sci.* 49: 73-76, 1975.

265. Reid, I.A., Gregory, L.C. y Schuartz, J.: Mechanism of suppression of renin secretion by vasopressin. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 135-140, 1984.

266. Vandogen, R. y Peart, W.S.: Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 50: 125-129, 1974.

267. Opgenorth, T.J. y Zeher, J.E.: Role of calcium in the interaction of alpha and beta adrenoceptor-mediated renin release in isolated, constant pressure perfused rabbit kidneys. *J. Pharmacol. Exp Ther.* 227: 144-149, 1983.

268. Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159-193, 1987.

269. Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *ISI Atlas of Science: Pharmacology* 1: 91, 1987.

270. Exton, J.H.: Calcium signaling in cell-molecular mechanisms. *Kidney Int.* 32 (supl. 23): S-68-S-76, 1987.
271. Exton, J.: Mechanisms of action of calcium mobilizing agonist some variations on a young theme. *FASEB J* 2: 2670-2676, 1988.
272. Rasmussen, H.: Inositol lipids: integration of cellular signalling systems. En: Putney, J.W. Jr.: *Phosphoinositides and receptor mechanisms, Receptor Biochemistry & methodology*, 7: Alan R. Liss Inc. New York pp. 109-147, 1986.
273. Garcia-Sainz, J.A.: Effect of pertussis toxin on the hormonal Editado por Ronald D Sekura, Joel Moss y Martha Vaughan, Academic Press Inc. pp. 205-223, 1985.
274. Fain, J.N., Michel, A., Wallace, Y., y Wojcikiewicz R.J.H.: Evidence for involvement of guanine nucleotide binding regulatory proteins in the activation of phospholipases by hormones. *FASEB J* 2: 2569-2574, 1988.
275. Exton, J.H.: Role of calcium and phosphoinositides in the actions of certain hormones and neurotransmitters. *J. Clin. Invest.* 75: 1735-1757, 1985.
276. Berridge, M.J.: The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Am.* 253: 142-145, 1985.
277. Exton, J.M.: Mechanisms involved in the alpha-adrenergic phenomena. *Am. J. Physiol.* 248: E633-E647, 1985.
278. Berridge, M.J. y Irvine, R.F.: Inositol triphosphate: a novel second messenger in signal transduction. *Nature* 312: 315, 1984.
279. Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360, 1984.
280. Thévenod, Streb, K., Ullrich, K., y Shulz, I.: Inositol 1,4,5-triphosphate release Calcium from a nonmitochondrial store site in permeabilized rat cortical kidney cells. *Kidney Int.* 29: 695-702, 1986.
281. Rasmussen, H. y Barret, P.Q.: Calcium messenger system. An integrated view. *Physiol. Rev.* 64: 938-984, 1984.
282. Takai, Y., Kishimoto, A., Kawahara, Y., Minakuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Mori, T., Yu, B., Kaibuchi, K., y Nishizuka, Y.: Calcium and phosphatidylinositol turnover as signalling for transmembrane control of protein phosphorylation. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14: 301-313, 1981.
283. Takai, Y., Kikkawa, U., Kaibuchi, U., y Nishizuka, Y.: Membrane phospholipid metabolism and signal transduction for protein phosphorylation. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 18: 119-158,

1984.

284. Churchill, P.C. y Churchill, M.C.: 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate inhibits renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Hypertens.* 2: 25-28, 1984.
285. Schwertschlag, U., Scherf, H., Gerber J., Mathias, M., y Nies, A.: L-platelet activating factor induces changes on renal vascular resistance, vascular reactivity, and renin release in the isolated perfused rat kidney. *Cir. Res.* 60: 534-539, 1987.
286. Antonipillai, I., Nadler, J., Robin, E., y Horton, R.: The inhibitory role of 12- and 15-lipoxygenase products on renin release. *Hypertension* 10: 61-66, 1987.
287. Antonipillai, I., Nadler, J., y Horton, R.: Angiotensin feedback inhibition on renin is expressed via lipoxygenase pathway. *Endocrinology* 122: 1277-1281, 1988.
288. Seamon, K.B.: Forskolin and adenylate cyclase. *ISI Atlas of Sciences: Pharmacology* 1: 250, 1987.
289. Milavec-Krizman, M., Evenou J.P., Wagner, H., Berthold, R., y Stoll A. P. : Characterization of beta-adrenoceptor subtypes in rat kidney with new highly selective beta-1 blockers and their role in renin release. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3951-3957, 1985.
290. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre-González, M., Peña, J.C., y García-Sainz, J.A.: Effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. *Life Sci.* 35: 1683-1689, 1984.
291. Pedraza-Chaverri, J., Alatorre González, M., Peña, J.C., y García-Sainz, J.A.: Pertussis toxin enhances the beta-adrenergic and blocks the alpha 2-adrenergic regulation of renin secretion in renal cortical slices. *Life Sci.* 38: 1005-1011, 1986.
292. Lohsiriwat, S. y Malvin, R.L.: Prostaglandin biosynthesis does not participate in isoproterenol-induced renin release. *Life Sci.* 34: 1867-1862, 1984.
293. Satoh, H.: Responses of juxtaglomerular cell suspensions to various stimuli. *Hypertension*, 3: 157, 1981.
294. Khayat, A., Gonda, S., Sen, S., y Smeby, R.R.: Responses of juxtaglomerular cell suspensions to various stimuli. *Hypertension* 3: 157-167, 1981.
295. Drury, P.L., Williams, B., Edwards, Oddie, C.J. y Horne, B.: Development and application of a superfusion technique for the study of renin secretion in rat renal cortical cells. *Clin. Sci.* 71: 581-587, 1986.
296. O'Dea, R.F., Hansen, J.A. y Mirkin, B.L.: Effect of calcium, sodium and isoproterenol on renin secretion from disaggregated

- rat renal cortical cells. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 46: 187-205, 1984.
297. López, G.A., Reid, J.C., Rose, J.C., y Ganong, W.F.: Effect of norepinephrine on renin release and the cyclic AMP content of rat kidney slices: modification by sodium deficiency and alpha-adrenergic blockade. Neuroendocrinology 27: 63-73, 1978.
298. Weber, F., Brodde, E., Anlauf, M., y Bock, K.D.: Subclassification of human beta-adrenergic receptors mediating renin release. Clin. Exp. Hypertens. [A], 5: 225-238, 1983.
299. Bierwaltes, W. H., Schyver, S., Olson, P.S. y Romero, J.C.: Control of renin release in isolated rat glomeruli. Hypertension 3(supl.II) 11-30-11-34, 1981.
300. Williams, B.C., Duncan, F.M., Drury, P.L., y Train, L.M.C.: Dopamine stimulates renin release in isolated renal cortical cells by activation of specific dopaminergic receptors. J. Hypertens. 1 (supl. 2): 177-179, 1983.
301. Sowers, J.R.: Dopamine regulation of renin and aldosterone secretion: a review. J. Hypertens. 2 (supl. 1): 67, 1984.
302. Langard, D., Holdaas, H., Kill, I., y Kill, F.: Conditions for augmentation of renin release by theophylline. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43: 9-14, 1983.
303. López, G.A., Romano, F., Aletich, V., y Lissuzzo, L.: Cyclic adenosine 3': 5' monophosphate mediation of the effects of dopamine on renin release by renal cortical slices from sodium deficient rats: modification by dopaminergic and beta-adrenergic receptor blockade. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 162: 471-479, 1979.
304. López, G.A., Mottel, S., Rao, V., y Shepard, B.: Further evidence for cyclic-AMP mediation of the stimulatory effect of dopamine on renin release in vitro. Fed. Proc. 39: 980, 1980.
305. Schwertschlag, U. y Hackenthal, E.: Histamine stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. Naunyn Schmiedbergs Arch. Pharmacol. 319: 239-242, 1982.
306. Churchill, P.C. y Bidani, A.: Renal effects of selective adenosine receptor agonist in anesthetized rats. Am. J. Physiol. 252: F299-F303, 1987.
307. Murray, R.D. y Churchill, P.C.: Concentration dependency of the renal vascular and renin secretory responses to adenosine receptor agonist. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 189-193, 1985.
308. Bierwaltes, W.H., Schryver, S., Sanders, E., Strand, J., y Romero, V.C.: Renin release selectively stimulated by prostaglandin I-2 in isolated rat glomeruli. Am. J. Physiol. 243: F276-F282, 1982.

309. Freeman, R.H., Davis, J. O. y Villareal, D.: Role of renal prostaglandins in the control of renin release. *Circ. Res.* 54: 1-9, 1984.
310. Freeman, R.H., Davis, J., Sweet, W., y Jari, R.: Prostaglandins and the control of renin secretion. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 43-48, 1984.
311. Odhe, H., Ogihara, T., Nakamaru, M., Higaki, J., Gotoh, S., Masuo, K., Ohtsuka, A., y Kamahara, Y.: Effect of prostacyclin infusion on active and inactive renin release in the isolated perfused kidney. *Life. Sci.* 31: 3031-3035, 1982.
312. López, G.A., Khalighi, K., Ebneshahid, A., González, E., Jaramillo, S., y Rivas, S.: Dietary sodium deficiency potentiates the effect of prostaglandin E-2 on *in vitro* renin release in the rat. *Prostaglandins Leukotrienes Med.* 19: 105-113, 1985.
313. Vandogen, R., Peart, W.S. y Boyd, G.W.: Adrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney. *Circ. Res.* 32: 290-296, 1973.
314. Ueda, J., Nakanishi, H. y Abe, Y.: Effect of glucagon on renin secretion in the dog. *Eur. J. Pharmacol.* 52: 85-92, 1978.
315. Powell, H.R., McCredie, D.A. y Rotenberg, E.: Renin release by parathyroid hormone in the dog. *Endocrinology* 103: 985-989, 1978.
316. Smith, J.M. Moun, D.R. y Vander, A. J.: Effect of parathyroid hormone on plasma renin activity and sodium excretion. *Am. J. Physiol.* 236: F311-F319, 1979.
317. Schwertschlag, U. y Hackenthal, E.: Forskolin stimulates renin release from the isolated perfused kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 84: 111-113, 1982.
318. Park, C.B., Sigmon, D.H., Han, S.D., Honeyman, T.W. y Fray, J.C.S.: Control of renin secretion by Ca²⁺ and cyclic AMP through two parallel mechanisms. *Am. J. Physiol.* 251: R531-R536, 1986.
319. Deray, G., Branch, R., Herzer, W., Ohnishi, A., y Jackson, E.: Adenosine inhibits beta-adrenoceptor but not DBcAMP-induced renin release. *Am. J. Physiol.* 252: F46-F52, 1987.
320. Bondar, N.: Mechanism on canine renal release. *J. Physiol.* [Lond], 355: 33-41, 1984.
321. Michelakis, A.M., Claudie, J. y Liddle, G.W.: *In vitro* stimulation of renin production by epinephrine, norepinephrine, and cyclic AMP. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 748-753, 1969.
322. Saruta, T. y Matsuki, S.: The effect of cyclic AMP, theophylline, angiotensin II and electrolytes upon renin release from rat kidney slices. *Endocrinol. Jpn.* 22: 137-140, 1975.

323. Peart, W.S. Quesada, T. y Teng, I.: The effect of adenosine 3',5' monophosphate and guanosine 3',5' monophosphate and theophylline on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 54: 55-60, 1975.

324. Viskoper, R.J., Maxwell, M.H., Lupu, A.N., y Rosenfield, S.: Renin stimulation by isoproterenol and theophylline in the isolated perfused kidney. *Am. J. Physiol.* 232: F248-F253, 1977.

325. Bierwaltes, W.H.: Prostaglandin independence of kinin-stimulated renin release. *Am. J. Physiol.* 252: F794, 1987.

326. Woodcock, E.A. y Johnston, C.I.: Inhibition of adenylate cyclase by angiotensin II in rat renal cortex. *Endocrinology* 111: 1687-1691, 1982.

327. Barchowsky, A., Data, J.L. y Whorton, A. R.: Inhibition of renin release by analogues of adenosine in rabbit renal cortical slices. *Hypertension* 9: 619-623, 1987.

328. Skoott, O., y Baumbach, L.: Effects of adenosine on renin release from isolated rat glomeruli and kidney slices. *Pflugers Arch.* 404: 232-237, 1985.

329. Rossi, N.F., Churchill, P.C. y Churchill M.C.: Pertussis toxin reverses adenosine receptor-mediated inhibition of renin secretion in rat renal cortical slices. *Life Sci.* 40: 481-487, 1987.

330. Smyth, D.D., Umemura, S., Yang, E., y Pettinger, W.: Inhibition of renin release by alpha-adrenoceptor stimulation in the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 140: 33-38, 1987.

331. Vandogen, R. y Greenwood, D.: The inhibition of renin secretion in the isolated rat kidney by clonidine hydrochloride. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2: 583-588, 1975.

332. Pettinger, W.A., Keeton, W.B., Campbell W.B., y Harper, D.C.: Evidence for a renal alpha-adrenergic receptor inhibiting renin release. *Circ. Res.* 38: 338-346, 1976.

333. Morris, B.J., Reid, I.A., y Ganong, W.F.: Inhibition by alpha-adrenoceptor agonist of renin release in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 59: 37-45, 1979.

334. Pedraza-Chaverri, J. Alatorre-González, M.C., Peña, J.C. y García-Sainz, J.A.: Pertussis toxin blocks the inhibition of renin secretion induced by clonidine in renal cortical slices. *Fed. Proc.*, 44: 673, 1985.

335. Hackenthal, E., Aktories, K. y Jakobs K.H.: Pertussis toxin attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction and inhibition of renin release. *Mol. Cell. Endocrinol.* 42: 113-117, 1985.

336. Hackenthal, E., Aktories, K., Jakobs, K.H., y Lang, R.E.: Neuropeptide Y inhibits renin release by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Am. J. Physiol.* 252: F543-F550, 1987.
337. Takemoto, K.: Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 5485-5489, 1982.
338. Kassis, S., Dlasmaa, M., Terenius, L., y Fishman, P.: Neuropeptide Y inhibits cardiac adenylate cyclase through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J. Biol. Chem.* 262: 3429-3431, 1987.
339. Pedraza-Chaverri, J., Ibarra-Rubio, M., Alatorre-González, J., Peña, J.C., y García-Sainz, J.: Pertussis toxin potentiates anesthesia-induced renin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 115-117, 1985.
340. Murad, F.: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. Invest.* 78: 1-5, 1986.
341. Leitman, D.C. y Murad, F.: Atrial natriuretic factor receptor heterogeneity and stimulation of particulate guanylate cyclase and cyclic GMP accumulation. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 16: 79, 1987.
342. Nishizuka, Y.: Calcium, Phospholipid turnover and transmembrane signalling. *Philos. Trans R. Soc. Lond. [Biol]* 302: 101-112, 1983.
343. Burnett, J.C. Jr., Granger, J.P. y Opengnorth, T.J.: Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am. J. Physiol.* 247: F863-F867, 1984.
344. Maack, T., Marion, D.N., Camargo, M.J.F., Kleinert, H.D., Laragh, J.H., Vaughan, E.D., y Atlas, S.A.: Effects of auricular (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am. J. Med.* 77: 1069-1075, 1984.
345. Freeman, R.H., Davis, J.D. y Vari, R.C.: Renal response to atrial natriuretic factor in conscious dogs with caval constriction. *Am. J. Physiol.* 248: R495-R499, 1985.
346. Volpe, M.: Effect of atrial natriuretic factor on blood pressure, renin, and aldosterone in Golblatt hypertension. *Hypertension* 7(supl.1): 1-43-1-48, 1985.
347. Seymour, A.A.: Comparison of synthetic rat and human atrial natriuretic factor in conscious dogs. *Hypertension* 8: 211-216, 1986.
348. García, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Hamet, P., Cantin, M., y Genest, J.: Effect of chronic infusion of synthetic atrial

natriuretic factor (ANF 8-33) in conscious two-kidney, one-clip hypertensive rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 178: 155-159, 1985.

349. Villarreal, D., Freeman, R., Davis, J., Kenneth, M., Vari, V., y Vari, R.: Renal mechanisms for suppression of renin secretion by atrial natriuretic factor. Hypertension 8(supl.11) 11-28-11-35, G 1986.

350. Obana, K., Naruse, M., Naruse, K., Sarukai, H., Demura, H., Inagami, T., y Shizume, K.: Synthetic rat atrial natriuretic factor inhibits *in vitro* and *in vivo* renin secretion in rats. Endocrinology 117: 1282-1285, 1985.

351. Takagi, M., Franco-Saenz, R., y Mulrow, P.: Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in a superfusion system of kidney slices and dispersed juxtaglomerular cells. Endocrinology 122: 1437-1442, 1988.

352. Henrich, W.L., Needleman, P. y Campbell, W.B.: Effect of atriopeptin III on renin release *in vitro*. Life Sci. 39: 993-1001, 1986.

353. Rodriguez-Puyol, D., Arriba, G., Blanchart, A., Santos, J., Caramelo, C., Fernández-Cruz, A., Hernando, L., y López-Novoa, J.: Lack of a direct regulatory effect of atrial natriuretic factor on prostaglandins and renin release by isolated rat glomeruli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 496-501, 1986.

354. Antonipillai, I., Vogelsang, J., y Horton, D.: Role of atrial natriuretic factor in renin release. Endocrinology 119: 318-322, 1986.

355. Deray, G., Branch, R., Herzer, W., Ohnishi, A., y Jackson, E.: Effects of atrial natriuretic factor on hormone-induced renin release. Hypertension 9: 513-517, 1987.

356. Itoh, S., Abe, K., Nushiro, N., Omata, K., Yasujima, M., y Yoshinaga, K.: Effect of atrial natriuretic factor on renin release in isolated afferent arterioles. Kidney Int. 32: 493-497, 1987.

357. Hiruma, M., Ikemoto, F. y Yamamoto, K.: Rat atrial natriuretic factor stimulates renin release from renal cortical slices. Eur. J. Pharmacol. 125: 151-153, 1986.

358. Anand-Srivastava, M.B., Srivastava, A.K. y Cantin, M.: Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 262: 4931-4934, 1987.

359. Phillis, J.W., y Wu, P.H.: Catecholamines and the sodium pump in excitable cells. Prog. Neurobiol. 17: 141, 1981.

360. Bolton, T.B.: Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol. Rev. 59: 606-718, 1979.

361. Scheid, C.R., Honeyman, T.W. y Fray, F.S.: Mechanism of beta adrenergic relaxation of smooth muscle. *Nature* 277: 32-36, 1973.
362. Scheid, C.R. y Fray, F.S.: Beta-adrenergic effects on transmembrane ^{45}Ca fluxes in isolated smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 246: C431-C438, 1984.
363. VanBreeem, C., Aaronson, P. y Loutzenhiser, R.: Sodium-calcium interactions in mammalian muscle. *Pharmacol. Rev.* 30: 167-208, 1979.
364. Laychock, S.G., Harada, E. y Rubin, R.P.: isoproterenol and nucleotide induced stimulation of calcium uptake by microsomal fractions from kidney and isolated glomeruli. *Biochem. Pharmacol.* 28: 3205-3211, 1979.
365. Logan, E.G., Tenyi, I., Peart, W.S., Breathnach, A.S. y Martin, B.G.H.: The effect of lanthanum on renin secretion and renal vasoconstriction. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* 195: 327-342, 1977.
366. Ganong, W.F., Porter, J., Bahnson, T., y Said, S.: Peptides and neurotransmitters that affect renin secretion. *J. Hypertens.* 2 (supl. 1): 75-82, 1984.
367. Porter, J.P., Said, S.I. y Ganong, W.F.: Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion *in vitro*: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells. *Neuroendocrinology* 36: 404-408, 1983.
368. Porter, J.P., Trasher, T.N., Said, S.I., y Ganong, W.F.: Vasoactive intestinal peptide in the regulation of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 249: F84-F89, 1985.
369. Lorens, S.A., y Van de Kar, L.D.: Differential effects of serotonin (5-HT 1A and 5-HT 2) agonists on renin and corticosterone secretion. *Neuroendocrinology* 45: 305-310, 1987.
370. Gotch, E., Murakami, K., Bahnson, T., y Ganong, W.: Role of brain serotonergic pathways and hypothalamus in regulation of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 253: R179-R185, 1987.
371. Cohen, A.J., Laurens, P. y Fray J.C.S.: Suppression of renin secretion by insulin: dependence of extracellular calcium. *Am. J. Physiol.* 254: E531-E534, 1983.