

11281
5
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**REGULACION DE LA EXPRESION DE RENINA Y
ANGIOTENSINOGENO EN EL SINDROME
NEFROTICO EXPERIMENTAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)**
PRESENTA
M. EN C. MARIA ELENA IBARRA RUBIO

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente, y de manera muy especial, al Dr. José Pedraza Chaverri, *maestro, tutor, compañero y ejemplo a seguir*, con quien he tenido el privilegio de compartir durante muchos años las, a veces difíciles, pero al fin satisfactorias, experiencias del caminar por el mundo de la ciencia, la academia y la docencia. Agradezco su enorme apoyo a lo largo de toda mi carrera profesional, factor definitivo para que yo alcanzara esta meta.

Particularmente a la Q.F.B. María Luisa Ibarra de Rojas (†) y familia, a la Sra. Martha Rubio y Arq. Jaime Herrasti, y a la Sra. María del Carmen Álvarez de Abascal, por su apoyo para la realización del presente trabajo.

A los integrantes del jurado y/o del comité tutorial, los Doctores Alejandra Mainero del Paso, Victoria Chagoya de Sánchez, Rebecca Franco y Bourland, Vicente Madrid Marina, Luis Felipe Jiménez García y Carlos Arámburo de la Hoz, por el valioso tiempo e interés brindados.

A la Dra. Julieta Rubio Lightbourn por sus valiosos consejos y por estar siempre cerca.

Al Dr. Ricardo Correa Rotter, Jefe del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", por su total apoyo para la realización del presente trabajo.

A Margarita Ramos Vázquez, quien ha sido una valiosa colaboradora en la realización del presente trabajo y un gran apoyo en los tiempos difíciles.

LA PRESENTE TESIS DE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN" BAJO LA DIRECCIÓN DEL DOCTOR JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI.

ESTA TESIS FUÉ APOYADA POR UN DONATIVO DEL CONSEJO
NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (1760-M9210) OTORGADO
A LA M. en C. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO.

RESUMEN

Objetivo: La concentración plasmática y la excreción urinaria de las proteínas del sistema renina-angiotensina están alteradas en ratas con síndrome nefrótico. En el presente trabajo se estudió la regulación de la expresión de renina y angiotensinógeno en el síndrome nefrótico agudo experimental.

Métodos: El síndrome nefrótico se indujo con una inyección subcutánea única de aminonucleósido de puromicina y las determinaciones se hicieron 6 días después. Por un lado, se analizó la excreción urinaria, la concentración plasmática y los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de angiotensinógeno en hígado y otros tejidos extrahepáticos como riñón, corazón, cerebro y glándula adrenal en ratas control, nefróticas y alimentadas a la par. Por otro lado, la concentración de renina total, activa e inactiva se analizó en plasma, orina y riñón en los mismos grupos experimentales, así como los niveles del ARNm de renina en riñón, hígado y cerebro. Los niveles de los ARNm se determinaron con la técnica de "slot blot".

Resultados: El síndrome nefrótico estuvo claramente establecido a los 6 días de la inyección del aminonucleósido de puromicina como se pudo demostrar por la presencia de hipoproteinemia, proteinuria, hipercolesterolemia y la retención de sodio. Aunque se observó una alta excreción urinaria de angiotensinógeno y su concentración plasmática se redujo a la mitad, los niveles hepáticos de su ARNm no cambiaron. Más aún, los niveles del ARNm de angiotensinógeno no cambiaron en ninguno de los tejidos extrahepáticos estudiados en el día 6. No se alteraron ni la proteína ni la expresión del gen de angiotensinógeno en las ratas alimentadas a la par. En plasma, la renina total no cambió y la renina activa aumentó en las ratas nefróticas con respecto a las alimentadas a la par y control, así como en el grupo alimentado a la par con respecto al control. En cambio, el porcentaje de la renina inactiva disminuyó en las ratas nefróticas con respecto a las alimentadas a la par y control, así como en el grupo alimentado a la par con respecto al control. El contenido renal de renina total, activa e inactiva no presentó cambios, y tanto la renina activa como la inactiva se excretaron en grandes cantidades por orina sin cambios en el porcentaje de prorenina con respecto a los grupos control y alimentado a la par. Los niveles del ARNm de renina no se alteraron en ninguno de los grupos experimentales en ninguno de los tejidos estudiados en el día 6. Los niveles renales del ARNm de renina y los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno se midieron en otro grupo de ratas en los días 1, 3, 5 y 7 después de la inyección del

aminonucleósido de puromicina. No se encontraron cambios en ninguno de estos dos ARNm a ninguno de los tiempos estudiados. En resumen, la disminución en la ingesta de alimento indujo cambios en la renina circulante, pero no afectó el angiotensinógeno. Tanto la renina como el angiotensinógeno circulantes y su excreción urinaria se encontraron profundamente alterados en el síndrome nefrótico agudo, sin embargo los niveles de sus ARNm no cambiaron.

Conclusiones: Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la expresión de los genes de renina y angiotensinógeno no se altera durante el desarrollo del síndrome nefrótico agudo inducido con aminonucleósido de puromicina, y que la regulación de los niveles plasmáticos de ambas proteínas se da a nivel traduccional o postraduccional en este modelo experimental.

S U M M A R Y

Objectives: Plasma concentration and urine excretion of the renin-angiotensin system proteins are altered in rats with nephrotic syndrome (NS). In the present work, the regulation of renin and angiotensinogen (Ao) expression in the experimental acute NS was studied.

Methods: NS was induced by a single injection of puromycin aminonucleoside (PAN) and determinations were made 6 days after PAN injection. On the one hand, Ao urine excretion and plasma concentration were analyzed, as well as its messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in liver and other extrahepatic tissues: kidney, heart, brain and adrenal gland from control (C), nephrotic, and pair-fed (PF) rats. On the other hand, total, active, and inactive renin concentrations were analyzed in plasma, urine and kidney from the same experimental groups, as well as renin mRNA levels in kidney, liver, and brain. mRNA levels were determined with the slot blot hybridization technique.

Results: Although a great urinary excretion and half than normal plasma levels of Ao were observed on day 6 after PAN-injection, when NS was clearly established, hepatic Ao mRNA levels did not change. Furthermore, the Ao mRNA levels did not change in any of the extrahepatic tissues studied on day 6. Ao protein and gene expression remained unchanged in PF rats. Plasma total renin did not change, and active renin increased in nephrotic rats with respect to PF and C groups and in PF rats with respect to C. In contrast, inactive renin percentage decreased in nephrotic rats with respect to PF and C groups, and in PF animals with respect to C. Total, active and inactive renal renin content did not change, and active and inactive renin were importantly excreted by urine with no changes in the prorenin percentage with respect to C and PF groups. In both experimental groups, renin mRNA levels did not change in any of the studied tissues on day 6. In another group of rats, kidney renin and liver Ao mRNA levels were measured on days 1, 3, 5, and 7 after PAN injection and no time-course changes in their expression were found. In summary, decreased food intake induced changes in circulating renin but did not affect circulating Ao. Plasma concentration and urinary excretion of renin and Ao were profoundly altered as well as their urinary excretion in acute NS, however, there were no changes in their mRNA levels.

Conclusions: The results obtained in the present work suggest that the Ao and renin gene expression is unaltered, and that the regulation of plasma levels of both proteins is at the translational or posttranslational level, during the development of the acute NS induced by PAN.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El concepto actual del sistema renina-angiotensina. <i>Revista de Investigación Clínica</i> 1993;45:165-177.....	2
2. Estructura y regulación del gen de angiotensinógeno. <i>Revista de Investigación Clínica</i> 1993;45:387-398.....	15
3. Renina: estructura y regulación del gen, biosíntesis y vías de secreción. <i>Revista de Investigación Clínica</i> 1993;45:255-266.....	27
4. El síndrome nefrótico.....	39
4.1 Mecanismos de proteinuria.....	39
4.2 Hipoalbuminemia.....	43
4.3 Mecanismo de formación de edema y retención de sodio y participación del sistema renina-angiotensina.....	44
4.4 El sistema renina-angiotensina en el síndrome nefrótico experimental.....	45
II. OBJETIVOS.....	47
III. MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
1. Hepatic and extrahepatic angiotensinogen gene expression in rats with acute nephrotic syndrome. <i>Renal Failure</i> 1997;19: . Aceptado 29 Ago 1996. USA.....	49
2. Renin, prorenin, and its gene expression in rats with acute nephrotic syndrome. <i>Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology</i> . Enviado 6 Sep 1996. Australia.....	67
IV. RESUMEN DE RESULTADOS.....	91
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	93
VI. CONCLUSIONES.....	95
VII. REFERENCIAS.....	96

I. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se estudió la regulación de la expresión de dos de las proteínas del sistema renina-angiotensina (renina y angiotensinógeno) en el síndrome nefrótico agudo experimental, por lo que la introducción se compone de 3 artículos de revisión escritos para este proyecto: uno sobre el sistema renina-angiotensina, otro sobre el angiotensinógeno y el tercero sobre la renina, y por último una breve revisión sobre el síndrome nefrótico.

Los artículos publicados son los siguientes:

1. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. El concepto actual del sistema renina-angiotensina. *Revista de Investigación Clínica* 1993;45:165-177.
2. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Estructura y regulación del gen de angiotensinógeno. *Revista de Investigación Clínica* 1993;45:387-398.
3. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Renina: estructura y regulación de la expresión del gen, biosíntesis y vías celulares de secreción. *Revista de Investigación Clínica* 1993;45:255-266.

El concepto actual del sistema renina-angiotensina

*María Elena Ibarra-Rubio
*José Pedraza-Chaverri

Resumen

El concepto tradicional del sistema renina-angiotensina (SRA) es el de un sistema endocrino que juega un papel central en el balance de agua y electrolitos y en la homeostasis de la presión arterial. El angiotensinógeno y la renina, secretados por el hígado y el riñón, respectivamente, interactúan para formar angiotensina I, la cual, a su vez, es hidrolizada por la enzima convertidora de angiotensina I para formar el péptido biológicamente activo del sistema, angiotensina II. Debido a que esta última enzima se localizó primero en la vasculatura pulmonar, se pensó que la angiotensina II se producía sólo en ese sitio y que posteriormente llegaba a sus órganos blanco por medio de la circulación. Sin embargo, gracias al desarrollo de nuevas técnicas bioquímicas y de biología molecular se ha podido documentar la presencia de los componentes del SRA, incluyendo sus ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm), en múltiples tejidos como riñón, vasos sanguíneos, corazón, cerebro y glándulas adrenales, entre otros. La presencia de los ARNm sugiere fuertemente que las proteínas del SRA se sintetizan localmente. Esto ha llevado a proponer que el SRA puede tener funciones paracrinas, autocrinas, e incluso intracrinas, además de las endocrinas ya bien conocidas, es decir, que el SRA puede estar involucrado en alguna función específica de cada tejido. Estos datos amplían el concepto tradicional del SRA ya que, además de su amplia distribución, se ha comprobado que los SRA locales se regulan independientemente del sistema circulante. Por otra parte, estudiando el comportamiento de los SRA

circulante y tisular ante diferentes situaciones patológicas como la hipertensión, se ha propuesto que la principal función del SRA circulante es mantener la homeostasis cardiorrenal a corto plazo, y que el control tónico de la resistencia vascular y de la función tisular local (por ejemplo, en adrenal y riñón) está regulada por los SRA locales. Finalmente, estas observaciones demuestran que el SRA tisular tiene un papel muy importante al igual que el SRA circulante.

Palabras clave: Sistema renina-angiotensina, Renina, Angiotensinógeno, Angiotensina I, Angiotensina II, Angiotensinas, Enzima convertidora de angiotensina I, Expresión génica, ARN mensajero.

Abstract

Current concept of the renin-angiotensin system.

Traditionally, the renin-angiotensin system (RAS) has been thought of primarily as an endocrine system that delivers circulating angiotensin II to target tissues. This peptide is a potent vasoconstrictor and a primary stimulus for aldosterone secretion. In addition, angiotensin II has many other targets such as kidney, heart and brain, from which it elicits different specific responses. Numerous studies using pharmacologic or immunologic inhibitors of the system have shown an important role for the circulating RAS in blood pressure and electrolyte as well as fluid homeostasis. Although it acts as a classical circulating endocrine system, there is increasing evidence to show that the RAS may also have an important local autocrine or paracrine role in a variety of tissues since it has been

* Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

Correspondencia a: M. en C. María Elena Ibarra-Rubio, Depto. de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 14000 México, D.F.

Recibido el 18 de marzo de 1992. Aceptado para publicación el 13 de agosto de 1992.

shown that the RAS components are present in all of these tissues. In addition, several investigators have recently demonstrated the expression of renin and angiotensinogen genes in multiple tissues, which strongly suggests that these proteins are locally synthesized. Moreover, it has been demonstrated that tissue RAS is independently regulated from circulating system under different pathological situations such as hypertension. As a result, the concept of the RAS as an endocrine system alone is in question. Locally expressed RAS may be involved with the regulation of individual tissue function independent of the circulating counterpart. However, the importance of these local systems in circulatory control and body volume homeostasis has yet to be defined. It has been proposed that the main function of the circulating RAS is to provide short-term cardiorenal homeostasis. The tonic control (e.g., adrenal and kidney) is influenced by the intrinsic tissue RAS. This new concept provides a broader outlook on the RAS and challenges its traditional endocrine role.

Keywords: *Renin-angiotensin system, Renin, Angiotensinogen, Angiotensin I converting enzyme, Angiotensin I, Angiotensin II, Angiotensins, Gene expression, Messenger RNA.*

El sistema renina-angiotensina (SRA) es una cascada bioquímica cuyo producto final, la angiotensina II (A II), es un vasoconstrictor potente y un estímulo primario para la secreción de aldosterona. Numerosos estudios han demostrado un importante papel de este sistema circulante en la regulación de la presión sanguínea y en la homeostasis de líquidos y electrolitos. La comprensión de la contribución del SRA en la fisiología cardiovascular y renal ha sido posible gracias al desarrollo de radioinmunoanálisis y técnicas de aislamiento y secuenciación de proteínas, y a la disponibilidad de péptidos sintéticos e inhibidores farmacológicos. Recientemente, se ha logrado la clonación molecular de los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc) y de los genes de las proteínas del sistema gracias a la tecnología del ADN recombinante. Utilizando los métodos bioquímicos clásicos y las modernas técnicas de biología molecular, muchos investigadores han demostrado recientemente la expresión de los genes de renina y angiotensinógeno en una gran variedad de tejidos.

La Revista de Investigación Clínica

Como resultado, el concepto del SRA como un sistema únicamente endocrino está en duda. Se ha postulado que los SRA que se expresan localmente están involucrados en la regulación de la función tisular individual, independientemente del sistema circulante. Este nuevo concepto ha sido de ayuda en la comprensión del papel del SRA en la fisiopatología de algunas enfermedades, y en las respuestas a inhibidores farmacológicos del sistema. En el presente trabajo se revisarán las evidencias y el posible papel de los SRA tisulares, y en otros trabajos se revisará la estructura y regulación de la expresión de los genes de renina y angiotensinógeno.

EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CIRCULANTE

En resumen, el funcionamiento del SRA circulante es el siguiente (revisado en 1-4):

1. El hígado produce el substrato de renina llamado angiotensinógeno y lo libera al plasma. Este substrato es una glicoproteína con un peso molecular de 55 000 daltones aproximadamente.
2. En circulación, la renina actúa hidrolíticamente sobre el angiotensinógeno para liberar, a partir de su extremo amino, la angiotensina I (A I). La renina es una enzima producida principalmente por las células yuxtglomerulares del riñón, y se libera a la circulación general por las venas renales. La A I es un decapeptido que no tiene actividad biológica.
3. La enzima convertidora de angiotensina I (ECA) o cininasa II, que se encuentra abundantemente en el pulmón, hidroliza la A I liberando el dipéptido His-Leu de su extremo carboxilo. Como resultado de la actividad de la ECA se forma el octapeptido A II, que es el componente biológicamente activo del SRA, y que llega a sus órganos blanco por medio de la circulación.

Las principales acciones fisiológicas de la A II (revisado en 1-3) son las siguientes: a) tiene un potente efecto vasopresor (es 50 veces más potente que la norepinefrina), y durante algunos años se pensó que ésta era su única función; b) estimula la secreción de aldosterona en las glándulas adrenales; esta hormona esteroide promueve la reabsorción tubular de sodio y agua, y como consecuencia de su acción, aumenta el volumen sanguíneo. Estas dos

acciones fisiológicas de la A II son las principales reguladoras de la presión sanguínea; c) aumenta la secreción de catecolaminas de las glándulas adrenales y facilita la transmisión adrenérgica; d) actúa directamente en el cerebro para incrementar la presión sanguínea mediante los sistemas nerviosos simpático y parasimpático, y para estimular la sed y la secreción de vasopresina y de hormona adrenocorticotrópica (ACTH); e) inhibe la secreción de renina y estimula la secreción de angiotensinógeno.

4. La angiotensina III (A III) se produce por acción de la angiotensinasa A sobre la A II. Esta enzima hidroliza el extremo amino (ácido aspártico) de la A II para formar el heptapéptido correspondiente, el cual estimula también la secreción de aldosterona, pero tiene un efecto vasopresor menor. Como angiotensinasas se conoce colectivamente a un grupo de enzimas hidrolíticas (aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas) que degradan a las angiotensinas a sus correspondientes aminoácidos (figura 1).

El aumento en la presión y volumen sanguíneos y en la concentración de A II secundarios a la

activación del SRA, inhiben la secreción de renina por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa.⁴

Generalmente se acepta que el elemento limitante o regulador de la actividad del SRA circulante es la renina, es decir, que la actividad del sistema está controlada principalmente por la velocidad de secreción de renina. En la actualidad se han descrito al menos cinco mecanismos fisiológicos que regulan la secreción de renina en el riñón: a) un barorreceptor intrarrenal que responde a cambios en la presión sanguínea; b) la cantidad del ion sodio (o posiblemente cloruro) que pasa por el segmento de mácula densa del túbulo distal renal; c) el sistema nervioso simpático y las catecolaminas circulantes; d) otros factores hormonales (e.g. A II, prostaglandinas, esteroides); y e) otros electrolitos plasmáticos (calcio, potasio, etc).⁴ Algunos autores se han apoyado en el hecho de que las angiotensinas están presentes en una concentración mucho menor que el angiotensinógeno para afirmar que la renina, y no el angiotensinógeno, es la molécula limitante del SRA. Sin embargo, la concentración plasmática de angiotensinógeno es de alrededor de 1.5 µM, y la Km para la reacción renina-angiotensinógeno es de 1-2 µM, lo que indica que se necesitaría un aumento de 10 veces en la concentración de angiotensinógeno para que se alcanzara una reacción enzimática de orden cero, y esta concentración nunca se alcanza en situaciones fisiológicas o patológicas. Por lo tanto, esta información indica que la concentración de angiotensinógeno sí tiene un papel limitante en la generación de A II.^{5,6}

Por otra parte, en el caso de los SRA tisulares, la generación intracelular de A II no está limitada necesariamente a la presencia de renina, pero sí a la presencia de angiotensinógeno, ya que hay varias enzimas que son capaces de producir A I o A II a partir de éste (figura 2). Las enzimas identificadas con esta actividad son: catepsina D, isorrenina, enzima generadora de angiotensina sensible a quimostatina, tonina, tripsina, calicreína, catepsina G y activador de plasminógeno tisular. Estas cinco últimas pueden generar directamente A II a partir de angiotensinógeno.^{7,8} En suero también se ha encontrado una proteasa de aspartilo diferente a la renina capaz de producir angiotensinas a partir de angiotensinógeno.⁹ Sin embargo, no se ha establecido el significado fisiológico de estas enzimas dentro del SRA.

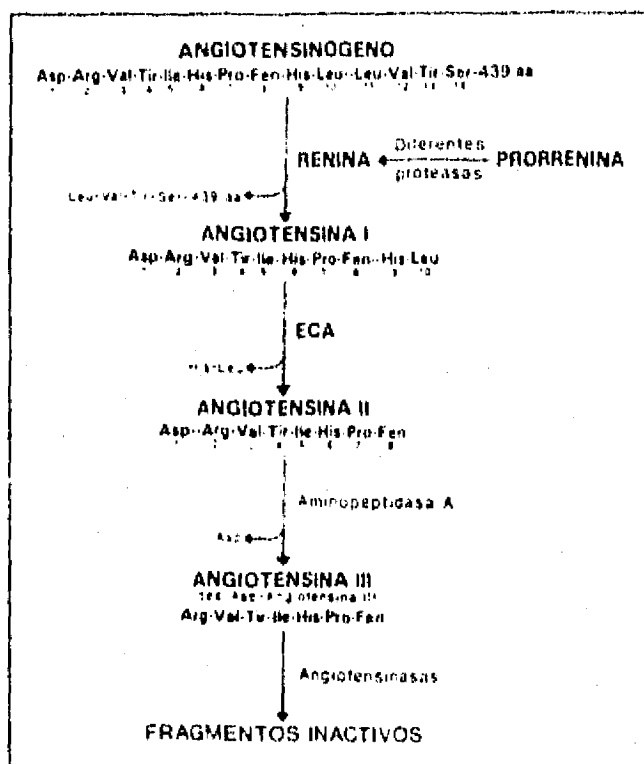


Figura 1. Secuencia de las reacciones enzimáticas del sistema renina-angiotensina. ECA = enzima convertidora de angiotensina I. — = enlace hidrolizado, aa = aminoácidos.

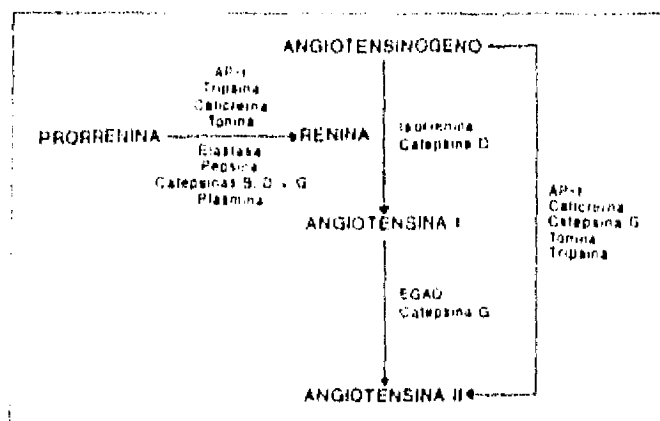


Figura 2. Enzimas diferentes a las del sistema renina-angiotensina que pueden producir angiotensina I o II a partir de angiotensinógeno. AP-II = activador de plasminógeno tisular, ECAQ = enzima generadora de angiotensina sensible a quinostatina.

Aunque se ha encontrado que la ECA circulante podría limitar la expresión completa del SRA en ratas tratadas con una dieta baja en sodio,¹⁰ a esta enzima no se le ha atribuido un papel regulatorio general dentro del SRA; de hecho, se cree más bien que esto es improbable.^{10,11} Sin embargo, aunque fisiológicamente la ECA no tiene un papel regulatorio en la producción de A II, cuando se inhibe la actividad de esta enzima se interrumpe la cascada de producción del péptido, por lo que constituye el blanco terapéutico de muchas drogas antihipertensivas.

En resumen, las moléculas más importantes en la regulación fisiológica de la actividad del SRA son la renina y el angiotensinógeno.

EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA TISULAR

Como ya se mencionó, el concepto tradicional del SRA es el de un sistema endocrino cuyo componente biológicamente activo (A II) se produce en circulación, a través de la cual llega a sus órganos blanco para producir el efecto sistémico o global. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias de que los componentes del SRA se sintetizan localmente en diversos tejidos. En la tabla 1 se presentan las referencias 12 a 97 de los trabajos que han identificado la presencia de los componentes del SRA en tejidos diferentes, incluyendo los receptores de A II.

Como se puede apreciar en esta tabla, las diferentes moléculas del sistema presentan una distribución muy amplia, abarcando tejidos de

diferentes sistemas como el cardiovascular, el reproductor y el nervioso, por mencionar algunos. Es interesante hacer notar que en cerebro, corazón, vasos sanguíneos, adrenal, ovario y riñón se han encontrado todos los componentes del SRA. Esta amplia localización de los componentes del SRA ha llevado a sugerir que el sistema tiene funciones paracrinas (sobre las células adyacentes), autocrinas (sobre las mismas células) e incluso intracrinas (dentro de las mismas células), además de las funciones endocrinas descritas anteriormente, es decir, que el SRA puede estar involucrado en alguna función específica de cada tejido. La evidencia definitiva de que los genes de renina y angiotensinógeno se expresan en diferentes tejidos la constituye la presencia de sus ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) correspondientes.

Existen discrepancias entre los autores en cuanto a la abundancia de los ARNm de angiotensinógeno y renina en los diferentes tejidos. Por ejemplo, Ohkubo y cols¹² encontraron que el orden decreciente de abundancia del ARNm de angiotensinógeno es el siguiente: hígado, cerebro, riñón, glándula adrenal, ovario y pulmón. Campbell y Habener¹³ también encontraron este orden de abundancia y, además, encontraron la misma cantidad de ARNm de angiotensinógeno en corazón que en glándula adrenal y riñón; sin embargo, en corazón sólo lo detectaron en la aurícula, y Kunapuli y Kumar¹⁷ también lo detectaron en el ventrículo. Lynch y cols¹⁶ coinciden con Ohkubo y cols¹² y Campbell y Habener¹³ en que el tejido más abundante en ARNm de angiotensinógeno es el hígado, después el cerebro y después el riñón. En contraste con los otros autores,^{12,13} Kunapuli y Kumar¹⁷ informaron que el ARNm de angiotensinógeno es más abundante en corazón que en hígado.

También se ha estudiado la distribución intrarrenal del ARNm de angiotensinógeno, encontrándose que se expresa tanto en corteza como en médula.^{15,18-20} Sin embargo, en un principio hubo discrepancias en cuanto a la abundancia relativa de este ARNm: mientras que Fried y Simpson¹⁵ encontraron que era más abundante en médula, Campbell y Habener¹⁹ observaron que su localización era predominantemente en corteza, e Ingelfinger y cols¹⁸ no encontraron diferencias entre estas dos regiones. Finalmente, usando la técnica de hibridación *in situ*, Ingelfinger y cols²⁰ encontraron que el ARNm de angiotensinógeno se localiza

Tabla 1. Referencias de la presencia de los componentes del SRA en diferentes tejidos.

Tejido	Angiotensinógeno		Renina		ECA	All RECC	PEPT
	ARNm	PROT	ARNm	PROT			
Hígado	12-17	6 29-31	47		72-75	82-84	
Riñón	12-16 18-21	29-32	21 48-50	21 52-56	73-78	83-85	53-55 91
Adrenal	12-13	33	47-50	57-59	74, 76 77	83-85	92
Cerebro	12-14 16 22-25	29 34-41	25, 47 50	60, 61	74, 76 77, 79	84 86-88	93
Corazón	13, 17	42, 43	49, 50	62	74-76 78	83, 89	94
Pulmón	12, 13		47, 49	44, 63	73-76 78		
Vasos sanguíneos	13, 26	44, 45	49	64	73, 76 78, 80	83-85	63, 64 95, 96
Ovario	12	46	47, 51	65	73, 74 76	90	97
Testículo			47-49	66	74-77 81		81
Intestino	13				73-76		
Utero			51	67, 68	74, 76	83, 84	
Otros	ME Bazo Estom Mesent IJ TAC 14 27 TAB 20		Pituit 48 Bazo 47, 49 Timo Prost Hipot 47	Plac 69 Corlon 70 Decid 71	Bazo Estom Tir 74, 76 73, 74		

Prot = proteína; Rece = receptor; Pept = péptido; Vasos sang = vasos sanguíneos; ME = médula espinal; Estom = estómago; Mesent = mesenterio; TAC = tejido adiposo café; TAB = tejido adiposo blanco; Pituit = pituitaria; Prost = próstata; Hipot = hipotálamo; Plac = placenta; Decid = decidua; Tir = tiroides; Vejig = vejiga.

predominantemente en túbulo proximal con cantidades considerablemente menores en los segmentos tubulares distales y crestas glomerulares. Este trabajo apoya los hallazgos de Campbell y Habener.¹⁹

En la glándula adrenal, se ha encontrado que el ARNm de angiotensinógeno en la cápsula (incluyendo la zona glomerulosa) es dos veces más abundante que en la médula (incluyendo las zonas fasciculata y reticularis).¹⁷

Con respecto al cerebro hay discrepancias entre los autores en cuanto a si son las neuronas o los

astrocitos la principal fuente de angiotensinógeno en este tejido. Según Lynch y Peach,⁹⁸ parece haber más evidencias de que los astrocitos son la fuente predominante, y muy probablemente la única, de angiotensinógeno en cerebro. Además, parece que la secreción de angiotensinógeno de los astrocitos es la fuente de esta proteína en el líquido cerebroespinal (donde representa del 2 al 3% de las proteínas totales).⁹⁸

Fried y Simpson¹⁵ no encontraron ARNm de angiotensinógeno en bazo utilizando la técnica de "dot blot"; sin embargo, Campbell y Habener¹¹ sí

detectaron este ARNm pero en cantidades muy pequeñas, y para detectarlo utilizaron la técnica de protección a nucleasa S1, que es una técnica con la que se pueden detectar cantidades muy pequeñas de ARNm. Por lo tanto, las discrepancias entre los autores en cuanto a la localización y abundancia de este ARNm en diferentes tejidos, puede deberse a que utilizan diferentes técnicas para extraer el ARN total y para determinar la abundancia de los ARNm específicos.

Por otra parte, Gómez y cols¹⁴ encontraron, por la técnica de "Northern blot", que en la etapa fetal de ratas, el ARNm de angiotensinógeno no es detectable en hígado pero sí en tejido adiposo café, riñón y cerebro. Una hora después del nacimiento, este ARNm se hace detectable en hígado, alcanzando un valor máximo a las 24 h, y disminuyendo ligeramente a los 90 días de vida posnatal. Estos hallazgos sugieren que el gen de angiotensinógeno está regulado durante el desarrollo de una manera específica de tejido, y que el hígado no es la fuente principal de angiotensinógeno en el feto, siendo fuentes alternativas el tejido adiposo café, el cerebro y el riñón.

A diferencia de la rata, el ARNm de angiotensinógeno en el borrego ya es detectable en el hígado durante el segundo trimestre de gestación y no está presente en el riñón.²⁹ Estos datos indican que también hay diferencias en la regulación tisular del ARNm de angiotensinógeno entre diferentes especies.

La mayoría de los autores coinciden en que el ARNm de angiotensinógeno de los tejidos extrahepáticos codifica para una molécula de angiotensinógeno idéntica a la del hígado;^{12,13} sin embargo, Lynch y cols¹⁶ encontraron que el ARNm de angiotensinógeno de hígado y cerebro son indistinguibles; en cambio, el de riñón parece ser más largo por 100 nucleótidos aproximadamente.

Para el ARNm de renina, Suzuki y cols³⁰ encontraron el siguiente orden decreciente de abundancia en diferentes órganos de rata: riñón, ventrículo cardíaco, aurícula cardíaca, cerebro, testículo y glándula adrenal. En cambio, Ekker y cols⁴⁷ encontraron que en glándula adrenal es más abundante que en hígado y cerebro, los cuales presentaron la misma concentración de ARNm de renina, y no detectaron nada en corazón. Okura y cols¹⁰⁰ encontraron el siguiente orden decreciente: riñón, corazón, aorta y adrenal. Finalmente, Lou y cols¹⁰¹ informaron el siguiente orden decreciente:

riñón, adrenal, pituitaria, hígado y corazón. Como se puede observar, existen grandes discrepancias en cuanto a la abundancia relativa del ARNm de renina en los tejidos estudiados; incluso para hígado y corazón aun existe la duda de que realmente esté presente este ARNm.¹⁰¹ Sin embargo, todos los estudios coinciden en que el riñón posee la concentración más alta del ARNm de renina.

FUNCIONES PARACRINAS, AUTOCRINAS E INTRACRINAS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Para muchos tejidos se desconoce la función local que podría tener el SRA; sin embargo, para algunos otros sí se ha propuesto, e incluso documentado, una o varias funciones.

RIÑÓN. Desde hace más de una década se postuló la existencia de un SRA local renal que funcionaba independientemente del SRA circulante;¹⁰² sin embargo, no se sabía si los componentes del sistema se producían localmente o si eran captados de la circulación. Hoy en día se tienen las evidencias de que los elementos del SRA se pueden sintetizar localmente gracias a las técnicas de biología molecular, mediante las cuales se ha demostrado la presencia de los ARNm de las proteínas del sistema en varias partes del riñón. Para tratar de entender el papel del SRA intrarrenal es importante conocer la distribución local de cada uno de los componentes del sistema.¹⁰³ Taugner y cols¹⁰⁴ demostraron la presencia de renina en las arteriolas aferente y eferente, arterias interlobulares, y también en los túbulos proximal, conector y colector cortical por tinción con anticuerpo antirrenina. Las células mesangiales glomerulares en cultivo sintetizan renina.¹⁰⁵ Por técnicas de hibridación *in situ*, se ha localizado el ARNm de renina principalmente en las células yuxtglomerulares de las arteriolas aferentes.^{46,106} Menores cantidades de este ARNm se han detectado en el mesangio y otros sitios vasculares. Recientemente se ha demostrado que la síntesis de renina (medida por la cantidad de proteína y ARNm) aumenta en el penacho glomerular, en particular en las células del mesangio, en ratas con ablación renal subtotal¹⁰⁷ y en el glomérulo de nefronas remanentes después de la nefrectomía subtotal.¹⁰⁸ Por otro lado, los túbulos proximales presentan inmunoreactividad a la ECA¹⁰⁴ y las células epiteliales yuxtglomerulares contienen A I y A II.^{91,104} La cantidad más alta de ECA renal está

en el borde en cepillo (lado luminal) de los túbulos proximales. Los receptores de A II se han encontrado abundantemente en el glomérulo y en la vasculatura, y, en concentraciones menores, en las fracciones tubulares corticales.^{102,109,110} Los receptores de A II se han localizado tanto en las membranas lumbales como en las basolaterales de las células del túbulo proximal. Como ya se mencionó, el ARNm de angiotensinógeno se expresa en las células de los túbulos proximales.¹⁰⁶ Estos datos sugieren que los sitios de producción de A II dentro del riñón pueden incluir la región tubular, las arteriolas aferentes y eferentes y otros sitios vasculares, así como el mesangio. Específicamente, los altos niveles del ARNm de angiotensinógeno en el túbulo proximal, junto con la presencia de ECA y receptores de A II, han conducido a proponer la hipótesis que éste es un sitio intrarrenal importante de formación y función de A II. Ya que no existe evidencia de la expresión del ARNm de renina en estas células, la renina inmunorreactiva detectada en las células del túbulo proximal debe provenir de la renina filtrada en el lumen tubular o de la renina enviada por medio del fluido intersticial renal.

El ARNm de angiotensinógeno también se ha encontrado en concentraciones menores en la médula renal en el ducto colector y en la vasa recta.^{113,111} El ARNm de renina no se expresa en la médula renal, pero una gran cantidad de renina puede llegar a ésta desde la región cortical por medio de la microcirculación, la linfa o a través del fluido tubular. La linfa renal contiene renina ya que se deriva del intersticio cortical que rodea el aparato yuxtglomerular, arteriolas y vénulas.^{112,114} De hecho, hay varios componentes del SRA en la linfa renal, incluyendo renina inactiva. Se ha identificado la renina en el fluido tubular, y otras enzimas proteolíticas como la caliceína, catepsina D o tonina, que pueden ser capaces de liberar A I a partir del angiotensinógeno en la médula renal.^{114,114} También se han descrito receptores de A II donde está el haz de la vasa recta^{102,109} y en los segmentos tubulares medulares y corticales.^{102,109,110}

Los datos de localización intrarrenal de los componentes del SRA anteriormente mencionados sugieren que puede haber cuatro sitios de formación de A II que pueden modular la función renal:

1) Túbulos renales. Varios estudios utilizando túbulos perfundidos aislados o técnicas *in vivo*, han demostrado que la A II en el túbulo proximal produce respuestas opuestas a diferentes

concentraciones.¹⁰⁹ En este sitio, la A II puede activar receptores en el segmento proximal S1 y estimular la reabsorción de sodio.¹¹⁷ Sin embargo, a una concentración relativamente alta (μM), la A II inhibe la reabsorción de sodio, aparentemente a través de un acoplamiento de su receptor a una proteína G inhibitoria.¹¹⁶ A concentraciones nanomolares fisiológicas, la A II incrementa la reabsorción de sodio por medio de un aumento en la concentración de calcio intracelular secundario a la activación de la fosfolipasa C.¹¹⁸ Este fenómeno ocurre a una concentración que se puede generar fácilmente *in situ*. Además, la A II en el túbulo proximal puede estimular el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ y aumentar la reabsorción de bicarbonato.^{119,121} La A II puede tener aun otras funciones tubulares, quizá relacionadas con el crecimiento celular. Por ejemplo, la A II potencia la mitogénesis estimulada por el factor de crecimiento epidérmico en células de túbulo proximal en cultivo.¹²²

2) Sitios vasculares. La infusión de A II induce un aumento en la resistencia arteriolar eferente y aferente. Sin embargo, el efecto predominante es el primero. Este aumento en la resistencia vascular induce una disminución del flujo sanguíneo renal y de la velocidad de filtración glomerular, aunque el efecto es mayor en el flujo sanguíneo que en la velocidad de filtración glomerular, lo que conduce a un aumento en la fracción de filtración. El aumento en la resistencia arteriolar aferente debido a la A II, puede alterar las fuerzas de Starling favoreciendo, por lo tanto, la reabsorción de fluidos en el túbulo proximal, además de cambiar el flujo sanguíneo.³⁵ Además, se ha demostrado que la angiotensina puede aumentar la sensibilidad del sistema de retroalimentación tubuloglomerular, que es uno de los mecanismos que regulan la filtración glomerular.^{123,124}

3) Mesangio glomerular. Las células mesangiales glomerulares se contraen en respuesta a la A II, lo que produce una disminución en el coeficiente de ultrafiltración capilar glomerular (Kf) y una disminución en la superficie capilar glomerular disponible para la filtración.¹²⁵ Bajo condiciones como la depleción de sodio o hemorragia, la A II disponible localmente puede actuar para neutralizar el aumento en la diferencia de presión hidráulica transcapilar producida por la vasoconstricción arteriolar eferente, y puede disminuir la velocidad de filtración glomerular. Por lo tanto, en conjunto, la A II producida localmente puede ayudar a conservar

el volumen extracelular. También en esta zona, la A II puede estimular la biosíntesis de prostaglandinas.¹²⁶

4) Vasa recta y sitios medulares. La localización del SRA en la vasa recta y en la médula, puede permitir que el SRA influya en el control del flujo sanguíneo medular regional y del mecanismo de contracorriente. Los estudios de Chou y cols¹²⁷ sugieren una posible función fisiológica de los receptores de A II en esta zona. Estos autores infundieron A II unilateralmente a la arteria renal de perros, a una dosis que no alterara la velocidad de filtración glomerular o el flujo plasmático renal. Esta manipulación dio por resultado una retención de sodio ipsilateral, y un incremento en la osmolaridad urinaria y en la isquemia papilar.¹²⁷ De hecho, el flujo plasmático papilar se ve afectado por eventos que aumentan o disminuyen la actividad plasmática de renina,¹²⁷ por ejemplo, el aumento en la renina circulante que se produce después de la administración de un diurético, está asociado con disminuciones en el flujo sanguíneo papilar.^{128,129} La expresión del ARNm de angiotensinógeno en la médula le confiere credibilidad a la posibilidad de que el SRA esté presente localmente y esté íntimamente involucrado en la regulación *in situ*.

Otro efecto de la A II sobre el riñón, y que está ampliamente documentado, es la inhibición de la liberación de renina de las células yuxtarglomerulares,¹³⁰ lo cual funciona como un mecanismo de retroalimentación negativa del SRA.

VASOS SANGUÍNEOS. La A II producida localmente puede influir en la función vascular a través de efectos paracrinos o autocrinos. Por ejemplo, la A II vascular puede afectar el estado contráctil de los vasos sanguíneos. La A II derivada de células de músculo liso puede inducir vasoconstricción activando los receptores de la misma célula que la produjo y los de las células de músculo liso adyacentes. La A II local puede aumentar la liberación de norepinefrina de las terminaciones nerviosas noradrenérgicas en los vasos sanguíneos. La A II derivada del endotelio también puede ejercer una influencia contráctil paracrina en células de músculo liso. Además, este péptido vasoactivo puede influir en la biosíntesis endotelial de prostaciclina.¹³¹ En resumen, se ha propuesto que las acciones del SRA en vasos sanguíneos son: 1) regulación del tono vascular y del flujo sanguíneo regionales,^{132,133} 2) patogénesis de la hipertensión crónica,^{134,135} 3) determinación de las

respuestas a inhibidores farmacológicos del SRA (por ejemplo, inhibidores de ECA),¹³⁶⁻¹³⁸ 4) desarrollo de hipertrofia vascular,^{139,142} y 5) contribuir a las respuestas vasculares a la inflamación y al daño.⁹⁶

CORAZÓN. Dzau⁹⁶ ha propuesto que las posibles acciones del SRA cardíaco son las siguientes: 1) vasoconstricción coronaria¹⁴² y por lo tanto, influencia sobre el flujo sanguíneo; 2) aumento de la contractilidad cardíaca;^{141,144} 3) estimulación del crecimiento de los miocitos cardíacos (hipertrofia);^{82,94,145-149} la A II se ha localizado en el núcleo de células cardíacas de rata⁹⁴ y puede estimular la acumulación de ARN y la síntesis de proteínas;¹⁵⁰ 4) influencia en el metabolismo miocárdico durante el daño por isquemia y reperusión;^{82,151,152} 5) influencia en las arritmias ventriculares durante el daño por isquemia y reperusión.⁴²

GLANDULA ADRENAL. La renina adrenal persiste después de la binefrectomía y su actividad está regulada independientemente de la renina renal o plasmática. La función de la A II adrenal es probablemente regular la biosíntesis de aldosterona. Por ejemplo, en células aisladas de glomerulosa adrenal, la velocidad de secreción de aldosterona basal se puede inhibir por saralasin.¹⁵¹ En ratas intactas, la velocidad de secreción de aldosterona correlaciona estrechamente con la actividad de renina adrenal.¹⁵⁴ Los niveles de renina adrenales están elevados en las ratas espontáneamente hipertensas.¹⁵⁵ Por lo tanto, debe considerarse un papel del SRA adrenal en la patogénesis de la hipertensión y en la respuesta a la inhibición de la ECA. Otra función de la A II en las glándulas adrenales, es modular la liberación de catecolaminas y la biosíntesis de cortisol.^{96,155-157} Asimismo, se ha encontrado que la A II estimula la síntesis de ADN y el crecimiento de células corticales adrenales, por lo tanto, un SRA local podría estar involucrado en el crecimiento adrenal.¹⁵⁸

CEREBRO. La actividad de renina en cerebro parece estar regulada por factores independientes del SRA circulante.¹⁵⁹ La A II en cerebro puede contribuir a la regulación de la presión sanguínea, de la sed y de la secreción de vasopresina, así como a la liberación de las catecolaminas.^{96,160-162} La administración de inhibidores de ECA al sistema nervioso central disminuye la presión sanguínea e inhibe la sed. De hecho, varios investigadores han propuesto un papel para el SRA cerebral en la patogénesis de la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas.¹¹ También se ha

propuesto que la A II podría actuar como un neurotransmisor.¹⁶¹

HIGADO. La interacción de la A II con un receptor específico de gran afinidad en la cromatina⁸² permite un desenrollamiento del ADN, lo que sugiere un papel intensificador de la transcripción de genes específicos.¹⁶¹ Este receptor de A II también se ha encontrado en la cromatina de timo.⁸²

En resumen, se ha propuesto que la función principal del SRA circulante es mantener la homeostasis cardiorenal a corto plazo.⁹⁶ El control tónico de la resistencia vascular y de la función tisular local (por ejemplo, en adrenal y riñón) está regulada por los SRA locales.⁹⁶ No se ha definido la importancia que tiene este sistema autocrino o paracrino en el control circulatorio y en la homeostasis del volumen corporal; sin embargo, parece ser poca. La idea de que el SRA circulante esté involucrado sólo en el control a corto plazo de la función cardiovascular, está apoyada por la observación de que la actividad plasmática del SRA sigue el principio de un sistema hormonal de circuito cerrado. Excepto por los estados de descompensación cardiovascular severa, la actividad plasmática del SRA casi siempre regresa a la normalidad cuando se alcanza la homeostasis. De hecho, tanto en la insuficiencia cardíaca congestiva como en la hipertensión renovascular, los niveles plasmáticos del SRA no están elevados en la etapa crónica compensada.^{164,165} Por lo tanto, se ha propuesto que las fases "no dependientes de renina" de la insuficiencia cardíaca o de la hipertensión renovascular, son condiciones en las cuales el apoyo circulatorio agudo proporcionado por la activación del SRA circulante no se requiere más. Durante esta fase, los SRA tisulares (vascular y cardíaco) mantienen el tono vascular y la función cardíaca. Este mecanismo de control local está bien demostrado por los datos de Okamura y cols.¹³³ Okunishi y cols.¹⁶⁶ y Miyazaki y cols.¹⁶⁷ por lo tanto, desde este punto de vista, el nombre de "no dependiente de renina" no es adecuado, ya que el SRA vascular puede estar jugando un papel importante en el mantenimiento de la hipertensión. Todos estos datos demuestran que el SRA tisular tiene un papel muy importante al igual que el sistema circulante.

Referencias

- Mitchell KD, Navar LG. The renin-angiotensin-aldosterone system in volume control. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1989; 3:393-430.
- Ballerman BJ, Zeidel ML, Cunning ME, Brenner BM. Vasoactive peptides and the kidney. En: Brenner BM, Rector FC. *The kidney*. 4a ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991: 510-83.
- Sealey JL, Laragh JH. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. En: Laragh JH, Brenner BM. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. New York: Raven Press, 1990:1287-317.
- Keeton TK, Campbell WO. The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 1980; 32:81-227.
- Clauser E, Gaillard I, Wei L, Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens* 1989; 2:403-10.
- Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux JP, Corvol P. Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens* 1983; A5:1005-19.
- Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens* 1989; 7:933-6.
- Morris BJ. New possibilities for intracellular renin and inactive renin now that the structure of the human renin gene has been elucidated. *Clin Sci* 1986; 71:345-55.
- Haas E, Lewis LV, Scipione P, Koshy TJ, Varde AU, Renner L. Angiotensin-producing enzyme I of serum: formation by immunization with renin. *J Hypertens* 1984; 2:131-40.
- Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Serum angiotensin converting enzyme activity and plasma renin activity in experimental models of rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990; 17:391-9.
- Pedraza-Chaverri J, Herrero B, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Lack of correlation between human serum angiotensin converting enzyme activity and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clin Chim Acta* 1990; 190:105-6.
- Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem* 1986; 261:319-23.
- Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986; 78:31-9.
- Gómez RA, Cassis L, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Carey RM, et al. Fetal expression of the angiotensinogen gene. *Endocrinology* 1988; 123:2298-302.
- Friedl TA, Simpson EA. Intrarenal localization of angiotensinogen mRNA by RNA-DNA dot blot hybridization. *Am J Physiol* 1986; 250:F374-7.
- Lynch KR, Simnad VI, Ben-Ari ET, Garrison JC. Localization of preangiotensinogen messenger RNA sequences in the rat brain. *Hypertension* 1986; 8:540-3.
- Kunapuli SP, Kumar A. Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of its mRNA in rat heart. *Circ Res* 1987; 60:786-90.
- Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison K, Dzau VJ. Angiotensinogen mRNA is expressed in both rat renal cortex and medulla. *J Hypertens* 1986; 4 (Suppl 6):S434-6.
- Campbell DJ, Habener JF. Regional distribution of angiotensinogen messenger RNA in rat adrenal and kidney. *J Hypertens* 1986; 4 (Suppl 6):S385-7.
- Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. *In situ* hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 1990; 85:417-23.
- Gómez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Everett A, Carey RM, et al. Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney. *Am J Physiol* 1988; 254:F582-7.

22. Lynch KR, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 1987; 2:149-58.
23. Yongue BG, Angulo JA, Mc Ewen BS, Myers MM. Brain and liver angiotensinogen messenger RNA in genetic hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1991; 17:485-91.
24. Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF, Deschepper CF. Angiotensinogen production by rat astroglial cells *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 1990; 34:545-54.
25. Dzau VJ, Ingelfinger J, Pratt RF, Ellison KE. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 1986; 8:544-8.
26. Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ Res* 1988; 62:1259-62.
27. Campbell DJ, Habener JF. Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization *in situ*. *Endocrinology* 1987; 121:1616-26.
28. Cassis LA, Saye JA, Peach MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 1988; 11:591-6.
29. Tewksbury DA. Angiotensinogen: biochemistry and molecular biology. En: Laragh JH, Brenner BM. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press, 1990:197-216.
30. Watanabe T, Waguri S, Watanabe M, Ishii Y, Kominami E, Uchiyama Y. Immunocytochemical localization of angiotensinogen and cathepsins B, H, and L in rat hepatocytes, with special reference to degradation of angiotensinogen in lysosomes after colchicine. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:1899-911.
31. Weigand K, Warnze H, Falge C. Synthesis of angiotensinogen by isolated rat liver cells and its regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 75:102-10.
32. Richoux JP, Cordonnier JL, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J, et al. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res* 1983; 233:439-51.
33. Ganten D, Schelling P, Vecsei P, Ganten U. Iso-renin extrarenal origin: the tissue angiotensinogenase systems. *Am J Med* 1976; 60:760-72.
34. Moffet RB, Bumpus FM, Husain A. Cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Sci* 1987; 41:1867-79.
35. Ganong WF. The renin-angiotensin system and the central nervous system. *Fed Proc* 1977; 36:1771-5.
36. Imboden H, Harding JW, Hilgenfeldt U, Cello MR, Felix D. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res* 1987; 410:74-7.
37. Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res* 1986; 374:195-8.
38. Genain CP, Van Loon GR, Kotchen TA. Distribution of renin activity and angiotensinogen in rat brain. Effects of dietary sodium chloride intake on brain renin. *J Clin Invest* 1985; 76:1939-45.
39. Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF, Deschepper CF. Angiotensinogen production by rat astroglial cells *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 1990; 34:545-54.
40. Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 1988; 242:1444-5.
41. Petrossian G, Oliver JA. Synthesis of angiotensinogen by renin-containing neuroblastomas. *Am J Physiol* 1989; 257:C185-9.
42. Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res* 1991; 68:905-21.
43. Lindpaintner K, Jin M, Niedermaler N, Wilhelm AJ, Ganten D. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res* 1990; 67:564-73.
44. Kifor I, Dzau V. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res* 1987; 60:422-8.
45. Desjardins-Glasson S, Gutkowska J, Garcia R, Genest J. Renin substrate in rat mesenteric artery. *Can J Physiol Pharmacol* 1981; 59:528-32.
46. Thomas WC, Sernia C. The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. *Cell Tissue Res* 1990; 261:367-73.
47. Ekker M, Tronik D, Rougeon F. Extrarenal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5155-8.
48. Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF. Analysis by immunocytochemistry and *in situ* hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7552-6.
49. Samani NJ, Morgan K, Brammar WJ, Swales JD. Detection of renin messenger RNA in rat tissues: increased sensitivity using an RNase protection technique. *J Hypertens* 1987; 5:519-21.
50. Suzuki F, Ludwig G, Hellmann W, Paul M, Lindpaintner K, Murakami K, et al. Renin gene expression in rat tissues: a new quantitative assay method for rat renin mRNA using synthetic cRNA. *Clin Exp Hypertens* 1988; A10:345-59.
51. Kim SJ, Shinjo M, Fukamizu A, Miyazaki H, Usuki S, Murakami K. Identification of renin and renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142:169-75.
52. Yokosawa H, Holladay LA, Inagami T, Haas E, Murakami K. Human renal renin: complete purification and characterization. *J Biol Chem* 1980; 255:3498-502.
53. Rightsel WA, Okamura T, Inagami T. Juxtaglomerular cells grown as monolayer cell culture contain renin-angiotensin converting enzyme and angiotensin I, II and III. *Circ Res* 1982; 50:622-9.
54. Hackenthal E, Metz R, Bührle CP, Taugner R. Intrarenal and intracellular distribution of renin and angiotensin. *Kidney Int* 1987; 31 (Suppl 20):S 4-17.
55. Dzau VJ, Ingelfinger JR. Molecular biology and pathophysiology of the intrarenal renin-angiotensin system. *J Hypertens* 1989; 7 (Suppl 7):53-8.
56. Dzau VJ, Kreisberg J. Cultured glomerular mesangial cells contain renin: influence of calcium and isoproterenol. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8 (Suppl 10):S6-10.
57. Ryan JW. Renin-like enzyme in the adrenal gland. *Science* 1967; 158:1589-90.
58. Naruse M, Sussman CR, Naruse K. Renin exists in human adrenal tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:402-7.
59. Naruse M, Takii Y, Inagami T. Renin exists in high concentration in the adrenal of the rat. *Biomed Res* 1981; 2:583-6.
60. Ganten D, Marquez JA, Cranger P, Hayduk K, Karsunisky KD, Boucher R, et al. Renin in dog brain. *Am J Physiol* 1971; 221:1733-7.
61. Hirose S, Yokosawa H, Inagami T. Immunocytochemical identification of renin in rat brain and distinction from acid proteases. *Nature* 1978; 274:392-3.

62. Dzau V, Re RN. Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* 1987; 75 (Suppl 1):134-6.
63. Rosenthal JH, Pfeifle B, Michailov ML, Pschorr J, Jacob IGM, Dehlihelm H. Investigations of components of the renin-angiotensin system in rat vascular tissue. *Hypertension* 1984; 6:383-9.
64. Dzau VJ. Renin-angiotensin system and arterial wall in hypertension. En: Nijhoff M. Arterial and venous systems in essential hypertension. The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers, 1987:153-64.
65. Do YS, Sherrod A, Lobo RA, Paulson RJ, Shinagawa T, Chen S, et al. Human ovarian theca cells are a source of renin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1957-61.
66. Pandey KN, Melner MH, Parmentier M, Inagami T. Demonstration of renin activity in purified rat Leydig cells: evidence for the existence of an endogenous inactive (latent) form of the enzyme. *Endocrinology* 1984; 115:1753-9.
67. Symonds FM, Stanley MA, Skinner SL. Production of renin by *in vitro* cultures of human chorion and uterine muscle. *Nature* 1968; 217:1152-3.
68. Ferris TF, Mulrow PJ. The uterus as a source of renin. *Clin Res* 1965; 13:206-10.
69. Gross F, Scaechtelin G, Berger M. A renin-like substance in the placenta and uterus of the rabbit. *Lancet* 1964; i:914-6.
70. Acker GM, Galen FX, Devaux C, Foote S, Papermik I, Perty A, et al. Human chorionic cells in primary culture: a model for renin biosynthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55:902-9.
71. Shaw KJ, Do YS, Kjos S, Anderson PW, Shinagawa T, Dubeau L, et al. Human decidua as the major source of renin. *J Clin Invest* 1989; 83:2085-92.
72. Sakharov IY, Danilov SM, Sukhova NV. Isolation of human liver angiotensin-converting enzyme by chromatofocussing. *Anal Biochem* 1987; 166:14-7.
73. Van Sande ME, Scharpe SL, Neels HM, Van Camp KO. Distribution of angiotensin-converting enzyme in human tissues. *Clin Chim Acta* 1985; 147:255-60.
74. Lieberman J, Sastre A. Angiotensin-converting enzyme activity in postmortem human tissues. *Lab Invest* 1983; 48:711-7.
75. Danilov SM, Faerman AI, Printseva OY, Martynov AV, Sakharov IY, Trakht IN. Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochem* 1987; 87:487-90.
76. Cushman DW, Cheung HS. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1971; 250:261-5.
77. Ehlers MRW, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme. Biochemistry and molecular biology. En: Laragh JH, Brenner BM. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. New York: Raven Press, 1990:1217-31.
78. Gilma M, Welsch C, Giesen-Crouse EM, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Age-related variations in tissue angiotensin-converting enzyme activities: comparison between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens* 1990; 8:697-702.
79. Yang HYT, Neff NH. Distribution and properties of angiotensin-converting enzyme of rat brain. *J Neurochem* 1972; 19:2443-50.
80. Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 1976; 191:1050-1.
81. Kallish N, Misono KS, Inagami T. Evidence for intracellular formation of angiotensins: coexists of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochim Biophys Res Commun* 1984; 122:1337-43.
82. Re RN, Vizard DL, Brown J, Bryan SE. Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119:220-7.
83. Peach MJ, Dostal DE. The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 (Suppl 4):S25-30.
84. Capponi AM, Aguilera G, Fakunding JL, Catt KJ. Angiotensin II: receptors and mechanisms of action. En: Soffer RL. Biochemical regulation of blood pressure. New York: John Wiley & Sons, 1981:205-62.
85. Marsden PA, Brenner BM, Ballerman BJ. Mechanisms of angiotensin action on vascular smooth muscle, the adrenal, and the kidney. En: Laragh JH, Brenner BM. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. New York: Raven Press, 1990:1247-72.
86. Healy DP, Retting R, Nguyen T, Printz MP. Autoradiographic evidence that angiotensin II receptors are associated with vagal afferent and efferent within the solitary vagal area of the rat brain stem. *J Hypertens* 1986; 4 (Suppl 6):S462-71.
87. Speth RC, Wamsley JK, Gehlert DR, Chemicky CL, Barnes XI, Ferrario CM. Angiotensin II receptor localization in the canine CNS. *Brain Res* 1985; 326:137-45.
88. Summers C, Myers LM, Kalberg CJ, Ralzada MK. Physiological and pharmacological comparisons of angiotensin II receptors in neuronal and astrocyte glial cultures. *Prog Neurobiol* 1990; 34:355-85.
89. Wright GB, Alexander RW, Eckstein LS, Cimbrone MA Jr. Characterization of rabbit ventricular myocardial receptors for angiotensin II: evidence for two sites with different affinities and specificities. *Mol Pharmacol* 1984; 24:213-21.
90. Husain A, Bumpus FM, DeSilva P, Speth RC. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2489-93.
91. Naruse K, Inagami T, Cello MR, Workman RJ, Takii Y. Immunohistochemical evidence that angiotensin I and II are formed by intracellular mechanism in juxtaglomerular cells. *Hypertension* 1982; 4 (Suppl 1):70-4.
92. Husain A, DeSilva P, Speth RC, Bumpus FM. Regulation of angiotensin II in rat adrenal gland. *Circ Res* 1987; 60:640-8.
93. Lind RW, Swason LW, Bruhn TO, Ganten D. Distribution of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the rat. *Brain Res* 1985; 338:81-9.
94. Robertson AL, Khalifah PA. Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science* 1971; 172:1138-9.
95. Hilgers KF, Mann JFE, Hilgenfeldt U, Ganten D. Vascular production and regulation of angiotensin. *Blood Vessels* 1991; 28:201-9.
96. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988; 77 (Suppl 1):4-13.
97. Lightman A, Tarlatzis BC, Rzaia PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, et al. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:808-14.
98. Lynch KR, Peach MJ. Molecular biology of angiotensinogen. *Hypertension* 1991; 17:263-9.
99. Olson AL, Perlman S, Robillard JE. Developmental regulation of angiotensinogen gene expression in sheep. *Pediatr Res* 1990; 28:183-5.
100. Okura T, Kitami Y, Iwata T, Hiwada K. Quantitative measurement of extrarenal renin mRNA by polymerase

- chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179:25-31.
101. Lou Y, Smith L, Robinson BC, Morris BJ. Renin gene expression in various tissues determined by single-step polymerase chain reaction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18:357-62.
 102. Mendelsohn FAO. Angiotensin II: evidence for its role as an intrarenal hormone. *Kidney Int* 1982; 22 (Suppl 12):S78-81.
 103. Schunkert H, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Evolving concepts of the intrarenal renin-angiotensin system in health and disease: contributions of molecular biology. *Renal Physiol Biochem* 1991; 14:146-54.
 104. Taugner R, Hackenthal E, Helmchen U, Ganten D, Kugler P, Marin-Grez M, et al. The intrarenal renin-angiotensin system. *Klin Wochenschr* 1982; 60:1218-22.
 105. Chansel D, Dussault JC, Ardailou N, Ardailou R. Identification and regulation of renin in human cultured mesangial cells. *Am J Physiol* 1987; 252:F12-8.
 106. Gomez RA, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. Molecular biology of the renal renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1990; 38 (Suppl 30):S 18-23.
 107. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Manivel JC, Rosenberg ME. Renin expression in renal ablation. *Hypertension* 1992; 20:483-490.
 108. Rosenberg ME, Correa-Rotter R, Inagami T, Kren SM, Hostetter TH. Glomerular renin synthesis and storage in the remnant kidney in the rat. *Kidney Int* 1991; 40:677-83.
 109. Mendelsohn FAO. Localization and properties of angiotensin receptors. *J Hypertens* 1985; 3:307-16.
 110. Mujais SK, Kauffman S, Katz AI. Angiotensin II binding sites in individual segments of the rat nephron. *J Clin Invest* 1986; 77:315-8.
 111. Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison KE, Dzau VJ. Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest* 1986; 78:1311-5.
 112. Dzau VJ, Wilcox CS, Sands K, Dunckel P. Dog inactive renin: biochemical characterization and secretion into renal plasma and lymph. *Am J Physiol* 1986; 250:E55-61.
 113. Wilcox CS. The effects of increasing the plasma magnesium concentration on renin release from the dog's kidney: interaction with calcium and sodium. *J Physiol* 1976; 284:203-17.
 114. Proud D, Nakamura S, Carone FA, Hering PL, Kawamura M, Inagami T, et al. The kallikrein-kinin and renin-angiotensin system in rat renal lymph. *Kidney Int* 1984; 25:880-5.
 115. Wintraub BV, Klickestein LB, Watt KWK. A human neutrophil-dependent pathway for generation of angiotensin II: purification of the product and identification as angiotensin II. *J Clin Invest* 1981; 68:484-90.
 116. Ledoux ST, Gutkowska J, Garcia R, Thibault C, Cantin M, Genest J. Immunohistochemical localization of tonin in rat salivary glands and kidney. *Histochemistry* 1982; 76:329-39.
 117. Liu F-Y, Cogan MG. Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal tubule. *J Clin Invest* 1987; 80:272-5.
 118. Douglas JG. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am J Physiol* 1987; 253:F2-7.
 119. Navar LG. Physiological role of the intrarenal renin-angiotensin system. *Fed Proc* 1986; 45:1411-3.
 120. Yanagawa N. Potential role for local luminal angiotensin II in proximal tubule sodium transport. *Kidney Int* 1991; 39 (Suppl 32):S 33-6.
 121. Schuster VL, Kokko JP, Jacobsen HR. Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J Clin Invest* 1984; 73:507-15.
 122. Norman J, Badie-Dezfooly B, Nord EP, Kurtz T, Schlosser J, Chauthari A, et al. EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells: potentiation by angiotensin II. *Am J Physiol* 1987; 253:F299-309.
 123. Mitchell KD, Navar LG. Enhanced tubuloglomerular feedback during peritubular infusions of angiotensins I and II. *Am J Physiol* 1988; 255:F383-90.
 124. Mitchell KD, Navar LG. Interactive effects of angiotensin II on renal hemodynamics and tubular reabsorptive function. *Kidney Int* 1990; 38 (Suppl 30):S69-73.
 125. Ichikawa I, Brenner BM. Glomerular actions of angiotensin II. *Am J Med* 1984; 76:43-9.
 126. Stahl RAK, Paravicini M, Schollmeyer P. Angiotensin II stimulation of prostaglandin E₂ and 6-keto-E₂ formation by isolated human glomeruli. *Kidney Int* 1984; 26:30-4.
 127. Chou SY, Faubert PE, Porush JC. Contribution of angiotensin to the control of medullary hemodynamics. *Fed Proc* 1986; 45:1438-43.
 128. Corsini WA, Honk JB, Ballie MD. Control of renin secretion in the dog: effects of furosemide of the vascular and macula densa receptors. *Circ Res* 1975; 37:464-70.
 129. Freeman RH, Davies JO, Gotshall RW, Johnston JA, Spielman WS. The signal perceived by the macula densa during changes in renin release. *Circ Res* 1974; 35:307-15.
 130. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 1990; 70:1067-116.
 131. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin system. *J Clin Invest* 1987; 79:1-6.
 132. Kawasaki H, Cline WH Jr, Su C. Involvement of the vascular renin-angiotensin system in beta-adrenergic receptor-mediated facilitation of vascular neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 231:23-32.
 133. Nakamura M, Jackson EK, Inagami T. Beta adrenoreceptor mediated release of angiotensin II from mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1986; 250:H144-8.
 134. Assad MM, Antonaccio MJ. Vascular wall renin in spontaneously hypertensive rats: potential relevance to hypertension maintenance and antihypertensive effect of captopril. *Hypertension* 1982; 4:487-93.
 135. Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N. Vascular renin-angiotensin system in 2-kidney, 1-clip hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8:560-5.
 136. Blaine EH, Schorn TW, Boger J. Statine-containing renin inhibitor. Dissociation of blood pressure lowering and renin inhibition in sodium-deficient dogs. *Hypertension* 1984; 6 (Suppl 1):111-8.
 137. Brunner HR, Gavras H, Waechter B, Kershaw GR, Turini GA, Vukovich RA, et al. Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patients. *Ann Intern Med* 1979; 90:19-23.
 138. Haber E, Zusman R, Burton J, Dzau VJ, Barger AC. Is renin a factor in the etiology of essential hypertension? *Hypertension* 1983; 5 (Suppl V):V 8-15.
 139. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989; 13:305-14.
 140. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62:749-56.
 141. Re RN. The cellular biology of angiotensin: paracrine, autocrine and intracrine actions in cardiovascular tissues. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21 (Suppl V):63-9.
 142. Johnston CJ. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs* 1990; 39 (Suppl 1):21-31.
 143. Ahmed SS, Levenson GE, Weiss AB, Regan TI. The effect of

- angiotensin on myocardial contractility. *J Clin Pharmacol* 1975; 15:276-85.
144. Baker K, Khosla MC. Cardiac and vascular actions of decapeptide angiotensin analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239:790-6.
145. Dzau VJ, Pratt RE. Renin-angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. En: Haber E, Morgan H, Katz A, Fozzard H. *Handbook of experimental cardiology*. New York: Raven Press, 1986:1611-61.
146. Re RN, LaBiche RA, Bryan SE. Nuclear hormone mediated changes in chromatin solubility. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 110:61-8.
147. Herrmann HC, Dzau VJ. Feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 1983; 52:328-34.
148. Sen S, Tarazi RC, Bumpus FM. Effect of converting enzyme inhibitor (SQ 14, 225) on myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1980; 2: 169-76.
149. Keuneke C, Yacullo R, Metzger R, Hellman T, Peters J, Ganten D. The role of tissue renin-angiotensin systems in hypertension and effects of chronic converting-enzyme inhibition. *Eur Heart J* 1990; 11 (Suppl D):11-6.
150. Khairallah PA, Kanabus J. Angiotensin and myocardial protein synthesis. En: Tarazi RC, Dunbar JB. *Perspectives in cardiovascular research*. New York: Raven Press, 1983: 337-47.
151. Linz W, Scholkens BA, Han YF. Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8 (Suppl 10):S91-9.
152. Westlin W, Mullane K. Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation* 1988; 77 (Suppl 1):10-9.
153. Williams GH, McDonnell LM, Raux MC, Hollenberg NK. Evidence for different angiotensin II receptors in rat adrenal glomerulosa and rabbit vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1974; 34:384-90.
154. Doi Y, Atarashi K, Franco-Saenz R, Mulrow P. Adrenal renin: a possible regulator of aldosterone production. *Clin Exp Hypertens* 1983; A5:1119-21.
155. Mulrow PJ. Adrenal renin: a possible local regulator of aldosterone production. *Yale J Biol Med* 1989; 62:503-10.
156. Aguilera G, Fujita K, Schiror A, Catt KJ. Role of angiotensin II in the regulation of aldosterone secretion. *Proceedings of the VI International Congress of Endocrinology, Melbourne, Australia* 1980:3389-92.
157. Mulrow PJ, Kusano E, Baba K, Shier D, Dol Y, Franco-Saenz R, et al. Adrenal renin: a possible local hormonal regulator of aldosterone production. *Cardiovasc Drugs Ther* 1988; 2:463-71.
158. Gill GN, III CR, Simonián MH. Angiotensin stimulation of bovine adrenocortical cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5569-73.
159. Dzau VJ, Sands K. Regulation of brain renin: evidence for an independent brain renin. *Clin Sci* 1982; 63:163-6.
160. Ganong WF. The brain angiotensin system. *Ann Rev Physiol* 1984; 46:17-31.
161. Reid IA. Actions of angiotensin II on the brain: Mechanisms and physiologic role. *Am J Physiol* 1984; 246:F533-43.
162. Severs WB, Daniels-Severs AI. Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacol Rev* 1973; 25:415-49.
163. Re RN, Vizard DL, Brown J, LeCross I, Bryan SE. Angiotensin II receptors in chromatin. *J Hypertens* 1984; 2 (Suppl 3): 271-3.
164. Dzau VJ, Gibbons G, Levin D. Renovascular hypertension: an update on pathophysiology, diagnosis and treatment. *Am J Nephrol* 1984; 3:172-82.
165. Dzau VJ, Hollenberg NK, Williams GH. Neurohormonal mechanism in heart failure: role of pathogenesis, therapy and drug tolerance. *Fed Proc* 1983; 42:3162-9.
166. Okunishi H, Kawamoto T, Kurobe Y, Oka Y, Ishii K, Tanaka I, et al. Pathogenic role of vascular angiotensin converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18:649-59.
167. Miyazaki M, Okamura T, Okunishi H, Toda N. Vascular angiotensin converting enzyme in the development of renal hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8 (Suppl 10):558-61.

Estructura y regulación de la expresión del gen de angiotensinógeno

María Elena Ibarra-Rubio
*José Pedraza-Chaverri

Resumen

El angiotensinógeno es una glicoproteína que contiene en su extremo amino el decapeptido angiotensina I (AI) el cual es liberado por la acción proteolítica de la enzima renina. A partir de la AI se produce enzimáticamente angiotensina II (AII), el péptido biológicamente activo del sistema renina angiotensina (SRA). El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido conocer la estructura y regulación de la expresión de los genes de las proteínas del SRA. El gen de angiotensinógeno de rata, humano y ratón consta de 5 exones y 4 intrones, miden aproximadamente 12 kb y son muy similares. En su región flanqueadora 5' se han identificado múltiples elementos regulatorios tales como los de respuesta de fase aguda, y respuesta a glucocorticoides, estrógenos y triyodotironina, además de los promotores e intensificadores comunes. La comparación de la estructura del angiotensinógeno, deducida por la clonación y secuenciación de los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc) de humano y rata, demuestra la similitud del angiotensinógeno con varios inhibidores de proteasas de serina producidas por el hígado. Esta similitud ha conducido a la búsqueda de otros papeles fisiológicos del angiotensinógeno, además de su papel como sustrato de renina. La biosíntesis hepática del angiotensinógeno está regulada por muchos factores hormonales diferentes incluyendo glucocorticoides, estrógenos, hormona tiroidea, insulina y AII, y actualmente la clonación del gen de angiotensinógeno ha ofrecido la oportunidad de

estudiar esta regulación a nivel transcripcional. En base a los resultados obtenidos con este tipo de estudios parece ser que la regulación de la síntesis de esta proteína se da principalmente a nivel transcripcional, es decir, por la regulación de la expresión de su gen.

Palabras clave: Angiotensinógeno, Sistema renina-angiotensina, Angiotensinas, ADN recombinante, Biología molecular, ARN mensajero, Hormonas, Expresión génica, Regulación de la expresión génica.

Abstract

STRUCTURE AND REGULATION OF THE ANGIOTENSINOGEN GENE

Angiotensinogen is a glycoprotein synthesized mainly in hepatocytes and secreted into the circulation. Angiotensinogen is cleaved by the enzyme renin to produce angiotensin I, which is further converted into a vasoconstricting peptide, angiotensin II, the biologically active peptide of the renin angiotensin system. The concentration of angiotensinogen is rate-limiting in the production of angiotensin I and therefore plays an important role in the regulation of angiotensin II production. The development of recombinant DNA technology has introduced new directions for the study of the angiotensinogen molecule. The human, rat and mouse angiotensinogen gene contains five exons interrupted by four intervening sequences and spans 12 kb approximately. In its 5' flanking region multiple regulating elements, as well as the major control elements, are present. The cloning and sequencing

* Depto. de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F.

Correspondencia: M. en C. María Elena Ibarra-Rubio, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpa, 1400 México, D.F., México.

Recibido el 18 de marzo de 1992. Aceptado para publicación el 20 de octubre de 1992.

of the angiotensinogen cDNA demonstrates the similarity of angiotensinogen to various serine protease inhibitors produced by the liver and was the beginning of studies looking for new physiological roles of angiotensinogen, in addition to the substrate for renin. The circulating levels of angiotensinogen are altered in many different physiological and pathological states. High levels of this protein are seen in hypercorticism, inflammation, pregnancy, and contraceptive therapy, and low levels are associated with adrenal insufficiency and converting enzyme inhibition. These variations are mostly due to modifications of the hepatic biosynthesis under the control of hormonal factors such as glucocorticoid, estrogen, thyroid hormone, insulin and angiotensin II. In addition, it has been found that these changes in the hepatic biosynthesis are due mainly to changes in the angiotensinogen gene expression.

Keywords: *Angiotensinogen, Renin-angiotensin system, Recombinant DNA, Hormones, Angiotensins, Molecular biology, Gene expression, Gene expression regulation, Messenger RNA.*

El sistema renina-angiotensina (SRA) juega un papel central en la regulación de la presión sanguínea y en el balance de líquidos y electrolitos. La angiotensina I (AI) es un decapeptido producido por la acción proteolítica de la proteasa de aspartilo renina sobre el angiotensinógeno. La AI posteriormente es hidrolizada por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) formándose el octapeptido angiotensina II (AII), que es el péptido biológicamente activo del SRA. Por lo tanto, el angiotensinógeno es el precursor de la AII.

La Km para la reacción renina-angiotensinógeno en humano es de $1.25 \mu\text{M}^1$ y la concentración de angiotensinógeno circulante es de $0.895 \mu\text{M}^2$. Estos datos indican claramente que, bajo condiciones fisiológicas, la renina no está saturada con su sustrato, por lo que cambios en la concentración de éste, pueden conducir a alteraciones en la producción de AII, a pesar de que la renina no varíe. Para que la concentración de angiotensinógeno no fuera un factor limitante en la producción de AII se requeriría un aumento de 10 veces en la concentración de esta proteína en plasma para que la reacción alcance una cinética de orden cero.^{3,4}

Por lo tanto, además de la renina, la concentración de angiotensinógeno es un factor

limitante en la velocidad de producción de AII por lo que juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea.⁵ Lo anterior puede tener mucha importancia clínica ya que se han observado cambios paralelos en la presión sanguínea y en la concentración de angiotensinógeno en muchos estados fisiológicos y patológicos.⁶ Se han encontrado altos niveles de angiotensinógeno en hipercorticismo, inflamación, embarazo y terapias anticonceptivas, y bajos niveles en la insuficiencia adrenal e inhibición de la ECA. Estas variaciones se deben principalmente a modificaciones en la expresión del gen bajo el control de factores hormonales como estrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas, AII y posiblemente insulina.

Por otra parte, la obtención del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de angiotensinógeno también ha permitido la identificación de su ARNm en muchos tejidos, además del hígado que es el principal sitio de síntesis. Esta amplia localización del angiotensinógeno es uno de los argumentos de la existencia y función de SRA locales. De hecho, puede producirse AII sólo con la presencia de angiotensinógeno, ya que hay otras enzimas diferentes a renina y a ECA que pueden liberar a este péptido directamente a partir de angiotensinógeno. La posible función fisiológica y participación en procesos patológicos de estos SRA locales se discute ampliamente en otro trabajo.

Estructura y biosíntesis del angiotensinógeno

El angiotensinógeno o sustrato de renina, es una alfa-2 globulina que contiene en su extremo amino el decapeptido AI. Se sintetiza principalmente en hígado, el cual no contiene depósitos significativos de esta proteína, sino que se secreta constitutivamente, siendo el plasma el principal reservorio del angiotensinógeno.⁷ Por ensayos directos de radioinmunoanálisis se han encontrado 40 picomoles de angiotensinógeno por gramo de hígado en la rata, lo que corresponde a un almacenamiento intrahepático del 3 o 4 % del angiotensinógeno presente en plasma. El angiotensinógeno, como todas las proteínas de exportación, se sintetiza como una molécula precursora, preangiotensinógeno.

La secuencia de aminoácidos del angiotensinógeno de rata, deducida a partir de la secuencia de bases de su ADNc⁸, indica que la

molécula está constituida por 453 residuos de aminoácidos en su forma madura (452 en humano, Refs. 9, 10) y un péptido señal putativo de 24 residuos de aminoácidos. El peso molecular calculado es de 49 548 daltones⁸ (49 770 daltones en humano, Ref. 9), que coincide con el peso molecular de 50 000 daltones para el angiotensinógeno libre de carbohidratos calculado a partir de la forma glucosilada de la proteína purificada (56 400 daltones).¹¹ Una parte del angiotensinógeno también circula como una variante de alto peso molecular.¹² Aunque en condiciones normales esta forma constituye un bajo porcentaje del angiotensinógeno plasmático total, existe en altos niveles durante el último trimestre del embarazo, y ocasionalmente es la forma predominante en el suero de mujeres embarazadas hipertensas.¹³ Este angiotensinógeno de alto peso molecular es un sustrato efectivo de renina y su alto peso molecular se explica porque está unido no covalentemente a otra proteína sérica.¹⁴ No se sabe si esta forma de angiotensinógeno tiene alguna relevancia fisiológica o fisiopatológica.

La parte de la molécula que corresponde a la AI está en el extremo amino del angiotensinógeno, precedida directamente por el péptido señal y seguida por una larga secuencia carboxilo terminal (des-AI-angiotensinógeno) que contiene 2 secuencias internamente homólogas y 3 sitios potenciales de glicosilación en las posiciones 47-49, 295-297 y 319-321.⁸ Un 63% de las posiciones de aminoácidos en el preangiotensinógeno de rata y humano son idénticas. Sin embargo, la secuencia adyacente al decapeptido AI (residuos de aminoácidos 11-31) del angiotensinógeno de roedores y humano es muy diferente.⁹ Es posible que estas diferencias estructurales contribuyan a la conocida especificidad de especie que presenta la renina.¹⁵

Es sorprendente que el organismo sintetice una gran proteína de 453 aminoácidos (rata) como precursora de la AI, un péptido de 10 aminoácidos. La función de los 443 aminoácidos restantes, es decir del des-AI-angiotensinógeno, se desconoce, sin embargo se han postulado algunas teorías:

1. En base a la similitud de secuencia de aminoácidos, se ha encontrado que el angiotensinógeno forma parte de una superfamilia de proteínas a la cual pertenecen la ovoalbúmina, la alfa-1-antitripsina, la antitrombina III, la globulina acarreadora de tiroxina, la globulina acarreadora de

corticosteroides, el cofactor II de la heparina y la alfa-antiquimotripsina.¹⁶ El angiotensinógeno presenta un 18% de homología con la globulina acarreadora de tiroxina, 20% con la globulina acarreadora de corticosteroides, 17% con el cofactor II de la heparina y 21% con la alfa-1-antiquimotripsina.¹⁰ Por lo tanto, se ha propuesto que el sustrato de renina también puede ser un inhibidor de proteasas o una proteína acarreadora, sin embargo, esta hipótesis aún tiene que ser confirmada.¹⁰ Por otra parte, Tanaka y cols.¹⁷ encontraron por la alineación de secuencia de las regiones carboxilo-terminales del angiotensinógeno y de los inhibidores de proteasas alfa-1-antitripsina, antitrombina III y alfa-1-antiquimotripsina, que el angiotensinógeno se parece mucho a estos en las posiciones correspondientes a las secuencias que rodean el centro reactivo, pero no en las regiones correspondientes al centro reactivo en sí. Por lo tanto, si es cierto que el angiotensinógeno tiene una actividad inhibitoria, debe ser sobre una proteasa de serina diferente, aunque la divergencia de la secuencia observada puede reflejar la desaparición de tal actividad inhibitoria durante la evolución.¹⁷

2. El preangiotensinógeno presenta una organización molecular similar a la del precursor de arginina vasopresina/neurofisiina. En ambas moléculas precursoras el péptido biológicamente activo (AI o vasopresina) está precedido directamente por el péptido señal y seguido por una larga secuencia carboxilo terminal y ambos tienen dos secuencias internamente homólogas.¹⁸ La neurofisiina tiene una función acarreadora de la arginina vasopresina después de la ruptura de su proteína precursora.¹⁹ Por lo tanto sería interesante investigar si la larga región carboxilo terminal del angiotensinógeno tiene algún papel biológico de este tipo después de la liberación de la AI.²⁰

Estructura del gen y del ácido ribonucleico mensajero (ARNm)

Ya se ha aislado y caracterizado el gen de angiotensinógeno de rata,^{8,17} humano^{9,10} y ratón.²¹ Por hibridación *in situ* el gen de angiotensinógeno se ha asignado al cromosoma 19q de rata²² y al cromosoma 1q de humano,²³ y por análisis de "Southern blot" se ha asignado al cromosoma 8 de ratón.²⁴ En las tres especies hay un solo gen de angiotensinógeno por genoma haploide. El gen de rata es el que se ha caracterizado más ampliamente,

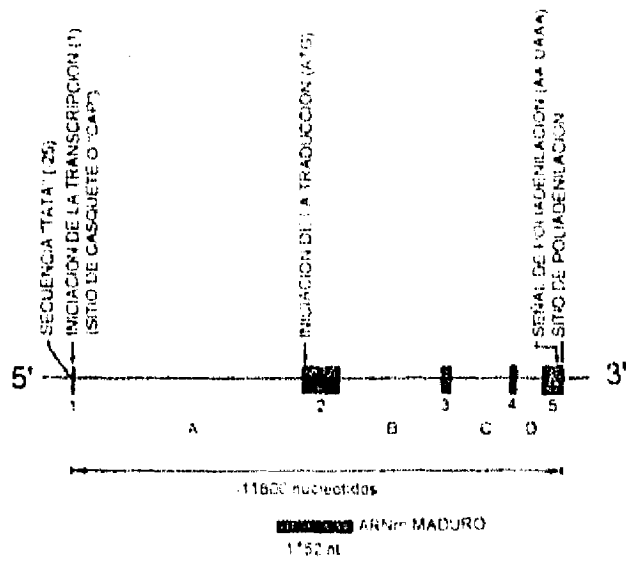


Figura 1. Estructura del gen de angiotensinógeno de rata. Las barras negras indican la posición y longitud proporcional de los exones. Las líneas entre las barras indican los intrones también en posición y longitud proporcional. Los números indican el nombre que corresponde a cada exón y las letras a cada intrón. Los números entre parentesis indican la posición tomando en cuenta como nucleótido número uno el sitio de iniciación de la transcripción. nt = nucleótido.

y su estructura general está representada en la figura 1, pero la estructura y función de los genes de ratón y humano, hasta donde se sabe actualmente, no son significativamente diferentes.²⁵

El gen de angiotensinógeno de rata tiene una longitud de aproximadamente 11.8 kilobases (kb)¹⁷ (13 kb el gen de humano, Ref. 10) y está constituido por 5 exones separados por 4 intrones (figura 1). Los exones 1-5 están compuestos por 31, 859, 268, 145 y 459 pares de bases respectivamente.¹⁷ La longitud de los respectivos exones en el humano es de 37, 858, 268, 145 y 791 pares de bases.¹⁰ Más del 50% de la proteína, incluyendo las secuencias del péptido señal y de la AI, está codificado en el exón 2¹⁷ al igual que en el gen de humano.¹⁰ El exón 1 y los primeros 30 pares de bases del exón 2 codifican para la región 5' del RNm no traducida,¹⁷ y el exón 5 contiene una secuencia codificadora corta y la secuencia 3' no traducida de 270 nucleótidos. El intrón A, de aproximadamente 5.5 kb¹⁷ (2.1 kb en humano, Ref. 10), está insertado dentro del segmento que codifica la región 5 no traducida del ARNm 30 pares de bases antes del sitio de iniciación de la traducción (figura 1).¹⁷ El intrón B de aproximadamente 2.5 kb (6.4 kb en humano), el intrón C de aproximadamente 1.4 kb (1.3 kb en humano) y el intrón D de aproximadamente 0.6 kb

(0.6 kb en humano) interrumpen la secuencia que codifica la proteína.¹⁷ Las uniones intrón-exón del gen de angiotensinógeno cumplen con la regla GT-AG,¹⁷ que es una regla bien conocida para la mayoría de los genes eucariotes y que constituye la señal para el sitio de escisión de los intrones y unión de 105 exones ("splicing").

Las diferencias más grandes entre los genes de angiotensinógeno de rata y humano están en la región 3' no traducida. En esta región, el gen de humano contiene 2 sitios potenciales de poliadenilación¹⁰ y ambos sitios se usan *in vivo* (al menos en el hígado), produciendo dos especies de ARNm diferentes solo en la longitud de la región 3' terminal no traducida, la cual está compuesta de 605 o de 413 nucleótidos.²⁰ El ARNm más pequeño es 3 veces más abundante que el mayor, lo que indica que una de las señales de poliadenilación se usa más efectivamente que la otra.⁹ En el gen de rata, esta secuencia es más corta por aproximadamente 200 pares de bases y presenta por lo menos 4 sitios de poliadenilación diferentes,^{26,27} por lo que la heterogeneidad de tamaño de su ARNm es mucha. Otro factor que contribuye a la heterogeneidad de tamaño de este ARNm es una característica poco usual de este gen; y es que parece que los glucocorticoides pueden dirigir su transcripción desde un segundo promotor con dos nuevos sitios de iniciación de la transcripción (a -386 y -328 nucleótidos, Ref. 27), y por lo tanto estimulan la acumulación de dos formas más largas del ARNm de angiotensinógeno extendidos en sus extremos 5'.²⁷ Este promotor es absolutamente dependiente de estas hormonas. Apoyando la existencia de dos promotores, se encontraron dos "TATA box" a 25-30 nucleótidos de los sitios de iniciación, además de dos elementos de respuesta a glucocorticoides.²⁷

El sitio de casquete ("cap") del gen de angiotensinógeno de rata se ha localizado en el residuo de adenina colocado a 31 nucleótidos del extremo 3' del exón 1 (figura 1, Ref. 17).

En resumen, el ARNm del angiotensinógeno de rata tiene aproximadamente 1,800 nucleótidos de longitud, correspondiendo 65 nucleótidos a la región 5 no traducida, 1431 a la codificadora, y 200-400 nucleótidos a la región 3' no traducida.²⁵

Los progresos en la comprensión de la regulación hormonal transcripcional y la expresión específica de tejido de las proteínas, indican que la región flanqueadora 5' del gen está implicada generalmente en estos procesos regulatorios. Esta región

Tabla 1. Elementos regulatorios del gen de angiotensinógeno identificados funcional y/o estructuralmente.

Elemento	Especie	Referencia
Secuencia TATA	Rata (2)	17, 27
	Humana (1)	10
Secuencia CAAT	Humana	10
Intensificador	Rata	28
Elemento de respuesta a glucocorticoides	Humana (2)	9, 10, 29
	Rata (2)	27
	Ratón	30
Silenciador	Rata	28
Elemento de respuesta a estrógenos	Humana	9, 10, 29
	Ratón	30
Secuencia que une triyodotironina	Humana	9, 10
Elemento de respuesta de fase aguda	Rata	31
	Humana	29
	Ratón	30

regulatoria contiene secuencias nucleotídicas cortas involucradas en las interacciones ADN-proteína. Estas interacciones son responsables obviamente de la regulación de la transcripción del gen correspondiente. En la tabla 1 se enlistan los elementos regulatorios del gen de angiotensinógeno que diversos autores han identificado estructural o funcionalmente.

El que se hayan localizado en la región 5' del gen de angiotensinógeno secuencias que son similares a aquellas secuencias regulatorias de otros genes, no significa que estas secuencias estén involucradas en la regulación del gen, sino que sólo indica probables secuencias de interés cuya función debe ser demostrada experimentalmente.

Por diferentes tipos de estudios se ha encontrado que la región regulatoria mínima suficiente para mantener y regular la expresión del gen de angiotensinógeno está contenida en los 688 pares de bases del flanco 5' en la rata,²⁵ en 1 kb de la misma región en el gen de humano²⁹ y en 0.75 kb en el caso del gen de ratón.³⁰ En esta región del gen de ratón también se encuentran los elementos necesarios para conferir especificidad de tejido en la mayoría de órganos que producen angiotensinógeno.³⁰

La conservación interespecífica de la región reguladora 5' del gen de angiotensinógeno de humano, rata y ratón es muy alta ya que se ha encontrado un 60% de identidad de 105 primeros 500 pares de bases de esta región entre las tres especies.⁶

Regulación de los niveles de regulación del ARNm y de la síntesis de angiotensinógeno

La biosíntesis hepática del angiotensinógeno está regulada por muchos factores hormonales diferentes incluyendo glucocorticoides, estrógenos, hormona tiroidea, insulina y AII. La clonación del gen de angiotensinógeno ha ofrecido la oportunidad de estudiar esta regulación al nivel transcripcional.

En humano, los niveles plasmáticos de angiotensinógeno se elevan durante el embarazo, hipercorticismos, inflamación, síndrome de Cushing y durante el tratamiento con anticonceptivos, estrógenos ó glucocorticoides.⁷ En cambio, disminuyen en la enfermedad de Addison y con el tratamiento con inhibidores de ECA. La mayoría de estas observaciones se han reproducido experimentalmente en ratas donde los estrógenos,

glucocorticoides, insulina, AI, hormonas tiroideas, binefrectomía y los procesos inflamatorios aumentan el nivel plasmático de angiotensinógeno,⁷ mientras que los inhibidores de la ECA,³² la tiroidectomía³³ y la adrenalectomía³³ lo disminuyen. La reducción por los dos últimos factores se puede corregir por la administración de triyodotironina o mineralocorticoides respectivamente.³³ Se ha postulado que la disminución por adrenalectomía se debe a un aumento en el consumo de angiotensinógeno secundario a un aumento en la renina.³³ No está claro si la síntesis de angiotensinógeno disminuye en la adrenalectomía, ya que en algunos estudios se ha informado que el ARNm de angiotensinógeno hepático disminuye^{34,35} y en otros se ha encontrado que no se altera.³⁶ En cambio,⁵ si se ha demostrado que la disminución de angiotensinógeno por tiroidectomía es secundaria a la reducción en su síntesis y liberación.^{17,38} De acuerdo con esta información, el ARNm de angiotensinógeno en hígado disminuye en ratas hipotiroideas.³⁵ Por otra parte, la triyodotironina induce la acumulación del ARNm de angiotensinógeno en una línea celular de hepatoma³⁹ y la inyección de esta hormona a ratas normales induce rápidamente una acumulación del ARNm de angiotensinógeno en hígado, pero no en cerebro y riñón.⁴⁰

Se ha postulado que el aumento de angiotensinógeno en el embarazo se debe a los estrógenos.³³ Es muy probable que este aumento sea secundario a cambios en la síntesis de la proteína. De hecho, la inyección de etinil estradiol aumenta la síntesis de angiotensinógeno^{37,38} y el nivel de su ARNm en hígado.⁴¹ Por otra parte, se ha demostrado una respuesta diferencial a los estrógenos en algunos tejidos. El ARNm de angiotensinógeno aumenta alrededor de un 100% en hígado, mientras que el aumento en cerebro es de sólo un 50% y en corazón no se modifica. Estas observaciones sugieren que el hígado, corazón y cerebro de rata responden de manera diferente a las señales hormonales y pueden tener mecanismos regulatorios diferentes para el control de los niveles del ARNm de angiotensinógeno.⁴¹ La acción de los estrógenos requiere la presencia de un receptor citosólico, y la ausencia de este receptor explica la inefectividad de los estrógenos en ratas prepúberes.³³

En ratas normales, los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno se mantienen relativamente constantes durante el desarrollo.^{42,43} En cambio, el

ARNm de angiotensinógeno renal está presente a niveles muy bajos a los 35 días de edad, pero por los días 63 y 91 aumenta significativamente coincidiendo con la pubertad.⁴² Estos datos indican que los ARNm de angiotensinógeno de riñón e hígado están regulados diferencialmente durante la ontogenia.⁴² Para examinar el papel de los andrógenos en estos cambios, se castraron ratas macho 10-14 días antes de sacrificarlas⁴³ y se observó una atenuación del aumento en los niveles intrarrenales del ARNm de angiotensinógeno asociado con la pubertad. Estos datos sugieren que los andrógenos están involucrados, al menos en parte, en la elevada expresión intrarrenal de angiotensinógeno en las ratas machos durante la ontogenia.

También se ha demostrado que los glucocorticoides (dexametasona) estimulan la síntesis del angiotensinógeno en rebanadas de hígado^{37,38} y los niveles de su ARNm en hígado,⁴¹ células aisladas de hígado,⁴⁴ en una línea celular de hepatoma,³⁹ en cerebro,⁴¹ y en cultivos primarios de células astrogliales del diencéfalo de rata,⁴⁵ pero no en corazón.⁴¹ Parece que el efecto de la dexametasona sobre el angiotensinógeno es un efecto directo mediado por su receptor tanto en hígado como en cerebro.⁴⁵ Asimismo, los corticosteroides estimulan la liberación de angiotensinógeno de hepatocitos⁴⁶ y los niveles de su ARNm en células aisladas de hígado⁴⁴ y en una línea celular de hepatoma.³⁹

El aumento en los niveles del ARNm de angiotensinógeno producido por dexametasona, triyodotironina y aldosterona en la línea celular de hepatoma es dependiente de tiempo y dosis.³⁹ Se piensa que la aldosterona, al igual que la dexametasona, actúa a través del receptor de glucocorticoides.³⁹

El tratamiento combinado con dexametasona y triyodotironina,³ nefrectomía,⁴⁷ o un análogo de AMPc (Sp-cAMPs)⁴⁴ da por resultado un aumento sinérgico en los niveles del ARNm de angiotensinógeno. Estos efectos aditivos indican que los mecanismos regulatorios de los distintos factores no utilizan una vía común.⁷

Al igual que con los estrógenos, existe una respuesta diferencial de tejido del ARNm del angiotensinógeno a los glucocorticoides: en hígado y cerebro aumenta pero en proporciones diferentes,^{41,45,47} y en corazón⁴¹ y riñón³⁶ no hay respuesta. Es sorprendente que, a pesar de que el

riñón contiene receptores a glucocorticoides, no responde a la administración de dexametasona.³⁶

En hígado aislado de rata se ha observado que la insulina aumenta la producción de angiotensinógeno,⁴⁸ sin embargo, en cultivo de células, la insulina ejerce un efecto inhibitorio sobre el ARNm de angiotensinógeno.⁴⁹

También se ha caracterizado el efecto de la All sobre la síntesis de angiotensinógeno. La All aumenta la liberación de angiotensinógeno en hígado perfundido⁵⁰ y en hepatocitos aislados,⁴⁶ y los niveles hepáticos de su ARNm.^{44,51,52} Este aumento en los niveles del ARNm puede deberse a que la All estimule la velocidad de transcripción del gen de angiotensinógeno, o bien, que afecte algún proceso postranscripcional como la degradación del ARNm.⁵¹ De hecho, se ha encontrado que en la cromatina de hígado existe un receptor específico de gran afinidad para All⁵³ y esta interacción permite un desenrollamiento del ADN, lo cual puede estar involucrado en la estimulación de la transcripción de genes específicos,⁵⁴ entre los que puede estar el de angiotensinógeno.⁴⁷ Interesantemente, en células HepG2 la All⁵⁵ y sus análogos^{55,56} inhiben la producción de angiotensinógeno. Esto sugiere que los mecanismos intracelulares que regulan la secreción de angiotensinógeno son diferentes en hepatocitos y en células HepG2.

El efecto del AMPc sobre los niveles del ARNm de angiotensinógeno no está totalmente claro. En hepatocitos aislados se observó una relación inversa entre los niveles intracelulares de AMPc y los del ARNm de angiotensinógeno.⁵² Debido a que la All disminuyó los niveles de AMPc, en ese trabajo se propuso que este es el mecanismo por medio del cual la All estimula la secreción de angiotensinógeno y los niveles de su ARNm.⁵² Por el contrario, en otro estudio en hepatocitos aislados se encontró que un análogo de AMPc (Sp-cAMPS) aumenta los niveles del ARNm de angiotensinógeno,⁴⁴ y finalmente en células HepG2 el aumento en AMPc estimuló la secreción de angiotensinógeno.⁵⁶

Existen evidencias de que la elevación en los niveles de angiotensinógeno en la binefrectomía se deben a un aumento en la biosíntesis hepática de esta proteína.³⁸ Se ha encontrado que la biosíntesis de angiotensinógeno por rebanadas de hígado de rata aumenta dramáticamente después de la binefrectomía, y esta respuesta se bloquea por la administración de actinomicina D, sugiriendo que el aumento es subsecuente a, y dependiente de, un

aumento en la síntesis hepática de ARN.⁵⁷ De hecho, Iwao y cols.⁴⁷ encontraron que los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno aumenta 5 veces por la binefrectomía. El aumento en la síntesis del angiotensinógeno⁵⁷ y en los niveles de su ARNm⁴⁷ es menor cuando, además de la binefrectomía, se les hace una adrenalectomía. También se ha encontrado que los niveles relativos del ARNm de angiotensinógeno aumentan dramáticamente en tejido adiposo café después de 48 h de la nefrectomía bilateral.⁵⁸ Sin embargo, la nefrectomía no produce cambios en los niveles del ARNm de angiotensinógeno en cerebro.⁴⁷ Estos datos ilustran nuevamente la respuesta diferencial del ARNm de angiotensinógeno en diferentes tejidos.

Los inhibidores de la ECA disminuyen los niveles circulantes de angiotensinógeno en humanos⁵⁹ y en ratas.^{32,60} Es posible que esta disminución se deba a un aumento en su consumo por los altos niveles de renina. Sin embargo, se ha observado que los inhibidores de la ECA también tienen efecto sobre los niveles del ARNm de angiotensinógeno, los cuales disminuyen en el hígado tanto con enalapril⁶¹ como con captopril.⁶² En cambio, en el riñón se ha informado que el enalapril no los altera,⁶³ mientras que el captopril los disminuye,⁶² y que en el tejido adiposo café los niveles del ARNm de angiotensinógeno aumentan por el tratamiento con enalapril.⁵⁸ La disminución del ARNm de angiotensinógeno en el hígado puede explicar la reducción en su síntesis.⁶⁴ Estos efectos de la inhibición de la ECA pueden deberse a la inhibición de la producción de All, la cual, como ya se mencionó, estimula la síntesis de angiotensinógeno.

Otro de los estímulos que modifican los niveles del ARNm de angiotensinógeno es la concentración de cloruro de sodio en la dieta. La dieta alta en sodio produce una disminución en el ARNm de angiotensinógeno en hígado y en riñón.⁶⁵ Por el contrario, la dieta baja en sodio aumenta el ARNm de angiotensinógeno en el riñón^{62,63,66} y se ha informado que la respuesta es mayor en la corteza que en la médula renal.⁶⁵ En hígado, se ha encontrado que en estas condiciones este mensajero aumenta⁶² o permanece sin cambios.⁶⁵ La respuesta del ARNm de angiotensinógeno a la depleción de sodio también se ha estudiado en ratas espontáneamente hipertensas. Los riñones de ratas normales tienen niveles más altos de ARNm de angiotensinógeno con una dieta normal de sodio que las ratas espontáneamente hipertensas. La

Tabla 2. Estimulos que alteran los niveles del ARNm de angiotensinogeno en rata.

Estimulo	Alteración	Tepdo	Referencias
Dieta baja en sodio	↑	Riñon	42, 62
	≈	Higado	65, 66
	↑		42, 65 62
Dieta alta en sodio	↓	Higado	62
	↓	Riñon	
Furosemda	↑	Higado	75
	≈	Riñon	
	≈	Corazon	
	≈	Adrenal Cerebro	
Enalapril	↓	Higado	61
	≈	Riñon	63
	↑	TAC	58
Captopril	↓	Higado	62
	↓	Riñon	
Angiotensina II	↑	Hepatocito	44, 51, 52
Aldosterona	↑	Hepatoma	39
Adrenalectomia	↓	Higado	34, 35
	≈	Higado	36
	≈	Cerebro	36
	≈	Riñon	36
Bunrectomia	↑	Higado	7, 47
	↑	TAC	58
	≈	Cerebro	47
AspC	↑	Hepatocito	44
	≈	Hepatocito	52
Estrógenos	↑	Higado	7, 43
	↑	Cerebro	7, 39
	≈	Corazon	7, 39
	≈	Hepatoma	39
Glucocorticoides	↑	Higado	7, 35, 36, 41
	↑	Hepatoma	39
	↑	Hepatocito	44
	↑	Cerebro	36, 41, 45
	≈	Corazon	41
	≈	Riñon	36
Insulina	≈	Hepatocito	49
Hipotroidismo	≈	Higado	39
Trivodotruonina	↑	Higado	7, 40
	≈	Cerebro	40
	≈	Riñon	40
	↑	Hepatoma	39
Glucagon	≈	Hepatocito	52
Desarrollo (pubertad)	≈	Higado	42, 43
	≈	Riñon	
Castracion	≈	Riñon	43
Dieta alta o baja en proteínas	≈	Higado	76
	≈	Riñon	
Diabetes espontánea	≈	Riñon	77
Diabetes inducida	≈	Riñon	76
	≈	Higado	78

(↑) Aumento (↓) Disminucion (≈) Sin cambios TAC = Tejido adiposo cate

depleción de sodio estimula el ARNm de angiotensinógeno en ratas normales casi un 50% comparados con una dieta normal. En cambio, en las ratas hipertensas la depleción de sodio no produce cambios en el nivel renal del ARNm de angiotensinógeno, lo que indica que estas ratas presentan una alteración en la regulación por sodio de la expresión intrarrenal del ARNm de angiotensinógeno.⁶⁷ Aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual el NaCl de la dieta afecta el ARNm de angiotensinógeno. Datos preliminares sugieren que el sodio, y no el cloro, es el que regula la expresión del gen de angiotensinógeno.⁶⁶

Se ha encontrado que el angiotensinógeno presenta una respuesta de fase aguda tanto en humanos⁶⁸ como en modelos experimentales de inflamación inducida con lipopolisacáridos en ratas.^{69,70} En pacientes con inflamación aguda (peritonitis) los niveles circulantes del angiotensinógeno, determinado por un radioinmunoanálisis directo, aumentan,⁷¹ y en un modelo experimental de peritonitis inducida por la inyección de un lipopolisacárido de *Escherichia coli* en ratas se encontró que el ARNm de angiotensinógeno aumenta en hígado.⁷² En ratas, se ha observado que esta respuesta de fase aguda está mediada por una citocina derivada de leucocitos, y que se necesita de un glucocorticoide para que la citocina tenga su efecto estimulador en la producción hepática de angiotensinógeno.⁷⁰ Por estas observaciones se ha propuesto incluir al angiotensinógeno en la lista de proteínas de fase aguda. Además, existe una gran similitud estructural del angiotensinógeno con la alfa-1-antitripsina¹⁷ que es una proteína de fase aguda. De acuerdo con estos datos, en el gen de angiotensinógeno de rata¹¹ y ratón³⁰ se han encontrado elementos de respuesta de fase aguda. Sin embargo, Bouhnik y cols.⁷³ encontraron que la respuesta del angiotensinógeno no es una respuesta típica de fase aguda ya que aumenta en la inflamación inducida por lipopolisacáridos, pero disminuye con turpentina, que es otro modelo de inflamación en el cual hay una respuesta clara de las proteínas de fase aguda. Además, se ha demostrado que el factor estimulador de hepatocitos, una proteína sintetizada en monocitos en diferenciación, la cual aumenta la síntesis de varias proteínas hepáticas durante la inflamación, disminuye los niveles del ARNm de angiotensinógeno en células de hepatoma humano

(HepG2), lo que sugiere que la respuesta a la inflamación del angiotensinógeno no está mediada por el factor estimulador de hepatocitos.⁷⁴

En la tabla 2 se enlistan los diferentes estímulos que alteran los niveles del ARNm de angiotensinógeno en ratas.

Ya que los glucocorticoides, estrógenos y hormonas tiroideas, así como la binefrectomía y la inflamación, aumentan el contenido hepático del ARNm de angiotensinógeno, y que existe una estrecha correlación entre los cambios del angiotensinógeno plasmático y los niveles hepáticos de su ARNm tanto en la disminución por adrenalectomía como en el aumento por el tratamiento con dexametasona,³⁵ es muy probable que la regulación de la síntesis de angiotensinógeno ocurra principalmente a nivel transcripcional, sin excluir la posible participación de los procesos postranscripcionales, tales como modificaciones en la estabilidad del ARNm o de la velocidad de traducción.⁷

El conocimiento que actualmente se tiene sobre el angiotensinógeno, gracias a la gran cantidad de técnicas bioquímicas y de biología molecular, sugieren que el angiotensinógeno puede tener otros papeles fisiológicos además de ser el sustrato de renina. Más aún, la identificación de la síntesis de angiotensinógeno en muchos tejidos donde el SRA puede tener un papel fisiológico, apoya el concepto de SRA locales, los cuales podrían ser más relevantes de lo que se pensaba inicialmente.⁷ Por último la regulación multifactorial de la síntesis de angiotensinógeno, la cual parece operar a nivel transcripcional, hace muy atractivo el estudio de la regulación de la expresión de este gen.⁷

Referencias

1. Cumin F, Le-n' guyen D, Castro B, Menard J, Corvol P. Comparative enzymatic studies of human renin acting on pure natural or synthetic substrates. *Biochem Biophys Acta* 1987; 913:10-9.
2. Genain C, Bouhnik J, Tewksbury D, Corvol P, Menard J. Characterization of plasma and cerebrospinal fluid human angiotensinogen and des-angiotensin I-angiotensinogen by direct radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 478-84.
3. Menard J, Catt KJ. Measurement of renin activity concentration and substrate in rat plasma by radioimmunoassay of angiotensin I. *Endocrinology* 1972; 90:422-30.
4. Poulsen K. Kinetics of the renin system: the basis for

- Nakamura Y, et al. Tissue-specific regulation of gene expression for renin and angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens* 1988; A10:1317-9.
76. Rosenberg ME, Chimielewski D, Hostetter TH. Effect of dietary protein on rat renin and angiotensinogen gene expression. *J Clin Invest* 1990; 85:1144-9.
77. Everett A, Scott J, Wilfong N, Marino B, Rosenkranz RP, Inagami T, et al. Renin and angiotensinogen expression during the evolution of diabetes. *Hypertension* 1992; 19:70-8.
78. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; 41:796-804.

Renina: estructura y regulación de la expresión del gen, biosíntesis y vías celulares de secreción

*María Elena Ibarra-Rubio

*José Pedraza-Chaverri

Resumen

El sistema renina angiotensina (SRA) juega un papel central en el control de la presión sanguínea y en el balance de líquidos y electrolitos. La activación de este sistema se inicia cuando la enzima renina actúa sobre el angiotensinógeno para producir el decapeptido angiotensina I, el cual es posteriormente convertido al octapéptido angiotensina II, el componente activo del SRA. Por medio de las técnicas de biología molecular se han producido avances muy importantes en nuestro conocimiento del SRA, lo cual tiene implicaciones terapéuticas muy importantes, ya que este sistema está involucrado en enfermedades como la hipertensión y la insuficiencia cardíaca. El gen de renina de rata y ratón está formado por nueve exones y ocho intrones; en cambio, el gen de renina humano consta de diez exones y nueve intrones. Sin embargo, los genes de estas tres especies miden aproximadamente 12 kb. En su región flanqueadora 5' están presentes los principales elementos de control que incluyen promotores e intensificadores, así como elementos regulatorios tales como los sitios de los receptores de glucocorticoides y estrógenos y las secuencias para la inducción por adenosín-monofosfato cíclico (AMPc). La acción combinada de estos elementos regula la expresión del gen y da por resultado una expresión específica de tejido. El conocimiento de la estructura del gen de renina puede ser útil para el diseño de inhibidores de su transcripción que disminuyan la producción de esta enzima. Además del control a nivel de la expresión de gen, la renina también se regula a nivel postraducciona l y de secreción. El producto de la

traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de renina es preprorenina, la cual se convierte cotraducciona lmente a prorenina, un precursor inactivo de la renina. Una parte de la prorenina se secreta constitutivamente, y otra se procesa intracelularmente a renina activa madura, la cual se almacena en gránulos de secreción a partir de los cuales se libera de una manera regulada. Actualmente se está investigando si hay alteraciones en la estructura y expresión del gen de renina que puedan estar involucradas en el desarrollo y mantenimiento de las formas experimental y clínica de la hipertensión.

Palabras clave: Renina, Sistema renina-angiotensina, Hipertensión, Angiotensinas, ADN recombinante, Biología molecular, ARN mensajero, Expresión génica, Regulación de expresión génica.

Abstract

Renin gene structure and regulation, biosynthesis and cellular pathways of secretion.

The renin angiotensin system plays a major role in the control of blood pressure and electrolyte balance. It consists of a cascade of proteolytic cleavages leading to the biologically active angiotensin II (AII). Renin acts on angiotensinogen to yield angiotensin I (AI). AI is a prohormone and must be cleaved to the octapeptide AII by the action of the angiotensin I converting enzyme. Application of recombinant DNA technology has made possible the cloning of the renin gene and its cDNA which has provided never insights into the regulation of renin gene expression, biosynthesis, and secretion. The

* Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.
Correspondencia a: M. en C. María Elena Ibarra-Rubio, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 1-1000 México, D.F.

Recibido el 18 de marzo de 1992. Aceptado para publicación el 20 de octubre de 1992.

information gained from such molecular biology techniques may contribute importantly to the efforts in the development of an effective renin inhibitor for the treatment of hypertension. The mouse and rat renin gene contains nine exons separated by eight intervening sequences, in contrast the human renin gene contains ten exons separated by nine introns. However, the renin gene of the three species spans 12 kb approximately. In its 5' flanking region, major control elements are present which include promoters and enhancers as well as regulatory elements such as estrogen and glucocorticoid receptor sites, and cAMP induction sequences. The combined action of these elements will result in tissue specific expression and regulation of the gene. In addition to the control at the gene expression level, renin is also regulated at the post-translational and secretory levels. The translational product of renin mRNA is preprorenin, which is cotranslationally cleaved to prorenin, an inactive precursor of renin. The majority of the new synthesized human prorenin is constitutively secreted. However, prorenin is also processed intracellularly and converted to the mature single chain active renin which is stored in secretory granules. Active renin is released by a regulated mechanism which can be stimulated by cAMP and other secretagogues. Studies are under way to examine the responses of renin gene expression, biosynthesis and secretion to various physiological conditions and to determine if there are alterations in the structure and expression of the renin gene that may be involved in the development of clinical and experimental hypertension.

Keywords: Renin, Renin-angiotensin system, Angiotensins, Hypertension, Molecular biology, Gene expression, Gene expression regulation, Messenger RNA, Recombinant DNA.

El sistema renina-angiotensina (SRA) está involucrado en la regulación de la presión sanguínea, el balance de flúidos, y otras funciones cardiovasculares y renales.¹ Es muy importante en la respuesta del organismo a la pérdida de flúidos, y las anomalías en el sistema están implicadas en la fisiopatología de la hipertensión e insuficiencia cardíaca, entre otras enfermedades. La renina es la molécula limitante de la producción de angiotensina II (AII) que es el componente biológicamente activo del SRA.¹ En la circulación y en diversos tejidos, la

renina rompe el angiotensinógeno para liberar el decapeptido angiotensina I (AI)¹ que es convertido a AII por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). Los inhibidores de la ECA se usan ampliamente en el tratamiento de la hipertensión y de la insuficiencia cardíaca debido a que bloquean la producción de AII.² Por lo tanto, la inhibición de la renina constituye una herramienta terapéutica para el tratamiento de esas enfermedades, ya que también de este modo se puede bloquear la producción de AII.^{3,4} Los efectos de los inhibidores de la renina y de ECA pueden ser diferentes, ya que la ECA hidroliza, además de la AI, otros sustratos,¹ mientras que la renina actúa sólo sobre un sustrato conocido a pesar de su gran homología con otras proteasas de aspartilo, tales como la pepsina, que son muy inespecíficas.⁵⁻⁸ El conocimiento de la estructura de la renina es la base para el diseño de tales inhibidores.⁹⁻¹¹

La principal fuente de renina circulante en el humano son las células yuxtglomerulares, en las cuales el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de renina se traduce en preprorenina que es procesada a prorenina durante su inserción en el retículo endoplásmico rugoso,^{1,12,13} la prorenina es catalíticamente inactiva,^{13,14} aunque se ha postulado que al sufrir cambios conformacionales puede activarse.¹⁵ Una parte de la prorenina se secreta constitutivamente^{16,17} y otra se procesa a renina activa en las células yuxtglomerulares por la ruptura proteolítica del segmento "pro" de 43 aminoácidos.^{13,14,16,17} La renina activa se almacena y puede liberarse en respuesta a varios estímulos como los agentes β -adrenérgicos.^{18,19} La renina, al igual que los demás elementos del SRA, se expresa en tejidos extrarrenales lo cual ha conducido a postular la existencia de SRA locales con funciones específicas del tejido.^{20,21} Se ha postulado que estos SRA locales pueden estar involucrados en diferentes patologías. Por lo tanto, es muy importante saber cómo se regula la liberación de renina, la expresión de su gen, y la conversión de prorenina a renina para el entendimiento del papel de esta enzima en diferentes estados fisiológicos y patológicos.

La hipertensión es una de las áreas en donde está teniendo mucho impacto la información básica sobre renina, generada recientemente gracias a las técnicas de biología molecular. Actualmente se está tratando de dilucidar si existen alteraciones en la estructura y expresión del gen de renina que puedan estar involucradas en el desarrollo y mantenimiento

de las formas experimental y clínica de la hipertensión.²²⁻²⁴

ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS DE LA RENINA

La renina (EC 3.4.23.15) es una glicoproteína clasificada como una proteasa de aspartilo ya que, a pesar de que es activa a un pH neutro (pH óptimo de 5.5-5.6), presenta muchas similitudes con el grupo de proteasas ácidas como pepsina, quimosina y catepsina;^{21,23} contiene dos residuos de ácido aspártico en su sitio activo que son esenciales para su actividad catalítica, es inhibida por pepstatina (un inhibidor de proteasas ácidas), y presenta una organización estructural similar (bilobal) a la de las proteasas ácidas. Además, la renina se parece a estas proteasas en su secuencia de aminoácidos, sitio activo, mecanismos de catálisis, zimógenos precursores^{5,34,35} y estructura tridimensional.⁶ El corazón estructural y el sitio activo de la renina están altamente conservados con respecto a las otras proteasas de aspartilo. Sin embargo, hay variaciones en los residuos de superficie que son críticos para las diferencias en la especificidad del sustrato. Estas incluyen las áreas de protuberancia,³⁶ los dominios carboxilo terminales que pueden afectar el perfil de pH (Ala-304), permitiendo que la renina tenga actividad a un pH relativamente alto de 5.5-7.5,³⁷ y los residuos de carbohidratos en los sitios de glicosilación, los cuales pueden afectar el tiempo de tránsito intracelular,³⁸ la velocidad de degradación de la renina circulante,³⁹ y la estabilidad de la prorrrenina.⁴⁰ A diferencia de las demás proteasas de aspartilo, que son inespecíficas, la renina es altamente selectiva, y actúa sólo sobre su sustrato específico (angiotensinógeno), en el cual escinde el enlace Leu10-Leu11 en rata, cerdo y caballo, o Leu10-Val11 en el humano, para liberar el decapeptido amino-terminal A1.

La secuencia de aminoácidos de la renina de rata se dedujo de la secuencia genómica y se ha comparado con la de otras especies.^{41,42} Las similitudes de extremo a extremo entre los precursores de renina están indicados por los siguientes porcentajes de homología en la secuencia de aminoácidos: rata/ratón Ren-1 85%, rata/ratón Ren-2 82%, y rata/humano 68%.^{41,42} La preprorrrenina de rata consta de 402 aminoácidos⁴³ y la de humano de 406 aminoácidos, con un segmento "pre" de 20 aminoácidos y un "pro" de 46.⁴³ El extremo amino de la forma madura de renina

de rata parece ser la Ser-65 aunque no existe una evidencia directa. Esta forma madura postulada consiste de 338 residuos de aminoácidos, 36 917 daltones, cercano a lo que está informado en la literatura para la renina de riñón de rata.^{44,45} Las secuencias que rodean los dos residuos de aspartilo importantes catalíticamente, Fen-Asp-Tre-Gli-Ser en las posiciones 101-105 y Val-Asp-Tre-Gli en las posiciones 286-289, están completamente conservadas en la renina de las tres especies. Estas secuencias catalíticamente importantes son idénticas a otras proteasas de aspartilo.⁴⁶ En la renina de rata están presentes tres sitios potenciales de glicosilación en grupos amino, Asn-X-Ser/Tre, en las posiciones 69, 139 y 320.⁴¹

La preprorrrenina se internaliza cotraduccionalmente al retículo-endoplásmico rugoso donde es hidrolizada por una peptidasa, eliminándose así el péptido señal o segmento "pre" (figura 1). Posteriormente, la prorrrenina atraviesa el retículo-endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi donde es glicosilada. El grado de glicosilación y el contenido total de carbohidratos es variable, tanto en la renina producida por el riñón como en la producida por fuentes extrarrenales.^{47,48} Del aparato de Golgi, la prorrrenina puede seguir cualquiera de las siguientes tres vías: de secreción regulada, de secreción constitutiva o la de degradación en lisosomas. Los residuos de carbohidratos son

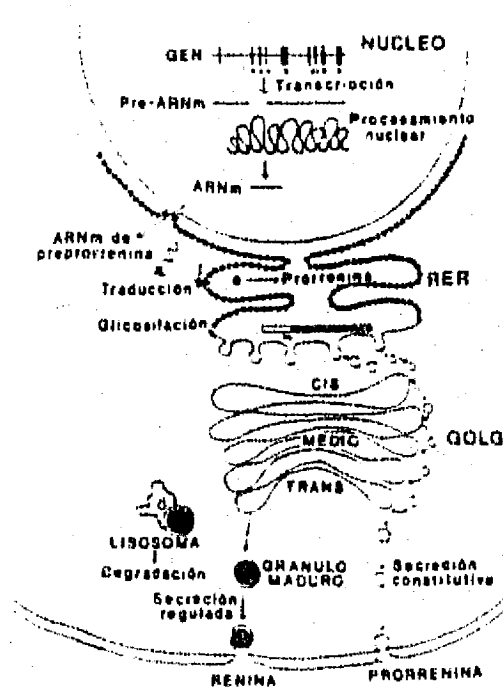


Figura 1. Biosíntesis y procesamiento intracelular de renina en el riñón.

indispensables para que la prorrrenina entre a los lisosomas.^{49,50} No se conoce el porcentaje de renina celular que entra a este orgánulo; sin embargo, parece que es relativamente bajo.⁴⁹ Al bloquear la glicosilación con tunicamicina³⁸ o mutando los sitios de glicosilación⁵¹ se encontró que la renina se secreta más rápido, y que la prorrrenina se procesa más rápidamente a renina. Esto sugiere que los carbohidratos aumentan el tiempo de tránsito intracelular, y retardan el procesamiento de la prorrrenina.

La renina activa es el producto principal de la vía de secreción regulada.^{52,53} En esta vía, las proteínas de secreción se almacenan en gránulos densos, en donde, además, se lleva a cabo el último paso en la maduración de estas proteínas, esto es, la conversión de la proteína precursora a proteína madura, y a partir de estos gránulos densos se libera la proteína de manera aguda después de la estimulación por un secretagogo.^{54,55} La maduración de la prorrrenina a renina en gránulos densos de secreción está apoyada por dos hallazgos: a) sólo se encuentra prorrrenina en los gránulos inmaduros y no en los maduros;⁵⁶ y b) la prorrrenina no se convierte a renina, y se secreta sin cambios, en las células que sólo tienen vías constitutivas de secreción;^{47,53} en cambio, sí se procesa a renina en células que contienen gránulos de secreción a partir de los cuales se libera en respuesta a secretagogos como el 8-bromo-adenosín monofosfato cíclico (8-Br-AMPC).^{52,53}

La prorrrenina es el producto de secreción de la vía constitutiva.^{52,53} Esta vía no se regula de manera aguda, y libera la proenzima a una velocidad constante.⁵⁴ En células de decidua humana que secretan prorrrenina, la forskolina (un activador directo de la adenilato ciclasa) no estimula la secreción aguda de prorrrenina.⁵⁷ En estas células, la prorrrenina se localiza en vesículas translúcidas¹¹ a diferencia de las células yuxtglomerulares en donde la renina se concentra en gránulos densos de secreción.

Se desconoce qué factores determinan que el aparato de Golgi envíe prorrrenina a la vía constitutiva o a la regulada. Se han realizado varios experimentos para tratar de investigar el o los factores responsables. Por ejemplo, la eliminación de los sitios de glicosilación o del segmento "pro", o el intercambio del péptido señal de una proteína que se secreta constitutivamente, no impiden que la renina se secrete de manera regulada.⁵¹ Más aún, si

se impide por medio de mutaciones que la prorrrenina se procese a renina, no se evita que la prorrrenina se secrete reguladamente.⁵⁸ Estos datos sugieren que la información para la selección que hace el Golgi no está contenida en los segmentos "pre" o "pro". En resumen, los datos anteriores indican que la síntesis y secreción de renina es compleja y puede estar sujeta a regulación en múltiples pasos.

Hoy en día está claro que la renina inactiva que se encuentra en el plasma es prorrrenina o renina no procesada, y que tanto la renina activa como la inactiva provienen de un mismo gen.¹¹ El hecho de que la prorrrenina constituye un gran porcentaje (70-90%) de la renina total en el plasma humano⁵³ puede deberse a que ésta se secreta constitutivamente.

Originalmente se descubrió la existencia de la renina inactiva (prorrrenina) porque se activaba por acción de la tripsina y de la pepsina;⁵⁹ sin embargo, se ha demostrado que esta activación puede llevarse a cabo por proteasas de cualquier clase (de serina, de aspartilo, de tiol y metaloproteasas). Entre las proteasas que activan la prorrrenina están las catepsinas B y D, las cuales coexisten con la renina en los gránulos de las células yuxtglomerulares, por lo que cualquiera podría estar involucrada en la activación de la prorrrenina dentro de estas células.⁶⁰

ESTRUCTURA DEL GEN Y DEL ARNm

Ya se conoce la secuencia nucleotídica completa del gen de renina de rata,^{41,42} humano^{7,43,61} y ratón.^{62,64} Por la técnica de "Southern blot" parece que hay un solo gen por genoma haploide que codifica para renina en la rata⁴¹ y en el humano;⁸ sin embargo, hay cepas de ratón que tienen un solo gen (Ren-1) como BALB/c, C3H, C57B1/6 y CBA, y otras que presentan dos genes de renina (Ren-1 y Ren-2) como las cepas AKR, Suiza, Quackenbush y DBA/2.^{63,64} En el humano, el gen de renina se localiza en el cromosoma 1 en la región q32.^{65,67} El gen de renina de rata es de aproximadamente 11 000 pares de bases de longitud y consiste de nueve exones interrumpidos por ocho intrones. La estructura general del gen de renina de rata está representada en la figura 2. Los exones 1 a 9 tienen una longitud de 124, 151, 124, 119, 197, 120, 145, 199 y, aproximadamente, 356 nucleótidos respectivamente; en cambio, la longitud de los intrones I a VIII es mucho más heterogénea: 4466,

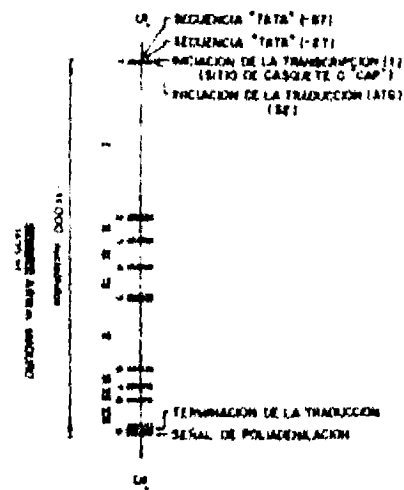


Figura 2. Estructura del gen de renina de rata. Las barras negras indican la posición y longitud proporcional de los exones. Las líneas entre las barras indican los intrones también en posición y longitud proporcional (datos exactos en el texto). Los números arábigos indican el nombre que corresponde a cada exón y los números romanos a cada intrón. Los números entre paréntesis indican la posición tomando como nucleótido número 1 el sitio de iniciación de la transcripción. nt = nucleótido.

510, 657, 751, 1918, 376, 264 y 664 nucleótidos.⁴¹ Por lo tanto, el ARNm de renina de rata mide aproximadamente 1435 nucleótidos.^{41,42} El gen de renina de ratón también está compuesto por nueve exones y ocho intrones;^{61,64} en cambio, el gen de renina de humano está compuesto por diez exones y nueve intrones,⁴³ ya que en este gen se presenta la inserción de un exón muy pequeño (de nueve nucleótidos) entre los exones 5 y 6, denominado exón 5A. Este pequeño exón codifica para tres aminoácidos adicionales (Asp-165, Ser-166, Glu-167) que no están presentes en la renina de rata o de ratón.⁷ Cuando el gen de renina se compara con el de pepsinógeno, se observa una estructura muy similar; sin embargo, este gen tampoco presenta esta inserción del exón 5A.⁸

La secuencia de los genes de ratón, pero no la de los genes de rata y humano, revela la presencia de una larga inserción en el flanco 5' en los genes Ren-1 y Ren-2.⁶⁸ Sólo en el gen Ren-2 está presente una segunda inserción más corta, aparentemente no relacionada con la primera. Estas características estructurales podrían explicar el por qué los genes de ratón están regulados por diferentes estímulos con respecto a las demás especies estudiadas.⁶⁸ Los ratones que presentan la duplicación del gen de

renina, es decir, que tienen los genes Ren-1 y Ren-2, presentan altos niveles de renina en la glándula submandibular, y las cepas de ratones que sólo tienen el gen Ren-1 presentan bajos niveles.⁶⁸ En este órgano, el gen Ren-1 codifica para una proteína termoestable glicosilada indistinguible de la enzima de riñón; en cambio, el producto del gen Ren-2 es una enzima excretada por saliva, termolábil y no glicosilada.⁶⁸ En la glándula submandibular, el gen Ren-2 se expresa por lo menos cien veces más que el gen Ren-1; en cambio, en riñón ambos genes, Ren-1 y Ren-2, se expresan al mismo nivel; sin embargo, sólo se ha podido detectar el producto proteínico del gen Ren-1.⁶⁸ En la glándula submandibular de rata no se transcribe el gen de renina.⁶⁸

En la región precedente al sitio putativo de iniciación de la transcripción del gen de renina, existen varios posibles promotores y elementos regulatorios. Hay dos secuencias "TATA" en el gen de renina de rata,⁴¹ humano⁶⁹ y ratón.⁷⁰ Las secuencias que rodean las dos "TATA box", y una región que corresponde a las posiciones -400 a -325 para los genes de rata y humano, o -1260 a -1185 para el gen de ratón (Ren-2), son regiones bien conservadas entre estas especies.⁶⁸ Es posible que esta región esté involucrada en la expresión de renina en riñón.⁶⁸ Al menos en ratón ya se ha demostrado que las dos "TATA box" son promotores activos.⁷⁰ En la tabla 1 se enlistan las principales regiones regulatorias que se han descrito en el gen de renina. El que se haya indentificado estructuralmente un elemento regulatorio no necesariamente significa que éste sea funcional.

La secuencia para la inducción por AMPc es una secuencia conservada en los genes de rata, ratón y humano,⁶⁹ y se ha demostrado que es un elemento funcional en los dos genes de ratón, ya que ambos responden al β -Br-AMPc aumentando la transcripción tres veces.⁷¹

Funcionalmente también se han identificado al menos dos secuencias de control positivas, una de las cuales actúa como un intensificador clásico, y está en una región bien conservada en todas las especies estudiadas,⁶⁹ y un elemento de control negativo en el gen de renina humano. Este último es activo en cualquier orientación por lo que se define como un silenciador, aunque aún queda por probar si este silenciador es específico del gen de renina o puede actuar en otras secuencias de intensificadores génicos.⁶⁹ En la región flanqueadora 5' de los dos

Tabla 1. Elementos regulatorios del gen de renina identificados estructural y/o funcionalmente

Elemento	Especie	Referencias
Secuencia TATA (2)	Rata	41
	Humano	69
	Ratón	70
Sitio del receptor de estrógenos	Rata	41
	Humano	71
Sitio del receptor de glucocorticoides	Rata (2)	41
	Humano (1)	7,8,71
Intensificador SV40	Rata (2)	41
	Humano (4)	71,72
Secuencia para la inducción por AMPc	Rata	41
	Humano (2)	69,71,72
	Ratón	73
Intensificador	Humano	69
Silenciador	Humano	69
	Ratón	73,74
Secuencia para los complejos que unen el receptor de progesterona	Humano (2)	71
Intensificador de polioma	Humano	71

Los números entre paréntesis son el número de veces que se repite ese elemento regulatorio.

genes de renina de ratón también se ha encontrado un elemento negativo putativo (silenciador), aunque sólo es funcional en el gen Ren-1, y no en el gen Ren-2.⁷¹

La función de las secuencias de control negativas puede ser inhibir la expresión de los genes en tipos celulares donde ésta sería inapropiada. En otros tejidos, donde la expresión del gen se requiere, estas secuencias silenciadoras podrían ser inactivas, teniendo probablemente un papel positivo, es decir estimulando la expresión.⁶⁹

Entonces, al comparar las secuencias flanqueadoras 5' del gen de renina de humano, rata y ratón se ha encontrado gran homología en los 496 pares de bases a partir del principal sitio de iniciación de la transcripción (de acuerdo a las coordenadas del gen de humano).⁶⁹ La alineación de las secuencias revela al menos 11 bloques de homología. Cada bloque tiene la misma posición relativa en cada especie (tomando en cuenta la inserción de 476 pares de bases en el ratón), son de nueve a 29 pares de bases de longitud y la mayoría son homólogos en más del 80%.⁶⁹

En los intrones del gen de renina de rata también se han encontrado varias secuencias interesantes; sin embargo, aun no se conoce el papel que estas pudieran tener.⁴¹

NIVEL DE REGULACION Y CONDICIONES QUE ALTERAN LA SINTESIS DE RENINA

La síntesis y secreción de renina se modifican en respuesta a varias situaciones fisiológicas y farmacológicas tales como la concentración de sodio en la dieta y los inhibidores de ECA (captopril y enalapril). Actualmente se está estudiando la regulación de la síntesis de renina a nivel de su ARNm, no sólo en el riñón, sino en otros tejidos que también la sintetizan.

Se ha encontrado que en ratas con dieta alta en sodio, la concentración plasmática de renina (CPR), el contenido renal de renina (CRR) y su ARNm renal disminuyen 88, 90 y 75% respectivamente.⁷⁵ Con la dieta baja en sodio la CPR, el CRR y el ARNm de renina aumentan 17, 2.5 y 4.5 veces respectivamente, y esta inducción se magnifica cuando estas ratas se tratan con captopril.⁷⁵ Como se puede observar, los cambios en el ARNm de renina, en el CRR y en la CPR con las dietas de sodio no son de la misma magnitud.⁷⁵ Observaciones similares se han obtenido en ratas depletadas de sodio y tratadas con captopril sometidas a la infusión de AI. La AI disminuye la concentración circulante de renina, pero no modifica el CRR ni los niveles renales del ARNm de renina.⁷⁶ Todo esto indica que

la síntesis de renina está regulada principalmente por mecanismos postranscripcionales. Es posible que la velocidad de traducción de la renina renal sea proporcional al nivel de su ARNm. Sin embargo, después de la síntesis de renina, los mecanismos postraduccionales (degradación intracelular o almacenamiento) y la subsecuente secreción pueden modificar los valores relativos de CRR y CPR bajo diferentes estímulos.⁷⁵

Se ha visto que la depleción de sodio también induce un aumento del ARNm de renina en el corazón y en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales, pero no los afecta en testículo ni en glándula submandibular de ratón.⁷² Asimismo, la depleción de sodio aumenta los niveles del ARNm de renina en la zona glomerulosa de las glándulas adrenales de rata.⁷⁷

El enalapril, otro inhibidor de la ECA, también tiene una profunda influencia sobre la expresión del gen de renina. Se ha encontrado que la administración del enalapril a ratas^{76,81} y a ratones⁸² induce un aumento en los niveles del ARNm en riñón y en los niveles circulantes de esta proteína. Se piensa que esta estimulación se debe a que hay una supresión de la retroalimentación negativa mediada por Ang II sobre la expresión de renina.

También se han estudiado las alteraciones en la distribución intrarrenal de renina y de su ARNm en varias situaciones farmacológicas, fisiológicas o patológicas. Gómez y cols⁸³ informaron que en ratas normales, el ARNm de renina, detectado por hibridación *in situ*, está confinado a la zona yuxtaglomerular, y en ratas tratadas con enalapril durante cinco días, éste se extiende a la arteriola aferente. El aumento en la expresión del gen de renina renal producido por la inhibición de la ECA es el resultado de un aumento en el contenido de ARNm de renina por aparato yuxtaglomerular, de un aumento en el número de aparatos yuxtaglomerulares que expresen el gen de renina, y de un restablecimiento de células que expresan el gen de renina a lo largo de la arteriola aferente.⁸¹ Por otra parte, Johns y cols⁸¹ observaron, además, que también aumenta la distribución de la proteína a lo largo de la arteriola aferente, sin embargo este aumento no cambia con la infusión de Ang II.

Otras situaciones bajo las cuales se ha observado el reclutamiento de síntesis de renina por estructuras y células que habitualmente no la sintetizan son: ablación renal subtotal,⁸⁴ deficiencia de mineralocorticoides,⁸⁵ y pielonefritis crónica.⁸⁶

También se ha estudiado el efecto de los inhibidores de renina sobre los niveles de su ARNm. En monos típicos depletados de sodio, la administración de los inhibidores de renina ES-1005⁸⁷ y ES-8891⁸⁸ disminuye significativamente el nivel de su ARNm en riñón. Por lo tanto, estos inhibidores de renina no sólo inhiben la actividad de la enzima del plasma o de los tejidos, sino que también suprimen su síntesis en riñón.^{87,88}

Los agonistas β -adrenérgicos, como el isoproterenol, no solo aumentan la secreción de renina, sino que también aumentan los niveles de su ARNm en riñón de ratón.⁷² De acuerdo con estos datos, la forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, aumenta la concentración de AMPc y del ARNm de renina cuando se adiciona al medio de cultivo de arteriolas y de células arteriolas liberadoras de renina aisladas de riñón de rata recién nacida.⁸⁹ Estos efectos del AMPc sobre los niveles del ARNm de renina muy probablemente estén mediados por el elemento de respuesta a AMPc que se ha encontrado en su gen.^{41,69}

Ludwig y cols^{79,90} encontraron que en riñón de ratas adrenalectomizadas 48 horas antes del sacrificio, el ARNm de renina aumenta paralelamente a la secreción de la enzima, al igual que con las dietas de sodio⁷⁵ y con el tratamiento con enalapril.⁷⁸

El tratamiento de ratas con el diurético furosemida induce una elevación de la APR y de la concentración de Ang II. Asimismo, induce un aumento moderado en el ARNm de renina en adrenales, cerebro y corazón por un factor de 2.5, 1.4 y 2.4 respectivamente.⁹⁰ De acuerdo con estos datos, cuando las ratas se tratan con depleción de sodio más furosemida, también se ha observado que el ARNm de renina aumenta en riñón.^{79,90}

En ratas espontáneamente hipertensas de cinco semanas de edad, antes de que desarrollen la hipertensión, se ha encontrado que los niveles del ARNm de renina aumentan en riñón, hígado, cerebro, glándula adrenal y corazón, pero no en aorta.⁹¹ A las 12 semanas, cuando la hipertensión ya está establecida, los niveles elevados de este ARNm persisten en hígado, cerebro y adrenales, pero no en riñón, mientras que en aorta y corazón disminuyen. De acuerdo con estos datos, otros autores⁹² han encontrado que los niveles de renina aumentan en las glándulas adrenales antes de que se presente la hipertensión. Por otro lado, se han encontrado diferencias en la respuesta del ARNm de renina a

algunos estímulos en las ratas con este tipo de hipertensión. Kitami y cols⁹¹ estudiaron ratas con hipertensión espontánea cuyos niveles circulantes de renina, así como de su ARNm renal, son iguales que en ratas normales. Ellos encontraron que la depleción de sodio y el tratamiento con captopril aumentan de igual manera la APR en ratas normales y en ratas con hipertensión espontánea, pero el aumento en el ARNm renal de renina es mayor en las ratas con hipertensión espontánea.

Los experimentos que se han hecho con ratas espontáneamente hipertensas indican que hay una anomalía general de la expresión del gen de renina, la cual es modulada en algunos tejidos por el desarrollo de la hipertensión. Además, estos datos sugieren que el SRA juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión.⁹¹

En ratas con hipertensión inducida por la coartación de la aorta entre las dos arterias renales o por un clip en la arteria renal izquierda, el contenido de ARNm de renina del riñón hipertrofiado contralateral disminuye transitoriamente a niveles indetectables, mientras que el riñón isquémico presenta aumentos transitorios de 10 a 16 veces en el ARNm de renina.⁹⁴ Aunque existen estos aumentos transitorios, la magnitud de este incremento no es suficiente para explicar el aumento de 30 a 50 veces de la APR. Mientras que en el riñón isquémico el ARNm de renina puede aumentar 12-16 veces, el ARNm de renina total observado en ambos riñones (derecho + izquierdo) aumenta sólo 6-8 veces. De igual manera, el aumento transitorio en el ARNm de renina en el riñón es inconsistente con el aumento de sólo dos veces en la actividad en la enzima lisular del riñón isquémico. Estos datos indican una vez más que, además de las alteraciones en el reservorio renal de ARNm de renina, el procesamiento postraduccional y/o la liberación de renina del riñón también contribuyen para regular los niveles plasmáticos de renina en estos modelos experimentales.⁹⁴

La nefrectomía bilateral tanto en ratas hipertensas como normales induce un aumento de la renina adrenal. La corteza adrenal presenta más renina que la médula, y la diferencia entre la cepa hipertensa y la normotensa es más prominente en la corteza que en la médula.⁹² Baba y cols⁹³ encontraron que hay tres factores que influyen en la respuesta de la renina adrenal a la nefrectomía: 1) la pituitaria, a través de la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH); 2) una estimulación

directa por altos niveles plasmáticos de potasio; y 3) la ausencia de la retroalimentación negativa de la AL.

El contenido de ARNm de renina aumenta tres veces en ovario de ratas inmaduras tratadas con la hormona estimuladora de foliculo, lo cual es consistente con el contenido total de renina en el ovario, y parece que es una respuesta específica del ovario ya que en el útero el ARNm disminuye gradualmente.⁹⁶ En ratas hipofisectomizadas, la concentración total de renina en ovario se estimula por el estrógeno así como por la hormona estimuladora del foliculo. Todo esto sugiere que la producción ovárica de renina está regulada por hormonas de la pituitaria, particularmente la hormona estimuladora del foliculo.⁹⁶

El ARNm renal de renina se eleva en una dieta de proteínas al 50%, y disminuye en una dieta al 6%, comparadas con una dieta normal de proteínas al 20%.⁹⁷ El aumento de las proteínas en la dieta induce hipertrofia renal; sin embargo, el ARNm de renina no cambia en la hipertrofia inducida por uninefrectomía, indicando que los cambios observados en la dieta alta en proteínas se deben a ésta y no a la hipertrofia que produce.⁹⁷ Por lo tanto, el nivel de proteínas en la dieta es un estímulo más que induce cambios en el ARNm renal de renina.

Como se puede observar, se conoce poco acerca de la regulación de la expresión del gen de renina en el humano; sin embargo, en base al alto grado de homología de las secuencias de la región flanqueadora 5' del gen de humano con las de gen de renina de rata, se puede suponer que existen similitudes en la regulación de la expresión de los genes de renina entre estas dos especies.

En la tabla 2 se enlistan los estímulos que alteran los niveles del ARNm de renina.

Los resultados obtenidos en los trabajos en los que se han estudiado al mismo tiempo los cambios en los niveles de los ARNm de angiotensinógeno y renina, sugieren que la actividad transcripcional de ambos genes (o el recambio de sus ARNm) puede estar regulada de manera no coordinada bajo varias condiciones fisiológicas, y que mecanismos diferentes pueden controlar la expresión de los genes de renina y angiotensinógeno bajo estas condiciones. Por ejemplo, mientras que Ingelfinger y cols⁹⁸ encontraron que los niveles del ARNm de renina y de angiotensinógeno aumentan en la corteza renal de ratas depletadas de sodio, Gómez y cols¹⁰² no encontraron cambios significativos en la

Tabla 2. Estímulos que alteran los niveles del ARNm de renina

Estímulo	Alteración	Tejido	Especie	Referencias
Dieta baja en sodio	+	Riñón	Rata	75,76,79, 80,93,98
			Ratón	99
	+	Corazón	Ratón	72
		Adrenal	Rata	77
	=	Testículo	Ratón	72
		GSM	Ratón	72
Dieta alta en sodio	--	Riñón	Rata	75
			Ratón	100
Dieta alta en proteínas	+	Riñón	Rata	97,101
Dieta baja en proteínas	-	Riñón	Rata	97
Angiotensina II	-	Riñón	Rata	81
	=	Riñón	Rata	76
Captopril	+	Riñón	Rata	75,93
			Ratón	99
Enalapril	+	Riñón	Rata	79,83, 102
			Ratón	82
Inhibidores de renina (ES-1005, ES-6891)	-	Riñón	Mono	87,88
Activación β -adrenérgica	+	Riñón	Ratón	72
Forskolina	+	Arteriolas	Rata	89
		Células de arteriolas		
Spirolactona	+	Riñón	Ratón	99
Adrenalectomía	+	Riñón	Rata	79,80
Furosemida	+	Adrenal	Rata	79,80,90
	-	Cerebro	Rata	90
	+	Corazón	Rata	90
Neirectomía bilateral	+	Adrenal	Rata	92,95
Hipertensión renovascular experimental	+	Riñón IL	Rata	94
	-	Riñón CL		
Hipertensión espontánea	+	Adrenal	Rata	91,92
	=	Riñón	Rata	91,93
	+	Hígado	Rata	91
	+	Cerebro	Rata	91
	-	Aorta	Rata	91
	-	Corazón	Rata	91
Diabetes inducida	+	Riñón	Rata	103
Diabetes espontánea aguda crónica	-	Riñón	Rata	104
	--	Riñón	Rata	104
Castración	-	Corazón	Ratón	72
	-	Adrenal	Ratón	72
	-	Testículo	Ratón	72
	+	GSM	Ratón	72
	=	Riñón	Ratón	72
Hormona estimuladora del folículo	+	Ovario	Rata	96
Desarrollo	-	Riñón	Rata	105
Trioxotromina	-	Riñón	Rata	106

(+) Aumento, (-) Disminución, (=) Sin cambios, Riñón IL = Riñón ipsilateral, Riñón CL = Riñón contralateral.
GSM = Glándula submandibular.

acumulación del ARNm de angiotensinógeno, pero sí un marcado aumento de los niveles del ARNm de renina durante la inhibición de la ECA con enalapril. Kimura y cols¹⁰⁶ encontraron que con el tratamiento con triyodotironina no cambian los niveles del ARNm de angiotensinógeno ni de renina en el riñón; sin embargo, en el hígado, el ARNm de angiotensinógeno aumenta. Rosenberg y cols⁹⁷ han observado que con una dieta alta en proteínas, el ARNm de renina aumenta en el riñón; en cambio, el ARNm de angiotensinógeno no cambia ni en riñón ni en hígado.

Las alteraciones de los ARNm de renina y/o angiotensinógeno en diferentes tejidos, demuestran a nivel molecular que los SRA tisulares participan en la respuesta a los estímulos que activan el sistema circulante. Más aun, esta respuesta parece ser específica de tejido, sugiriendo la posibilidad de mecanismos regulatorios independientes en los diferentes órganos.⁹⁰

Finalmente, la nueva información básica generada con las técnicas de biología molecular acerca de la estructura y regulación de la expresión del gen de renina y de la estructura de la proteína, se está utilizando en el diseño de inhibidores no sólo de la actividad de renina sino también de la expresión de su gen, para aplicarlos en el tratamiento de la hipertensión. Por otra parte, esta información seguramente servirá de base para que, en un futuro cercano, conozcamos las bases moleculares de las alteraciones del gen de renina que estén involucradas o puedan ser responsables de la hipertensión.

Referencias

- Ballerman BJ, Zeidel ML, Gunning ME, Brenner BM. Vasoactive peptides and the kidney. En: Brenner BM, Rector FC. *The kidney* 4a ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991: 510-83.
- Williams GH. Converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N Engl J Med* 1988; 319:1517-25.
- Hutchins C, Greer J. Comparative modeling of proteins in the design of novel renin inhibitors. *CRC Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26:77-127.
- Fischli W, Clozel J-P, El Amrani K, West W, Neidhart W, Stadler H, et al. Ro 42-5892 is a potent orally active renin inhibitor in primates. *Hypertension* 1991; 18:22-31.
- James MNG, Sielecki AR. Structure and refinement of penicillopepsin at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1983; 163:299-361.
- Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, Murphy MEP, Fraser M, Muir AK, et al. Structure of recombinant human renin, a target of cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* 1988; 243:1346-51.
- Miyazaki H, Fukamizu A, Hirose S, Hayashi T, Horii H, Ohkubo H, et al. Structure of the renin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5999-6003.
- Hardman JA, Hort YJ, Calanzano DI, Tellam JT, Baxter JD, Morris BJ, et al. Primary structure of the human renin gene. *DNA* 1984; 3:457-68.
- Corvol P, Ménard J. From the renin gene to renin inhibitors. *Adv Nephrol* 1987; 16:17-36.
- Morris BJ. Human renin protein and gene structure: present and future targets for renin blockade in treatment of hypertension. *J Hypertens* 1989; 7 (Suppl 2):S9-14.
- Corvol P, Cahuveau D, Jeunemaitre X, Ménard J. Human renin inhibitor peptides. *Hypertension* 1990; 16:1-11.
- Baxter JD, James MNG, Chu WN, Duncan K, Haldar MA, Carilli CT, et al. The molecular biology of the human renin and its gene. *Yale J Biol Med* 1989; 62: 493-501.
- Hsueh WA, Baxter JD. Human prorenin. *Hypertension* 1991; 17:469-79.
- Hsueh WA, Shun Do Y, Shinagawa T. Biochemical similarity of expressed human prorenin and native inactive renin. *Hypertension* 1986; 8:11-78-83.
- Heinrikson RL, Hui H, Zürcher-Neely H, Poorman RA. A structural model to explain the partial catalytic activity of human prorenin. *Am J Hypertens* 1989; 2:367-80.
- Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Ménard J, Schambelan M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans: studies using a direct immunoradiometric assay. *J Clin Invest* 1989; 83:679-87.
- Pratt RE, Carlton JE, Richie JP, Heusser C, Dzau VJ. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7837-40.
- Pedraza-Chaverri J, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E. Mensajeros intracelulares en la regulación de la secreción de renina. *Rev Invest Clin* 1989; 41: 165-76.
- Pedraza-Chaverri J, Alatorre-González MC, Ibarra-Rubio ME, Peña JC, García-Sáinz JA. Effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. *Lif Sci* 1984; 35:1683-9.
- Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988; 77(Suppl 1): I-4-13.
- Johnston CI. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs* 1990; 39 (Suppl 1):21-31.
- Morris BJ. The renin gene in hypertension. *Today's Life Science* 1990; 2:36-43.
- Krieger JE, Dzau VJ. Molecular biology of hypertension. *Hypertension* 1991; 18(Suppl 1):I 3-17.
- Morris BJ. Molecular genetics links renin to hypertension. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 75:C13-8.
- Zee RYL, Ying L-H, Morris BJ, Griffiths LR. Association and linkage analyses of restriction fragment length polymorphisms for the human renin and antithrombin III genes in essential hypertension. *J Hypertens* 1991; 8:825-30.
- Dzau VJ, Paul M, Nakamura N, Pratt RE, Ingelfinger JR. Role of molecular biology in hypertension research. *Hypertension* 1989; 13:731-40.
- Soubrier E, Houot AM, Jeunemaitre X, Plouin PF, Corvol P. Molecular biology as a tool for genetic research in hypertension: application to the renin gene. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(Suppl 3):S155-9.
- Makrides SC, Mulinari R, Zannis V, Gavras H. Regulation of renin gene expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1988; 12:405-10.
- Soubrier E, Corvol P. Clinical implications of the molecular biology of the renin-angiotensin system. *Eur Heart J* 1990; 11 (Suppl D):3-10.

30. Rapp JP, Wang S-M, Dene H. A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science* 1989;243:542-4.
31. Dene H, Wang S-M, Rapp JP. Restriction fragment length polymorphisms for the renin gene in Dahl rats. *J Hypertens* 1989;7:121-6.
32. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990;344:541-4.
33. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 1990;70:1067-116.
34. James MNG, Sielecki AR. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature* 1986;319:33-8.
35. Bott R, Subramanian E, Davies DR. Three-dimensional structure of the complex of the *Rhizopus chinensis* carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å resolution. *Biochemistry* 1982;21:6956-62.
36. Fehrentz JA, Heltz A, Seyer R, Fulcrand P, Devillers R, Castro B. Peptides mimicking the flap of human renin: synthesis, conformation and antibody recognition. *Biochemistry* 1988;27:4071-8.
37. Yamauchi T, Nagahama M, Hori H, Murakami K. Functional characterization of Asp-317 mutant of human renin expressed in COS cells. *FEBS Lett* 1988;230:205-8.
38. Paul M, Nakamura N, Pratt RE, Dzau VJ. Glycosylation influences intracellular transit time and secretion rate of human prorenin in transfected cells. *J Hypertens* 1988;6(Suppl):S487-9.
39. Kim S, Hiruma M, Ikemoto F, Yamamoto K. Importance of glycosylation for hepatic clearance of renal renin. *Am J Physiol* 1988;225:E642-51.
40. Hori H, Yoshino T, Ishizuka Y, Yamauchi T, Murakami K. Role of N-linked oligosaccharides attached to human renin expressed in COS cells. *FEBS Lett* 1988;232:391-4.
41. Fukamizu A, Nishi K, Cho T, Saitoh M, Nakayama K, Ohkubo H, et al. Structure of the rat renin gene. *J Mol Biol* 1988;201:443-50.
42. Burnham CH, Hawelu-Johnson CL, Frank BM, Lynch KR. Molecular cloning of rat renin cDNA and its gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5605-9.
43. Imai T, Miyazaki H, Hirose S, Hori H, Hayashi T, Kageyama R, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:7405-9.
44. Matoba T, Murakami K, Inagami T. Rat renin: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1978;526:560-71.
45. Figueiredo AFS, Takii Y, Tsuji H, Kato K, Inagami T. Rat kidney renin and cathepsin D: purification and comparison of properties. *Biochemistry* 1983;22:5476-81.
46. Murakami K, Hirose S, Miyazaki H, Imai T, Hori H, Hayashi T, et al. Complementary DNA sequences of renin. *Hypertension* 1984;6:195-100.
47. Fritz LC, Arsten AE, Dzau VJ, Atlas SA, Baxter JD, Fiddes JC, et al. Characterization of human prorenin expressed in mammalian cells from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4114-8.
48. Sessler FM, Jackes JA, Malvin RL. Different production and decay rates of six renin forms isolated from rat plasma. *Am J Physiol* 1988;250:E551-7.
49. Faust PL, Chirgwin JM, Kornfeld S. Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J Cell Biol* 1987;105:1947-55.
50. Landenheim RC, Seidsh N, Lutfalla C, Rougeon F. Stable and transient expression of mouse submaxillary gland renin cDNA in AtT20 cells. Proetolytic processing and secretion. *FEBS Lett* 1989;246:70-4.
51. Chu WM, Carilli C, Hsieh W, Do YS, Shnegawa T, Baxter JD, et al. Protein engineering of human renin: role of prosegment aminoacids and glycosylation. *Clin Res* 1989;37:604A.
52. Fritz LC, Haidar MA, Arsten AE, Schilling JW, Carilli C, Shine J, et al. Human renin is correctly processed and targeted to the regulated secretory pathway in mouse pituitary AtT-20 cells. *J Biol Chem* 1987;262:12409-12.
53. Pratt RE, Flynn JA, Hobart PM, Paul M, Dzau VJ. Different secretory pathways of renin from mouse cells transfected with the human renin gene. *J Biol Chem* 1987;263:3137-41.
54. Kelly RB. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 1986;230:25-32.
55. Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Madsen O, Vassalli JD, Perrelet A. Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. *Cell* 1985;42:671-81.
56. Taugner R, Murakami K, Kim SJ. Renin activation in juvenile secretory granules: Immunocytochemical experiments with an antiserum directed against the prosegment of human renin. *Histochemistry* 1986;85:107-9.
57. Do YS, Macaulay L. Membrane-bound vesicles mediate constitutive secretion of human prorenin in extrarenal tissue. *Endocrine Society Meeting, Seattle, Wash, USA, Junio 1989.*
58. Nakayama K, Nagahama M, Kim WS, Matsuzawa K, Mashiba K, Murakami K. Prorenin is sorted into the regulated secretory pathway independent of its processing to renin in mouse pituitary AtT-20 cells. *FEBS Lett* 1989;257:89-92.
59. Morris BJ, Lumbers ER. The activation of renin in human amniotic fluid by proteolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1972;289:385-91.
60. Morris BJ. New possibilities for intracellular renin and inactive renin now that the structure of the human renin gene has been elucidated. *Clin Sci* 1986;71:345-55.
61. Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, Schaefer JM, Chirgwin JM. Human renin gene: Structure and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5026-30.
62. Burt DW, Mullins JJ, George H, Smith G, Brooks J, Ploff D, et al. The nucleotide sequence of mouse renin-encoding gene, Ren-1^a, and its upstream region. *Gene* 1989;84:91-104.
63. Panthier JJ, Dreyfus M, Tronik-LeRoux D, Rougeon F. Mouse kidney and submaxillary gland renin genes differ in their 5' putative regulatory sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5489-93.
64. Mullins JJ, Burt DW, Windass JD, McTurk P, George H, Brammar WJ. Molecular cloning of two distinct renin genes from DBA/2 mouse. *EMBO J* 1982;1:1461-6.
65. Chirgwin JM, Schaefer JM, Rotwein PS, Piccini N, Gross KW, Naylor SL. Human renin gene is on chromosome 1. *Somatic Cell Mol Genet* 1984;10:415-21.
66. McGill JR, Chirgwin JM, Moore CM, McCombs JL. Chromosome localization of the human renin gene (REN) by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1987;45:55-7.
67. Cohen-Haguener O, Soubrier F, Van Cong N, Sereno S, Turleau C, Jegou C, et al. Regional mapping of the human renin gene to 1q32 by in situ hybridization. *Ann Genet* 1989;32:16-20.
68. Tronik D, Ekker M, Rougeon F. Structural analysis of 5' flanking regions of rat, mouse and human renin gene reveals the presence of a transposable-like element in the two mouse genes. *Gene* 1988;69:71-80.
69. Burt DW, Nakamura N, Kelley P, Dzau VJ. Identification of negative and positive regulatory elements in the human renin gene. *J Biol Chem* 1989;264:7357-62.

70. Fird J, Philbrick WM, Howles PN, Dickinson DP, McGowan RA, Gross KW. Expression of tissue-specific Ren-1 and Ren-2 genes of mice: comparative analysis of 5'-proximal flanking regions. *Mol Cell Biol* 1984;4:2321-31.
71. Smith DL, Morris BJ. Human renin gene: extended sequence of 5' flanking DNA and its linkage to CAT gene for studies of regulation. *Clin Exp Hypertens* 1988; A10:1109-11.
72. Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *AM J Physiol* 1988;255:F563-73.
73. Nakamura N, Burt DW, Paul M, Dzau VJ. Negative control elements and cAMP responsive sequences in the tissue-specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:56-9.
74. Barrett G, Horiuchi M, Paul M, Pratt RE, Nakamura N, Dzau VJ. Identification of a negative regulatory element involved in tissue-specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:885-9.
75. Iwao H, Fuki K, Kim S, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, et al. Sodium balance effects on renin, angiotensinogen, and atrial natriuretic polypeptide mRNA levels. *Am J Physiol* 1988;255:E129-36.
76. Nakamura N, Soubrier E, Menard J, Panthier JJ, Rougeon F, Corvol P. Non proportional changes in plasma renin concentration, renal renin content, and rat renin messenger RNA. *Hypertension* 1985; 7:855-9.
77. Brecher AS, Shier DN, Dene H, Wang SM, Rapp IP, Franco-Saenz R, et al. Regulation of adrenal renin messenger ribonucleic acid by dietary sodium chloride. *Endocrinology* 1989;124:2907-11.
78. Nakamura A, Iwao H, Fukui K, Tamaki T, Kimura J, Yamamoto A, et al. Effects of a single dose of enalapril on renin gene expression in the kidney and angiotensinogen gene expression in the liver of rats. *Clin Exp Hypertens* 1988; A10:1283-4.
79. Ludwig G, Suzuki F, Murakami K, Ganten D, Hackenthal E. Kidney renin mRNA, renin secretion and plasma renin following adrenalectomy, salt depletion or enalapril treatment in the rat. *J Hypertens* 1986; 4:S411-3.
80. Ludwig G, Ganten D, Murakami K, Fasching U, Hackenthal E. Relationship between renin mRNA and renin secretion in adrenalectomized, salt depleted or converting enzyme inhibitor-treated rats. *Mol Cell Endocrinol* 1987;50:223-9.
81. Johns DW, Peach MJ, Gómez RA, Inagami T, Carey RM. Angiotensin II regulates renin expression. *Am J Physiol* 1990;259:F882-7.
82. Barret GL, Morgan TO, Smith M, Alcorn D, Aldred P. Effect of converting enzyme inhibition on renin synthesis and secretion in mice. *Hypertension* 1989;14:385-95.
83. Gómez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, et al. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol* 1990;259:F660-5.
84. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Manivel JC, Rosenberg ME. Renin expression in renal ablation. *Hypertension* 1992;20:483-90.
85. Dunihue FW, Bozdosset NC. Observations on the similarity of mesangial to juxtaglomerular cells. *Lab Invest* 1963;12:1228-40.
86. Peh SC, Lindop CBM. Chronic pyelonephritis: the significance of renal renin and the vascular changes in the human kidney. *J Pathol* 1991;163:343-9.
87. Kokubu T, Kitami Y, Muneta S, Murakami E, Hiwada K. Effects of renin inhibitors on the expression of kidney renin gene and tissue renin-like activity. *J Hypertens* 1989;7:529-32.
88. Kitami Y, Hiwada K, Murakami E, Iwata T, Muneta S, Kokubu T. Kidney renin gene expression after renin inhibition in the marmoset. *Clin Sci* 1991;81:387-92.
89. Everett AD, Carey RM, Chevalier RL, Peach MJ, Gómez RA. Renin release and gene expression in intact rat kidney microvessels and single cells. *J Clin Invest* 1990;86:169-75.
90. Suzuki F, Lindpaintner K, Keuneke C, Hellmann W, Takahasi S, Nakamura Y, et al. Tissue specific regulation of gene expression for renin and angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens* 1988; A10:1317-9.
91. Samani NJ, Swales JD, Brammar WJ. A widespread abnormality in renin gene expression in the spontaneously hypertensive rat: Modulation in some tissues with the development of hypertension. *Clin Sci* 1989;77:629-36.
92. Naruse M, Inagami T. Markedly elevated specific renin levels in the adrenal in genetically hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:3295-9.
93. Kitami Y, Hiwada K, Kokubu T. Kidney renin gene expression in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1989;7:727-31.
94. Moffet RB, McGowan RA, Gross KW. Modulation of kidney renin messenger RNA levels during experimentally induced hypertension. *Hypertension* 1986;8:874-82.
95. Baba K, Doi Y, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Mechanisms by which nephrectomy stimulates adrenal renin. *Hypertension* 1986; 8:997-1002.
96. Kim SJ, Shinji M, Tada M, Veno N, Higashimori K, Morinaga S, et al. Ovarian renin gene expression is regulated by follicle-stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;146:989-95.
97. Rosenberg ME, Chimielewski D, Hostetter TH. Effect of dietary protein on rat renin and angiotensinogen gene expression. *J Clin Invest* 1990;85:1144-9.
98. Ingellinger JR, Pratt RE, Ellison K, Dzau VJ. Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest* 1986;78:1311-5.
99. Morris BJ, Catanzaro DF, Hardman J, Mesenterovic N, Telfam J, Hort Y, et al. Human renin gene sequence, gene regulation and prorenin processing. *J Hypertens* 1984;2:211-3.
100. Miller CCl, Samani NJ, Carter AT, Brooks JJ, Brammar WJ. Modulation of mouse renin gene expression by dietary sodium chloride intake in one-gene, two-gene, and transgenic animals. *J Hypertens* 1989;7:861-3.
101. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME. Effect of dietary protein on renin and angiotensinogen gene expression after renal ablation. *Am J Physiol* 1992; 262:F631-8.
102. Gómez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, et al. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* 1988;254:F900-6.
103. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992;41:796-804.
104. Everett AD, Scott J, Wilfong N, Marino B, Rosenkranz RP, Inagami T, et al. Renin and angiotensinogen expression during the evolution of diabetes. *Hypertension* 1992;19:70-8.
105. Kunapuli SP, Benedict CR, Kumar A. Tissue specific hormonal regulation of the rat angiotensinogen gene expression. *Arch Biochem Biophys* 1987;254:642-6.
106. Kimura S, Iwao H, Fukui K, Abe Y, Tanaka S. Effects of thyroid hormones on angiotensinogen and renin messenger RNA levels in rats. *Japan J Pharmacol* 1990; 52:281-5.

FALTA PAGINA

No.

374
38

4. SÍNDROME NEFRÓTICO

La fisiopatología del síndrome nefrótico (SN) primario no está dilucidada totalmente. El SN se caracteriza por un aumento en la filtración glomerular de proteínas plasmáticas, edema, ascitis, retención de sodio, albuminuria, hipoalbuminemia, hiperlipoproteinemia, desnutrición, alteraciones en los factores de la coagulación, tromboembolismo, disminución de la inmunidad humoral y celular y alteraciones en la concentración (aumento o disminución) de casi todas las proteínas plasmáticas (1-4). Se piensa que todas las alteraciones sistémicas en el SN son secundarias a la pérdida de proteínas plasmáticas por la orina debida a alteraciones en la barrera de filtración glomerular. En la Fig. 1 se ilustran las relaciones entre las principales alteraciones sistémicas del SN (3).

En la rata se han diseñado varios modelos experimentales del SN de los humanos (5-7). De los más usados es el producido por el aminonucleósido de puromicina (ANP) (6,8-13). Este modelo es muy parecido al SN primario de los humanos ya que produce la lesión renal característica que es la fusión de los procesos podocíticos de las células epiteliales (podocitos) de la barrera de filtración glomerular, además de que el edema, la retención de sodio, la hiperlipemia, y la proteinuria remiten espontáneamente (8,9,14).

En la Fig. 2 se muestra la estructura del ANP. Como se puede observar, el ANP se sintetiza por reacción de Edman sobre el antibiótico puromicina. La puromicina es un inhibidor de síntesis de proteínas, específicamente, interrumpe la elongación, y esta característica inhibitoria se la da el residuo p-metoxi-tirosil, el cual es escindido para la producción del ANP, por lo tanto el ANP no tiene este efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas (15,16).

No se conoce el mecanismo por el cual el ANP induce el SN, pero se cree que es por medio de la formación de radicales libres durante su metabolismo. Aproximadamente del 80 al 100 % del ANP se excreta en orina o en heces en 8-24 h en la rata, y se excreta en forma de metabolitos o bien como ANP sin cambios (17,18). Además, la rata es única en la susceptibilidad a la acción nefrotóxica del ANP. El humano y el mono son medianamente susceptibles mientras que el cobayo, el ratón y el conejo son resistentes a la acción nefrotóxica de esta droga (17).

4.1 MECANISMOS DE PROTEINURIA

La barrera de filtración está constituida por la pared capilar glomerular que consta de tres componentes: 1) las células endoteliales cuyo citoplasma está fenestrado, 2) la

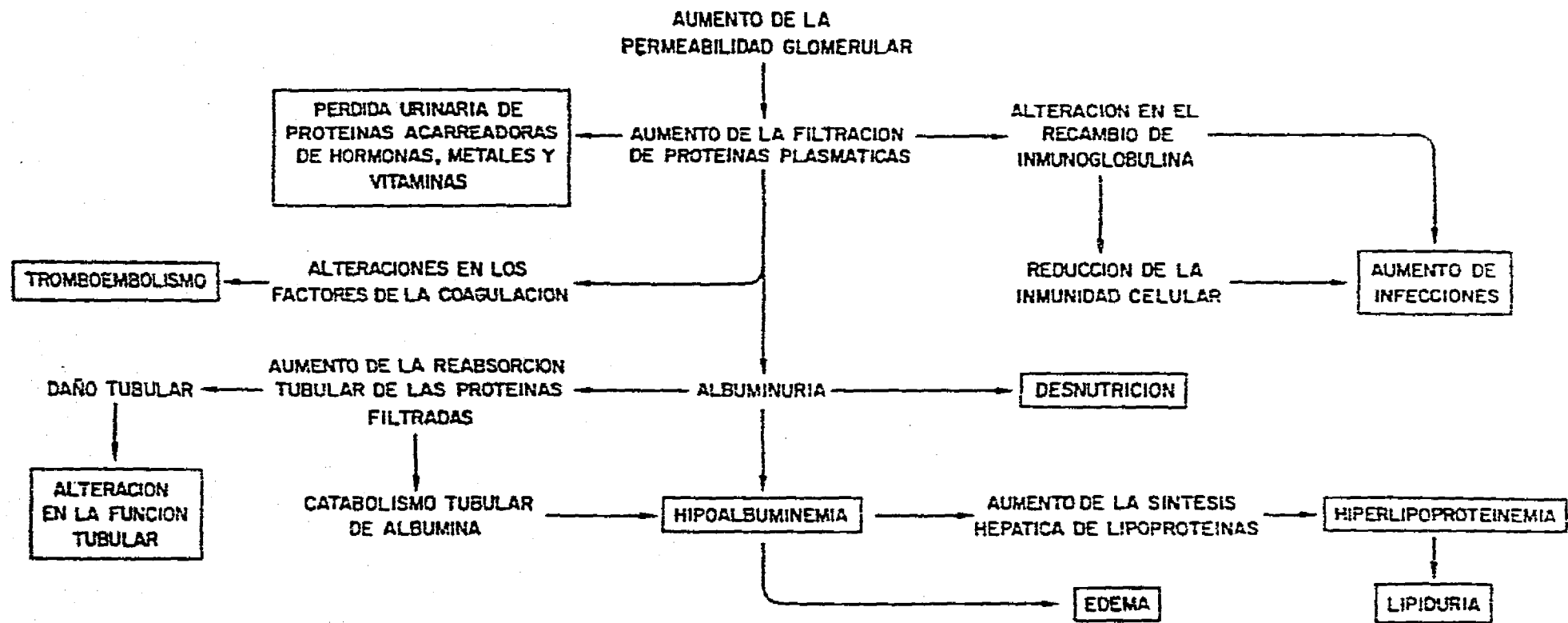


Figura 1. Fisiopatología del síndrome nefrótico. Se propone que todas las alteraciones sistémicas son consecuencia del aumento en la permeabilidad glomerular a las proteínas plasmáticas, y que la hipoalbuminemia inicia las principales manifestaciones.

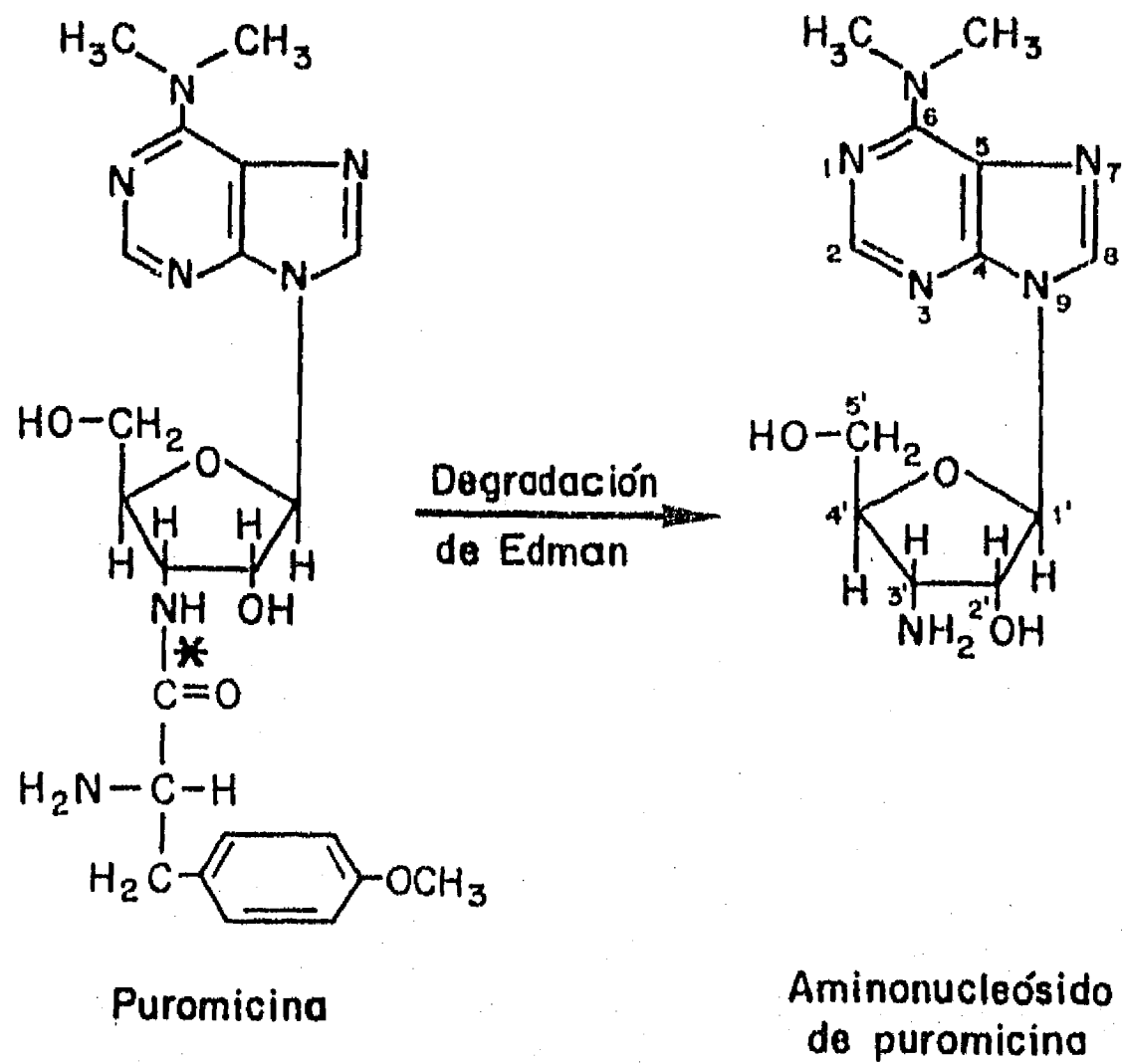


Figura 2. Síntesis y estructura del aminonucleósido de puromicina. * Enlace que se hidroliza por degradación de Edman para separar el residuo para-metoxi-tirosil y producir el aminonucleósido.

membrana basal glomerular compuesta por tres capas: lámina rara interna, lámina densa y lámina rara externa, y 3) los procesos podocíticos de las células epiteliales (19). Las fenestraciones de las células endoteliales, de un diámetro promedio de 70 nm (50-100 nm), permiten que todos los elementos solubles del plasma puedan estar en contacto íntimo con la membrana basal glomerular. La siguiente capa, la membrana basal glomerular, está compuesta principalmente de una malla de fibras de colágena y tiene un espesor de 300-350 nm en el humano, pero puede variar de 150 a 350 nm en diferentes especies. La lámina densa constituye una barrera significativa a la filtración de las proteínas plasmáticas neutras debido a la red de fibras de colágena tipo IV. Se piensa que los espacios entre estas fibras representan los "poros" físicos a través de los cuales las moléculas neutras son tamizadas en base a sus dimensión molecular. La parte más externa de la pared glomerular, que se interpone entre la membrana basal glomerular y el espacio de Bowman, está compuesta por los procesos podocíticos de las células epiteliales. Estos procesos epiteliales están parcialmente embebidos en la lámina rara externa. Entre los procesos podocíticos adyacentes hay espacios de un tamaño de 20 a 30 nm que están cubiertos por una membrana fina conocida como diafragma de hendidura. Este diafragma contiene espacios rectangulares de un tamaño aproximado de 4 X 14 nm (20,21) a través de los cuales pasan las moléculas pequeñas y, probablemente, restringen el paso de albúmina y de moléculas más grandes.

Además de la barrera determinada por el tamaño de los poros, existe una barrera electrostática a base de polianiones, sialoproteínas y heparán sulfato-proteoglicanos, que restringen selectivamente el paso de moléculas con carga negativa. El plasmalema de las fenestraciones endoteliales tiene una cubierta rica en ácido siálico que se tiñe con oro coloidal y que contiene heparán sulfato-proteoglicanos (22). Estos proteoglicanos están distribuidos principalmente dentro de la lámina rara interna y externa de la membrana basal glomerular (23), y los procesos podocíticos están cubiertos por un glicocálix rico en ácido siálico (24). De acuerdo con esto, los factores que determinan el paso de las moléculas por la barrera de filtración son: el tamaño, la deformabilidad, la carga eléctrica y la configuración moleculares, así como la hemodinámica glomerular. En el SN ocurre un trastorno en la permeabilidad del capilar glomerular cuyo mecanismo no está dilucidado y que permite el paso de macromoléculas. En la nefrosis por ANP, la depuración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga es muy elevada, lo que indica que la selectividad, tanto de tamaño como de carga, está alterada (25). La lesión renal característica del SN idiopático es la fusión de los

procesos podocíticos, esta fusión parece deberse a la pérdida de la carga negativa de su superficie; esta conclusión se apoya en el hecho de que la administración de policonales al riñón produce proteinuria y fusión de podocitos (26). Charest y Roth (27) observaron una disminución del contenido de ácido siálico en las membranas de los podocitos en la nefrosis por ANP, y Kerjaschki y cols. (28) observaron una disminución en el contenido de ácido siálico de la podocalixina (la sialoproteína más abundante de las células epiteliales) en ratas nefróticas, lo que sugiere que la disminución de ácido siálico juega un papel muy importante en el mecanismo de proteinuria en la nefrosis humana y experimental. No está claro si los heparán sulfato-proteoglicanos de la barrera glomerular disminuyen en la nefrosis por ANP (29); sin embargo, en los pacientes con SN congénito (30), los sitios aniónicos ricos en heparán sulfato, están prácticamente ausentes.

4.2 HIPOALBUMINEMIA

La hipalbuminemia en SN puede ser secundaria a una disminución en la síntesis de albúmina, a un aumento en su catabolismo, a cambios en su distribución, a una disminución en la ingesta de proteínas, a la pérdida de albúmina del cuerpo o a una combinación de estos factores (3). En el SN parece que varios de éstos factores están involucrados. La pérdida de albúmina en la orina es muy importante. Sin embargo, la pérdida de proteínas por sí sola no explica la hipalbuminemia en la mayoría de los pacientes con SN, debido a que la velocidad de síntesis hepática de albúmina puede aumentar por lo menos tres veces y debe ser capaz de compensar fácilmente las pérdidas por orina (31). Los estudios en humanos y en modelos animales de SN demuestran que la velocidad de síntesis de albúmina está aumentada si la ingesta de proteínas es adecuada (32,33). En pacientes con dieta baja en proteínas, la síntesis de albúmina puede estar disminuida (33). La relación albúmina intravascular/albúmina extravascular aumenta de 0.8 a 1.1 en pacientes con SN (1,34). Esto es, la concentración de albúmina intersticial disminuye más que la concentración de albúmina en plasma. Los pacientes sometidos a una dieta alta en proteínas presentan una mayor proteinuria y ningún cambio en la concentración de albúmina en plasma, en cambio, una dieta baja en proteínas disminuye la proteinuria aunque no produce cambios en los niveles plasmáticos de proteínas (35,36).

El aumento en la síntesis de albúmina en el SN se ha demostrado con técnicas de recambio (37), métodos de perfusión de hígado (38), preparaciones microsomales aisladas

(289), y mediciones del ARNm de albúmina (40-42). La infusión de dextranos hiperoncóticos disminuye la velocidad de degradación y la síntesis de albúmina, lo que sugiere que la presión coloidosmótica puede ser un regulador importante de la síntesis de albúmina (36,43,44).

Por otra parte, se ha encontrado que el catabolismo fraccional de la albúmina (fracción de la reserva de albúmina intravascular que se cataboliza por unidad de tiempo) está aumentado en el SN (3). En una persona normal, se cataboliza diariamente del 5 al 12% de la reserva intravascular de albúmina, mientras que en los pacientes con SN esta fracción aumenta a un 16 a 50% (3). El sitio más importante del aumento en el catabolismo de albúmina es el riñón. Este aumento parece ser secundario a la captación tubular y a la destrucción de la albúmina filtrada. Varios estudios en animales y en humanos demuestran que la velocidad catabólica de la albúmina aumenta cuando aumenta la proteinuria (12,32). Si las ratas con SN se nefrectomizan, el catabolismo de albúmina disminuye un 50% (37). En células del túbulo proximal y distal de ratas con SN se han demostrado gotas de proteínas con albúmina y globulinas (45), además, la actividad de las enzimas lisosomales catepsina B y L aumenta en las células tubulares en respuesta a la proteinuria glomerular (46).

En resumen, el concepto actual es que la hipoalbuminemia en el SN no se debe a una disminución en la síntesis de albúmina, sino a la albuminuria y al aumento en el catabolismo renal de esta proteína (1,4). La síntesis de albúmina no disminuye, sino que aumenta en pacientes y en animales con SN, pero este aumento no es suficiente para compensar la hipoalbuminemia.

4.3 MECANISMO DE FORMACIÓN DE EDEMA Y RETENCIÓN DE SODIO Y PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

De acuerdo a la hipótesis clásica, la hipoalbuminemia es el paso inicial para la formación del edema y retención de sodio (47) (Fig. 1). La hipoalbuminemia disminuye la presión oncótica de la sangre, lo cual altera las fuerzas de Starling favoreciéndose así el movimiento de agua y solutos al espacio intersticial y causando hipovolemia. Esta última activa a los sensores de volumen y a los barorreceptores, los cuales, por medio de una variedad de mecanismos neurohormonales, envían señales al riñón que se traducen en retención de sodio y agua. De acuerdo con esta hipótesis, los pacientes con SN deberían tener las siguientes características: 1) volumen sanguíneo bajo durante la formación del edema, 2) diuresis y natriuresis en respuesta a maniobras que aumentan el volumen sanguíneo, y 3) evidencia

funcional de hipovolemia. Sin embargo, la hipoalbuminemia no siempre produce edema y retención de sodio (48) y la expansión de volumen no produce un efecto natriurético y diurético uniforme en adultos con SN (49). En ratas con SN existe incapacidad para excretar una carga de sodio en respuesta a la expansión de volumen (50), lo cual se atribuye, en parte, a un aumento en la actividad nerviosa simpática eferente renal (51), y/o a una disminución en la respuesta renal al péptido auricular natriurético (52). Finalmente, no en todos los casos de SN hay evidencia de hipovolemia (53); así, por ejemplo, la actividad plasmática de renina y la aldosterona, que son indicadores funcionales del volumen circulante, no siempre se encuentran elevados en pacientes con SN (49,54). Por otra parte, el bloqueo del sistema renina-angiotensina con captopril (55) o con saralasin (56) no evitan la retención de sodio. Resultados semejantes se han informado en ratas nefróticas, en las que la retención de sodio ocurre antes de que aumente la actividad plasmática de renina (9), y el captopril no evita el edema y la retención de sodio (14). Los datos anteriores sugieren que la retención de sodio y el edema, en la mayoría de los casos de SN, no son secundarios a hipovolemia. Por lo tanto, se ha sugerido que la retención de sodio es un fenómeno primario, es decir, que es consecuencia de factores intrarrenales y no de factores sistémicos (57,58).

4.4 EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN EL SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL

Durante el SN experimental inducido en ratas por la administración de ANP se han observado las siguientes alteraciones en el sistema renina-angiotensina:

1. La actividad y la concentración plasmáticas de renina aumentan alrededor de 3 veces desde el día 5 después de la inyección del ANP, con una actividad máxima los días 7 y 6 respectivamente, y regresando a valores normales los días 10 y 9 respectivamente. La proteinuria empieza el día 4, y el día 22 aún persiste, aunque el pico se observa del día 6 al 12. La retención de sodio es del día 2 al 7 (11).
2. La concentración plasmática de angiotensinógeno disminuye alrededor de 5 veces desde el día 4 y se mantiene en niveles bajos hasta el día 10, regresando a valores normales el día 12 (9).
3. En estudios *in vitro* se ha visto que la secreción basal de renina en rebanadas de corteza renal no se modifica en las ratas con SN (día 6). El contenido renal de renina es similar en ratas con SN y en ratas control (59).

4. La liberación de angiotensinógeno de rebanadas de hígado aumenta en las ratas nefróticas en el día 6 (59).

5. Por otra parte, también se ha comprobado que tanto la renina como el angiotensinógeno se pierden por orina durante el SN inducido por ANP. El angiotensinógeno aparece en la orina 5 días después de la inyección del ANP y la renina a los 6 días (60).

6. La actividad sérica de enzima convertidora de angiotensina I aumenta, presentando un pico máximo el día 6 (9,61,62). En algunos tejidos aumenta (testículo, pulmones, aorta, adrenales y riñones) y en otros disminuye y después aumenta (corazón y cerebro) y se excreta por orina en estrecha correlación con la proteinuria (62).

II. OBJETIVOS

1. Investigar si hay alteraciones en los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno y en los niveles renales del ARNm de renina en el síndrome nefrótico experimental inducido por aminonucleósido de puromicina.
2. Obtener información acerca del nivel de regulación de la síntesis de ambas proteínas determinando si existe relación entre: a) los niveles del ARNm de renina y el contenido renal, concentración plasmática y excreción urinaria de esta proteína tanto en su forma activa como en su forma inactiva, y b) los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno y la concentración plasmática y excreción urinaria de su proteína.
3. Averiguar las posibles alteraciones en los niveles del ARNm de renina en tejidos extrarrenales como son el hígado, corazón y cerebro, y en los niveles del ARNm de angiotensinógeno en tejidos extrahepáticos tales como corazón, cerebro y riñón, y de esta manera aportar evidencias acerca de la regulación específica de tejido de la expresión de estos genes.

III. MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

1. Ibarra-Rubio ME, Ramos VM, Correa-Rotter R, Pedraza-Chaverri J. Hepatic and extrahepatic angiotensinogen gene expression in rats with acute nephrotic syndrome. *Renal Failure* 1997;19: . Aceptado para publicación el 29 de Agosto de 1996, USA.
2. Ibarra-Rubio ME, Ramos VM, Correa-Rotter R, Pedraza-Chaverri J. Renin, prorenin, and its gene expression in rats with acute nephrotic syndrome. Enviado a *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* el 6 de Septiembre de 1996, Australia.

**HEPATIC AND EXTRAHEPATIC ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION IN RATS WITH
ACUTE NEPHROTIC SYNDROME**

**María Elena Ibarra-Rubio, Margarita Ramos V, Ricardo Correa-Rotter, José Pedraza-
Chaverri***

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto
Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" and * Departamento de Biología, Facultad de
Química, U.N.A.M.

Running head: *Ao* gene expression in nephrotic syndrome

Correspondence to:

María Elena Ibarra-Rubio

Depto. Nefrología y Metabolismo Mineral

Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

Vasco de Quiroga #15, Tlalpan

14000 México, D.F.

Tel. (525) 573 1200 Ext. 2506, Fax. (525) 655 1076

ABSTRACT

Plasma concentration and urine excretion of the renin-angiotensin system proteins are altered in rats with nephrotic syndrome (NS). In this work the messenger ribonucleic acid (mRNA) levels of angiotensinogen (Ao) were analyzed in liver and other extrahepatic tissues: kidney, heart, brain and adrenal gland from control, nephrotic, and pair-fed (PF) rats with the slot blot hybridization technique. NS was induced by a single injection of puromycin aminonucleoside (PAN). Although a great urinary excretion and half than normal plasma levels of Ao were observed on day 6 after PAN-injection, when NS was clearly established, hepatic Ao mRNA levels did not change. Furthermore, the Ao mRNA levels did not change in any of the extrahepatic studied tissues on day 6 neither its hepatic levels at any of days 1, 3, 5 or 7 after PAN-injection. These data suggest that the hepatic and extrahepatic Ao mRNA levels are unaltered during the development of the acute NS induced by PAN.

INTRODUCTION

Nephrotic syndrome (NS) induced in rats by a single subcutaneous injection of puromycin aminonucleoside (PAN) represents an experimental model of the human minimal changes disease (1-7), which is characterized by severe proteinuria, hypoproteinemia, sodium retention, hypercholesterolemia, malnutrition, and alterations in the concentration (increase or decrease) of almost all plasma proteins (3, 5, 8, 9). The renin-angiotensin system (RAS) is profoundly altered in this NS model: plasma renin activity (PRA) and concentration (PRC) increase around three times since day 5 after PAN-injection with peak values on days 6 and 7 (2); plasma angiotensinogen (Ao) concentration (PAoC) decreases markedly since days 4-5 (2, 4); *in vitro* Ao secretion from liver slices increases on day 6 (10); and Ao, renin and angiotensin I-converting enzyme are excreted by urine in great quantities (4, 11, 12). It seems that PAoC is decreased due to its urinary losses, however the high renin levels may also participate, therefore PAoC would be very low if its synthesis was not increased, as *in vitro* secretion suggests (10). On the other hand, Ao and its mRNA have been found in rat extrahepatic tissues such as kidney (13-15), heart (14, 16, 17), brain (13, 14, 18, 19), and adrenal gland (13, 14, 20) suggesting its local synthesis. Moreover, local renin-angiotensin systems have been proposed in these tissues (21-25) and a tissue-specific response of Ao gene expression has been observed under different situations (14, 26-29). Based on the above data we hypothesized that

the Ao gene expression may be enhanced in liver and/or other tissues from PAN-nephrotic rats to increase Ao synthesis and thus compensate for the high urinary losses and low plasma values of this protein.

Food intake is considerably reduced in this experimental model (30, 31) and it is known that nutritional factors affect the expression of the renin-angiotensin system genes (27, 32, 33). Therefore, in this work the hepatic and extrahepatic Ao gene expression was studied by measuring the Ao mRNA levels in liver, kidney, heart, brain, and adrenal gland in nephrotic (NS) and pair-fed (PF) rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals and PAN treatment protocols

Nephrotic syndrome was induced in male Wistar rats (230-250 g of initial b.w.) by a single subcutaneous injection of a 2 % PAN solution in 0.9% saline at a dose of 15 mg/100 g of body weight (2). Since food intake is reduced in PAN-treated rats (NS group), a pair-fed group of rats (PF) was included, as well as an untreated control group (C) which was fed *ad libitum*. PF and C groups received an injection of 0.9% saline solution. To standardize conditions under which the steady state levels of specific mRNAs were determined, rats were placed under the same environmental conditions in metabolic cages. Food intake of PAN-treated rats was measured daily and an equal amount of food was given to PF rats. Body weight was determined daily. Nineteen rats with NS, 13 PF, and 13 C were sacrificed by decapitation on day 6 after PAN-injection, blood was collected, and liver, kidneys, brain, heart, and adrenal glands were removed quickly and frozen in liquid nitrogen until determinations were made. Also, a time-course study was done obtaining samples on days 1, 3, 5, and 7 after PAN-injection (two rats for each group at each time).

Analytical methods

Urinary sodium was determined by flame photometry (flame photometer model 403, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA). Total protein in serum or urine was measured according to Lowry *et al.* (34). Cholesterol was estimated enzymatically according to the manufacturer instructions (Farmacéuticos Lakeside, México, D.F.). PAoC, urinary Ao excretion (UAoE) and plasma renin concentration (PRC) were determined indirectly by RIA of angiotensin I as previously described (2, 11) using antibodies prepared in our laboratory (35) and ¹²⁵I-angiotensin I (DuPont-New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA).

Isolation of total cellular RNA

Total cellular RNA from liver, brain, heart, and adrenal glands was isolated with the Trizol-reagent (Gibco-BRL, Life Technologies, MD, USA) according to the manufacturer instructions, and that from kidney was isolated according to the method of Chomczynski and Sacchi (36) by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform.

Slot blot hybridization

A full-length rat angiotensinogen cDNA was obtained from Dr. K. R. Lynch (University of Virginia, Charlottesville, VA) (37). This clone was grown, plasmids were isolated, and Ao cDNA fragment removed by digestion with Hind III and Eco RI.

Aliquots of 15 µg of total RNA, as measured by absorbance at 260 nm, were applied to Gene Screen filters (DuPont-New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA) by using a Milli Blot-S apparatus (Millipore Intertech, Bedford, MA, USA). Before applying the RNA, it was denatured for 15 minutes at 68°C in a solution containing 50% formamide, 7% formaldehyde, and 1x sodium chloride-sodium citrate (SSC). The RNA was cross-linked to the filter with the UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The filters were prehybridized for 1 h at 42 °C in a solution of 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate (500 000 Av. Mol. Wt.), 1% SDS, 1 M sodium chloride, and 100 µg/mL denatured sonicated salmon testes DNA. Hybridization of filters was carried out by adding 2 x 10⁶ cpm/mL of the appropriate cDNA which was radiolabeled with the Prime It RmT Random Primer Labeling Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer instructions. The hybridization reaction was carried out at 42 °C for 14-18 h. Filters were washed under high stringency conditions. Briefly, this included one low-stringency wash (2x SSC-0.1% SDS, 15 min, room temperature) and three high-stringency washes (0.1x SSC-0.1% SDS, 15 min, 65°C). The washed filters were exposed to Kodak XAR film at -70°C in the presence of image-intensifying screens. The autoradiographs were quantitated by using the program Gel Scan Area of the DU 640 spectrophotometer from Beckmann Instruments Inc. (Fullerton, CA, USA).

Data analysis

For quantitation of mRNA abundance, all samples from each tissue were analyzed together on a single slot blot to control for day-to-day variation in hybridization efficiency. Each slot blot was done in duplicate, one of them was hybridized with Ao cDNA and the other one with β-actin cDNA in parallel to correct for differences in RNA loading and to determine whether the responses were gene specific. Densitometric values represent the integration of the area

under the curve corrected for the baseline background reading. Ao mRNA levels were expressed as relative densitometry units factored for β -actin. Each hybridization experiment was done twice at least. Average value for each animal and then for groups of animals were calculated.

Data are expressed as mean \pm SEM. One way ANOVA or ANOVA on ranks and multiple comparison methods of Student-Newman-Keuls or Dunn's tests, as the case may be, were used to compare the results of the different groups by using the SigmaStat statistical software (Jandel Corporation). A probability less or equal to 0.05 was considered significant.

RESULTS

Nephrotic rats presented an important decrease in food intake since day 1 until day 7 after PAN injection (Fig. 1A) which markedly influenced body weight (Fig. 1B). Sodium retention was evident in these same rats from day 2 to day 7 (Fig. 2A). Urinary sodium excretion also decreased in pair-fed rats as a consequence of the reduced food intake, however the decrease in sodium excretion in nephrotic rats was more marked. Proteinuria of NS rats was evident by day 4 and reached peak values on days 6 and 7 (Fig. 2B). NS rats studied on day 6 presented a significant decrease of total serum protein and an increase in serum cholesterol (Table 1).

PAoC decreased in NS rats to almost half of the control values and a highly increased UAoE was observed on day 6 in NS rats (Table 1). PRC increased 1.8 fold in PF and 3.7 fold in NS rats with respect to C values (Table 1).

Before analyzing Ao mRNA by slot blot, a linearity test was carried out to choose the amount of total RNA to load (Fig. 3). Optical density of the autoradiography was linear from 0.625 to 20 μ g of total RNA loaded, therefore the slot blots were done loading 15 μ g of total RNA. The results obtained for Ao mRNA in the different studied tissues on day 6 after PAN-injection are shown in Table 2. Ao mRNA showed a trend to increase in heart (1.85 fold) and brain (1.4 fold) of PF rats, however these increases did not reach statistical significance. There were no changes on the Ao mRNA levels in any of the studied tissues from nephrotic rats on day 6. We then performed a time course study on days 1, 3, 5, and 7. The results of PAoC and UAoE of this time-course study are in Tables 3 and 4, respectively. There was a significant decrease on PAoC and an important increase on UAoE since day 5, however these alterations were more profound on day 7 after PAN-injection. No changes were found in Ao mRNA hepatic levels on neither of these days (Table 5).

DISCUSSION

Nephrotic syndrome was clearly established in PAN-treated rats as they presented proteinuria, hypoproteinemia, sodium retention and hypercholesterolemia. These NS rats had a reduced food intake partially explaining why they did not grow as C rats, since Thabet *et al.* (31) have found that the growth retardation of the nephrotic rats may also be associated with a significant decrease in insulin-like growth factor I and a reduction in growth hormone receptor mRNA. The increased body weight in NS rats as compared to PF group (Fig. 1B) is explained by edema and ascites formation starting on day 4 in nephrotic animals. Sodium excretion was also influenced by the food intake reduction since there was a significant decrease in PF rats, however the sodium retention was more profound in NS rats.

PAoC decreased to a 53%, and large amounts of this protein were excreted by urine in NS rats as compared to C and PF groups. On the other hand, PRC increased almost 4 fold in NS rats and almost 2 fold in PF rats as compared to C group (this was another parameter clearly affected by the reduction in food intake). Taking into account the Ao urinary losses and the important increase in PRC, which may contribute to the low PAoC in these rats, we thought that there should be an increased Ao synthesis in order to recover, at least in part, their PAoC. Surprisingly, there were no changes in the hepatic Ao mRNA levels in any of the studied tissues from nephrotic rats on day 6. We then speculated that the changes may occur at other time point during NS, therefore we determined the Ao mRNA hepatic levels on days 1, 3, 5, and 7, time points at which no changes were found. In accordance to the previous hypothesis, an increase of Ao could be happening at the translational level and not at the mRNA or transcriptional levels in this model. Likewise, Everett *et al.* (38) found that renal Ao was increased at 4 and 8 months of evolution of diabetes in spontaneously diabetic Bio-Breeding rats whereas its mRNA was not altered, and they also proposed translational changes as an explanation for this discrepancy between the lack of change in Ao gene expression and the fluctuation in Ao protein. No changes have been found in other protein mRNAs in PAN-induced NS which were expected to be altered such as cholesterol 7 alpha-hydroxylase (39). However, many other mRNAs are altered in NS such as albumin (40, 41), transferrin, fibrinogen, pAGP, haptoglobin (30, 42), Apolipoproteins A-1 and E (43, 44), and HMG-CoA reductase (45).

Tissue-specific changes in hepatic and extrahepatic Ao mRNA levels have been found under different situations. For example, Kunapuli *et al.* (26) found that dexamethasone had no effect in Ao mRNA levels in heart but increased 100% in liver and 400% in brain, and that

ethinylestradiol had no effect in heart Ao mRNA but increased 100% in liver and 50% in brain. Campbell and Habener (14) also found a tissue specific response of Ao mRNA to bilateral nephrectomy, dexamethasone, ethinylestradiol, and triiodothyronine or bilateral nephrectomy plus these hormones. Gómez *et al.* (28) found a tissue specific regulation of Ao mRNA during fetal maturation in liver, kidney, brain and brown adipose tissue. Converting enzyme inhibitors also induce a tissue-specific response of Ao mRNA levels: cilazapril produced a marked stimulation in adrenal gland, a decrease in hypothalamus and had no effect in kidney or liver, lisinopril produced a decrease in hypothalamus but not in liver, kidney or adrenal gland, and the vasodilator hydralazine induced an increase in Ao mRNA in kidney, a decrease in hypothalamus, and had no effect in liver or adrenal gland (29). Likewise, Ao mRNA levels are altered in some diseases such as experimental diabetes mellitus (46) where renal and liver Ao mRNA levels were decreased and spontaneous hypertension where decreased renal Ao mRNA levels and an alteration in its regulation by sodium intake were demonstrated (47).

No significant changes were found in any studied tissues in NS in this work, yet Ao mRNA tended to increase in heart (1.85 times) and in brain (1.4 times) of PF rats. Interestingly, Ingelfinger *et al.* (27) found that a low sodium diet increased Ao mRNA in kidney but not in liver. The differences between Ingelfinger's *et al.* and our observations in PF rats with low sodium intake may be due to the different kind and time of treatment, as their animals were fed a low salt diet for two weeks and were sodium depleted with furosemide while our PF animals had a reduced food intake (including sodium) during only six days.

In conclusion, hepatic, renal, adrenal, brain, and heart Ao mRNA levels are unaltered in rats with acute PAN-induced NS, therefore, if there is an increase in Ao to compensate its urinary losses and increased degradation by renin, it could be happening at translational level, or at transcriptional level in other tissues such as brown adipose tissue which also express Ao gene (28, 48).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 1760-M9210) to MEIR.

REFERENCES

1. Frenk S, Antonowicks I, Craig JH, Metcalf J: Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:424-427, 1955.
2. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC: Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodium retention. *Rev Invest Clin* 42:29-38, 1990.
3. Glasscock RJ, Cohen AH, Adler SG: Primary glomerular diseases. In: Brenner BM (ed); *The Kidney, 5th. Edition*. Philadelphia, W.B. Saunders Co.1996, vol. II. pp 1392-1497.
4. Yayama K, Konishi K, Ohta A, Takano M, Ohtani R, Itoh N, Okamoto H: Elevation of plasma angiotensinogen in rats with experimentally induced nephrosis. *Nephron* 63:89-93, 1993.
5. Pyo HJ, Summer SN, Niederberger M, Kim JK, Schrier RW: Arginine-vasopressin gene expression in rats with puromycin-induced nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 25:58-62, 1995.
6. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB: Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol. *Exp Nephrol* 3: 270-279, 1995.
7. Ueda N, Baliga R, Shah S: Role of catalytic iron in an animal model of minimal change nephrotic syndrome. *Kidney Int* 49:370-373, 1996.
8. Bernard DB: Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: Pathophysiology and complications. In: Stein JH (ed); *Contemporary Issues in Nephrology*. New York, Churchill Livingstone, 1982, vol. 9: Nephrotic Syndrome, pp 85-20.
9. Lewandowski AE, Liano WSL, Stinson-Fisher CA, Kenk JD, Jefferson LS: Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 254:C634-C642, 1988.
10. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC: Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. *In vitro* release of renin, angiotensinogen, and aldosterone. *Rev Invest Clin* 42:120-126, 1990.
11. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC: Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 57:106-108, 1991.
12. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J: Angiotensin I converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 191:175-184, 1990.

13. Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S: Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem* 261:319-323, 1986.
14. Campbell DJ, Habener JF: Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 78:31-39, 1986.
15. Richoux JP, Cordonnier JL, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J, et al.: Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res* 233:439-451, 1983.
16. Kunapuli SP, Kumar A: Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of its mRNA in rat heart. *Circ Res* 60:786-790, 1987.
17. Lindpaintner K, Ganten D: The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res* 68:905-921, 1991.
18. Lynch KR, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG: Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 2:149-158, 1987.
19. Genain CP, Van Loon GR, Kotchen TA: Distribution of renin activity and angiotensinogen in rat brain. Effects of dietary sodium chloride intake on brain renin. *J Clin Invest* 76: 1939-1945, 1985.
20. Ganten D, Schelling P, Vecsei P, Ganten U: Iso-renin extrarenal origin: the tissue angiotensinogenase systems. *Am J Med* 60:760-772, 1976.
21. Dzau VJ: Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77:114-113, 1988.
22. Mendelsohn FAO: Angiotensin II: evidence for its role as an intrarenal hormone. *Kidney Int* 22:S78-S81, 1982.
23. Schunkert H, Ingelfinger JR, Dzau VJ: Evolving concepts of intrarenal renin-angiotensin system in health and disease: contributions of molecular biology. *Renal Physiol Biochem* 14:146-154, 1991.
24. Mulrow PJ: Adrenal renin: a possible local regulator of aldosterone production. *Yale J Biol Med* 62:503-510, 1989.
25. Ganong WF: The brain angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 46:17-31, 1984.
26. Kunapuli SP, Benedict CR, Kumar A: Tissue specific hormonal regulation of the rat angiotensinogen gene expression. *Arch Biochem Biophys* 254:642-646, 1987.
27. Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison KE, Dzau VJ: Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest* 78:1311-1315, 1986.
28. Gómez RA, Cassis L, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Carey RM, Peach MJ: Fetal expression of the angiotensinogen gene. *Endocrinology* 123:2298-2302, 1988.

29. Keuneke C, Yacullo R, Sugiura, Mall G, Metzger R, Ganten D: Converting enzyme inhibitors differentially affect expression of genes of the renin angiotensin system. *Clin Exper Hypertens* 17:551-574, 1995.
30. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J, Panduro A: Differential regulation in the expression of hepatic genes in nephrotic and pair-fed rats. *Nephron* 65:119-124, 1993.
31. Thabet MA, Challa A, Chan W, Liu F, Hintz RL, Chan JCM: Insulin like growth factor and growth hormone receptor in nephrotic rats. *Am J Physiol* 266:E102-E106, 1994.
32. Iwao H, Fukui K, Kim S, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, Youichi A: Sodium balance effects on renin, angiotensinogen, and atrial natriuretic polypeptide mRNA levels. *Am J Physiol* 255:E129-E136, 1988.
33. Rosenberg ME, Chimielewski D, Hostetter TH: Effect of dietary protein on rat renin and angiotensinogen gene expression. *J Clin Invest* 85:1144-1149, 1990.
34. Lowry OH, Rosenbrought NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein determination with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-272, 1951.
35. Pedraza-Chaverri J, Zúñiga-Estarda A, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC: Producción de anticuerpos policlonales para la cuantificación del decapeptido angiotensina I por radioinmunoanálisis. *Rev Invest Clin* 40:365-377, 1988.
36. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
37. Lynch KR, Simnad VI, Ben-Ari ET, Garrison JC: Localization of preangiotensinogen messenger RNA sequences in the rat brain. *Hypertension* 8:540-543, 1986.
38. Everett AD, Scott J, Wilfong N, Marino B, Rosenkranz RP, Inagami T, Gez RA: Renin and angiotensinogen expression during the evolution of diabetes. *Hypertension* 19:70-78, 1992.
39. Liang KH, Oveisi F, Vaziri ND: Gene expression of hepatic cholesterol 7-alpha-hydroxylase in the course of puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int* 49:855-860, 1996.
40. Yamauchi A, Imai E, Noguchi T, Tanaka T, Yamamoto S, Mikami H, Fukuhara Y, Fuji M, Orita Y, Kamada T. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats. *Am J Physiol* 254 :E676-E679, 1989.
41. Pedraza-Chaverri J, Huberman A: Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin mRNA increase in aminonucleoside nephrotic rats. *Nephron* 59:648-650, 1991.
42. Lewandowski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kenk JD, Jefferson LS: Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 254:C634-C642, 1988.

43. Tarugi P, Calanmdra S, Chan L: Changes in apolipoprotein AI mRNA level in the liver of rats with nephrotic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 686:51-61, 1986
44. Panduro A, Castrillón L, Pedraza-Chaverri J, Vargas F, Ibarra-Rubio ME: Regulation of apolipoprotein A-1 and E gene expression in liver and intestine of nephrotic and pair-fed rats. *Nephron* 65:100-107, 1993.
45. Vaziri ND, Liang KH. Hepatic HMG-CoA reductase gene expression during the course of puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int* 48:1979-1985, 1995.
46. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME: Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 41:796-804, 1992.
47. Pratt RE, Zou WM, Naftilan AJ, Ingelfinger JR, Dzau VJ: Altered sodium regulation of renal angiotensinogen mRNA in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 256 :F469-F474, 1989.
48. Cassis LA, Saye JA, Peach MJ: Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 11:591-596, 1988.

Table 1. Serum, plasma and urine determinations (Day 6)

	Control	Pair fed	Nephrotic syndrome
Serum protein (g/dL)	7.0 ± 0.3	7.6 ± 0.4	4.0 ± 0.1*
Serum cholesterol (mg/dL)	60 ± 3	61 ± 4	263 ± 21*
PAoC (ng AI/mL/h)	908 ± 90	940 ± 42	481 ± 35*
UAoE (ng AI/24 h)	29 ± 5	18 ± 4	2370 ± 671*
PRC (ng AI/mL/h)	9.7 ± 1.1	17.3 ± 2.1*	36 ± 5*

Data are mean ± SEM. PAoC = plasma Ao concentration, UAoE = urinary Ao excretion, PRC = plasma renin concentration. * p < 0.05 vs. C and PF. * p < 0.05 vs. C. n = 17-19 for NS, and n = 11-13 for PF and C.

Table 2. Ao mRNA levels on day 6, relative densitometry units (Ao/β actin ratio)

Tissue	Control	Pair fed	Nephrotic syndrome
Liver	1.09 ± 0.09	1.29 ± 0.13	1.18 ± 0.15
Brain	0.40 ± 0.07	0.56 ± 0.11	0.52 ± 0.12
Kidney	0.39 ± 0.07	0.46 ± 0.04	0.33 ± 0.05
Adrenal	3.03 ± 0.84	2.55 ± 0.43	3.26 ± 0.49
Heart	0.41 ± 0.05	0.76 ± 0.15	0.42 ± 0.08

Data are mean ± SEM. n = 16-19 for NS and n = 11-13 for PF and C.

Table 3. Plasma angiotensinogen concentration, ng AI/mL/h

	Control	Pair fed	Nephrotic syndrome
Day 1	1137 ± 52	1257 ± 140	973 ± 48
Day 3	1113 ± 156	1169 ± 180	1121 ± 68
Day 5	988 ± 72	1045 ± 24	496 ± 50*
Day 7	1040 ± 68	942 ± 38	397 ± 43*

Data are mean ± SEM. * p < 0.05 vs. C and PF. n = 2.

Table 4. Urinary angiotensinogen excretion, ng AI/24h

	Control	Pair fed	Nephrotic syndrome
Day 1	23 ± 6	13 ± 3	27 ± 8
Day 3	23 ± 2	24 ± 2	29 ± 6
Day 5	37 ± 2	13 ± 1	848 ± 488*
Day 7	18 ± 0	18 ± 7	1952 ± 240*

Data are mean ± SEM. * p < 0.05 vs. C and PF. n = 2.

Table 5. Hepatic Ao mRNA levels, Relative densitometry units (Ao/β actin ratio)

	Control	Pair fed	Nephrotic syndrome
Day 1	1.225 ± 0.325	1.336 ± 0.332	1.022 ± 0.443
Day 3	1.505 ± 0.415	1.502 ± 0.266	1.104 ± 0.551
Day 5	0.914 ± 0.327	1.792 ± 0.346	1.529 ± 0.452
Day 7	0.821 ± 0.352	0.966 ± 0.360	1.331 ± 0.422

Data are mean ± SEM. n = 4 for NS and n = 2 for PF and C.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Food intake (A) and body weight (B) in nephrotic (●), pair-fed (■) and control (▲) rats. Results are mean \pm SEM. n = 17-19 for NS and 11-13 for PF and C; a = p < 0.05 vs. C, b = p < 0.05 vs. PF

Figure 2. Urinary sodium excretion (A) and proteinuria (B) in nephrotic (●), pair-fed (■) and control (▲) rats. Results are mean \pm SEM, n = 17-19 for NS and 11-13 for PF and C; a = p < 0.05 vs. C, b = p < 0.05 vs. PF.

Figure 3. Linearity of autoradiography optical density vs. total RNA loaded in slot blots. From 0.625 to 20 μ g of liver total RNA were loaded on a GeneScreen membrane and then hybridized with a 32 P-labeled Ao cDNA. This experiment was carried out twice at least.

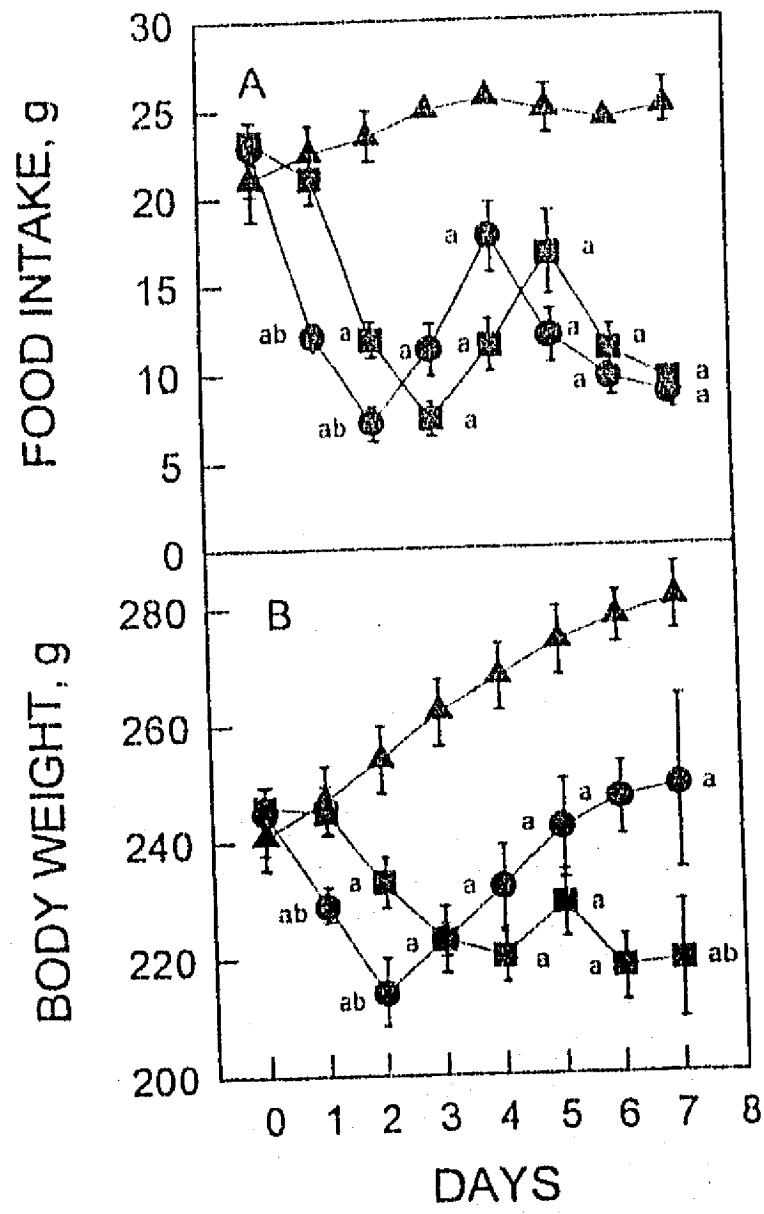


Figure 1.

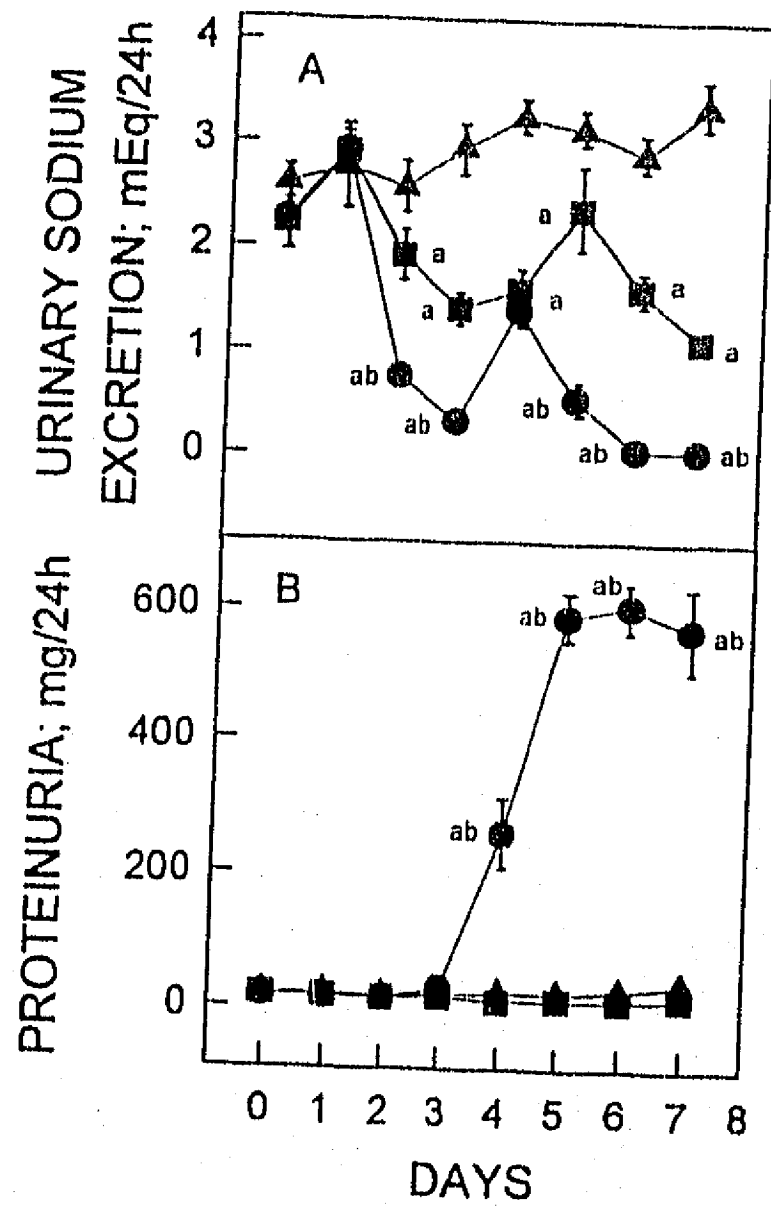


Figure 2.

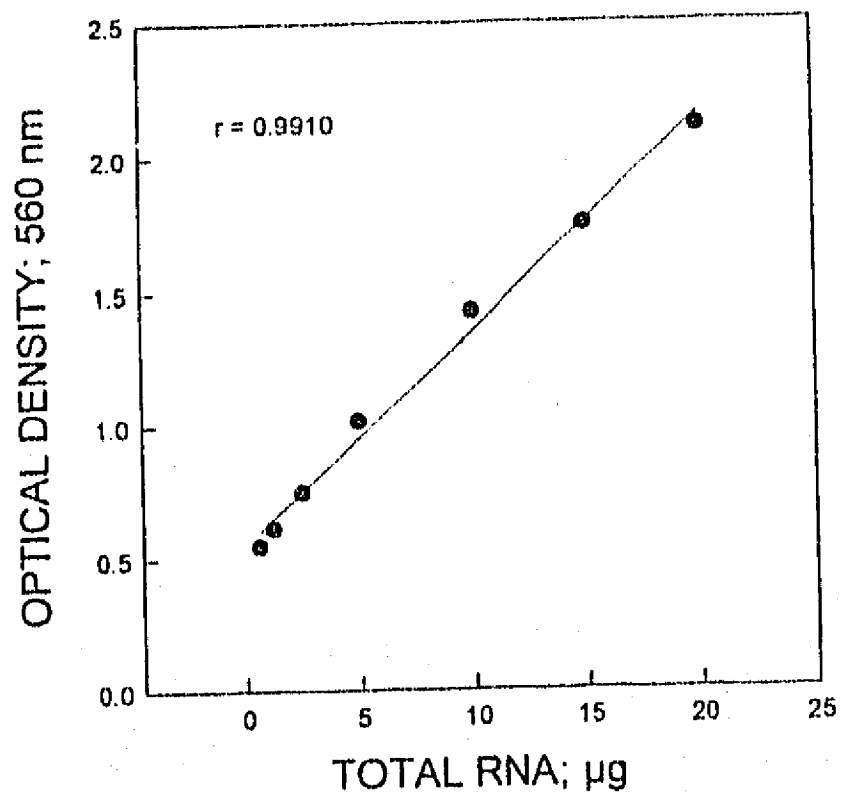


Figure 3.

RENAL FAILURE

Editor-in-Chief: William F. Finn, M.D.
Department of Medicine
University of North Carolina
CB #7155, 325 MacNider Bldg
Chapel Hill, NC, USA 27599
Tel: 919-966-2561
Fax: 919-966-4251
eMail: wffinn@med.unc.edu

August 29, 1996

Maria Elena Ibarra-Rubio
Titular Investigator
Depto. Nefrologia y Metabolismo Mineral
Instituto Nacional de la Nutricion
Dalvador Zubiran
Vasco de Quiroga # 15, Tlalpan
Mexico D.F. 14000
MEXICO
Fax (525) 655-0382

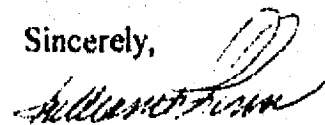
RE: MS # 96-044

Dear Dr. Ibarra-Rubio:

I am pleased to inform you that your manuscript entitled, "Hepatic and extrahepatic angiotensinogen gene expression in rats with acute nephrotic syndrome" (MS # 96-044) has been accepted for publication in *RENAL FAILURE*. The manuscript will be published in an issue of Volume 19, 1997.

I appreciate your continued interest in *RENAL Failure* and look forward to further correspondence.

Sincerely,



William F. Finn, MD
Professor of Medicine
Editor-in-Chief, *Renal Failure*

**RENIN, PRORENIN, AND ITS GENE EXPRESSION IN RATS WITH ACUTE NEPHROTIC
SYNDROME**

**María Elena Ibarra-Rubio, Margarita Ramos V, Ricardo Correa-Rotter, and *José Pedraza-
Chaverri**

Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador
Zubirán" and *Departamento de Biología, Facultad de Química, U.N.A.M., México D. F.,
México.

Short title: Renin, prorenin and its gene expression in NS

Correspondence to:

María Elena Ibarra-Rubio
Depto. Nefrología y Metabolismo Mineral
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
Vasco de Quiroga #15, Tlalpan
14000 México D. F.
Phone (525) 622-3515, Fax. (525) 655-0382.

José Pedraza-Chaverri
Facultad de Química, Edificio "B",
Lab. 209, 2o. Piso,
Ciudad Universitaria, U.N.A.M.
04510 México D. F., México

ABSTRACT

1. The concentration of total, active, and inactive renin was analyzed in plasma, urine and kidney from control (C), pair fed (PF), and nephrotic (NS) rats, as well as renin mRNA levels in kidney, liver, and brain.
2. NS was induced by a single subcutaneous injection of puromycin aminonucleoside (PAN) and determinations were made 6 days after PAN injection.
3. Plasma total renin did not change, active renin increased in NS rats with respect to PF and C groups and in PF rats with respect to C. In contrast, inactive renin percentage decreased in NS rats with respect to PF and C groups, and in PF animals with respect to C. Total, active and inactive renal renin content did not change, and active and inactive renin were importantly excreted by urine with no changes in the prorenin percentage with respect to C and PF groups.
4. In both experimental groups, renin mRNA levels did not change in any of the studied tissues. In another group of rats, kidney renin mRNA levels were measured on days 1, 3, 5, and 7 after PAN injection and no time-course changes in its expression were found.
5. These results suggest that renin gene expression is not altered in acute nephrotic syndrome and that plasma renin concentration is regulated at the translational or posttranslational level in this experimental model.

Key words: nephrotic syndrome, prorenin, renin, renin gene expression, renin mRNA.

INTRODUCTION

Nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside (PAN) is an experimental model of the human minimal changes disease characterized by severe proteinuria, hypoproteinemia, sodium retention, ascites, and hyperlipidemia.¹⁻⁴ In this syndrome there is an increase in the glomerular filtration of plasma proteins, which induces alterations in the concentration (increase or decrease) of almost all plasma proteins,^{2,3,5} including those of the renin-angiotensin system (RAS). Nephrotic rats have high circulating levels of renin since day 5 after PAN injection with peak values on days 6 and 7,¹ decreased plasma angiotensinogen (Ao) concentration (PAoC) and high urinary excretion of renin, Ao, and angiotensin I converting enzyme since days 4-5 after PAN injection.^{1,6-8} The mechanism by which renin is increased in PAN-nephrotic rats in spite of its important urinary loss is unknown.

Morris and Lumbers⁹ produced the first evidence of the existence of inactive renin twenty five years ago. Now it is known that renin is synthesized as a zymogen (prorenin),⁹⁻¹¹ and that it is found in high concentrations in plasma.¹² Acute stimulation of renin release in humans does not produce immediate changes in plasma prorenin, but chronic stimulation modifies renin and prorenin levels in the same way.¹³⁻¹⁶ In contrast, several studies in rats have demonstrated acute *in vivo* alterations in the plasma levels of prorenin in response to stimulation or suppression of the RAS.¹⁷⁻²⁰ There are many studies in which the relationship between renin and its renal mRNA levels is investigated and the changes in both seem to be nonproportional.²¹⁻²⁴ But the primary product of renin gene transcription is prorenin, therefore, we studied the relationship between renin mRNA levels and total, active and inactive renin in PAN-nephrotic rats.

Renin and its mRNA have been found in extrarenal tissues^{11, 25-27} and a tissue-specific response has been observed under different situations.^{25, 28-31} Also, the other components of the RAS have been found in many tissues, which has led to propose the existence of local RAS.^{11, 25, 31-34} It is unknown if there are alterations in the renin mRNA levels in tissues other than the kidney in PAN-nephrotic rats.

Food intake is considerably reduced in PAN-nephrotic rats^{35, 36} and it is known that nutritional factors affect the expression of the RAS genes.^{37, 38} So, it is important to have a pair-fed group (PF) to PAN-nephrotic rats as a control.

Therefore, in this work the renal and extrarenal renin gene expression was analyzed by measuring the renin mRNA levels in kidney, brain, and liver from control (C), PF and PAN-nephrotic (NS) rats, as well as total, active and inactive renin levels in plasma, kidney and urine.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Nephrotic syndrome was induced in male Wistar rats (230-250 g of initial body weight) by a single subcutaneous injection of a 2% PAN (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) solution in 0.9% saline at a dose of 15 mg/100 g of body weight.² Since food intake is reduced in NS rats, a PF group was included, as well as an untreated C group which was fed *ad libitum*. PF and C groups received a single subcutaneous injection of 0.9% saline solution. To standardize conditions under which the steady state levels of specific mRNAs were determined, rats were

placed under the same environmental conditions in metabolic cages and 24-hours urine was collected on the days of study.

Food intake of PAN-treated rats was measured daily and an equal amount of food was given to PF rats. Body weight was determined daily. Nineteen rats with NS, 13 PF, and 13 C were sacrificed by decapitation on day 6 after PAN or saline injection; blood was collected, and one kidney and a half, liver, and brain were removed and immediately frozen in liquid nitrogen for further RNA extraction. The other half of kidney was placed in 1 ml of distilled deionized water and frozen at -70°C until kidney homogenates were obtained as previously described³⁹ and renal content of renin and prorenin was determined.

Also, a time-course study was done obtaining samples on days 1, 3, 5, and 7 after PAN-injection (two rats for each group at each time point).

Analytical Methods

Urinary sodium was determined by flame photometry (flame photometer model 403, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA). Total protein in serum or urine was measured as previously described.⁸ Cholesterol was measured enzymatically according to the manufacturer instructions (Farmacéuticos Lakeside, México D. F.).

Plasma renin activity (PRA) was measured indirectly by radioimmunoassay (RIA) of angiotensin I (AI) after incubation of plasma at pH 6.0 for 1 h at 37°C using the endogenous substrate as previously described.^{1,39} PAoC was measured in a similar way but in this case samples were incubated in the presence of an excess of porcine renin.^{1,39}

The concentration of active, total, and inactive renin was determined by the method described by Barret and Eggena¹⁷ with some modifications. Duplicate 50 µL aliquots of sample were incubated on ice with 5 µL of the chosen trypsin concentration (trypsin type IX 6,630 units/mg solid, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) or trypsin vehicle (sodium acetate buffer, 0.05 M, 0.05 M CaCl₂, pH 4.5), except urine from C and PF groups, where duplicate 0.1 mL aliquots of sample were incubated with 0.01 mL of trypsin or trypsin vehicle. After 1.5 h, 5 µL of soybean trypsin inhibitor type I-S (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (10 mg/mL final concentration in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4) were added to all samples. A 1:4 dilution for renal homogenate samples and 1:25 for NS urine samples was done in maleate buffer 0.2 M, pH 6.0, and 0.45 mL of nephrectomized rat plasma (rich in renin substrate) were added to a 0.05 mL aliquot of these dilutions or to the plasma sample. Five microliters of the following angiotensinases inhibitors were added: 8-OH quinoline sulfate (3.4 mM, final

concentration) and dimercaprol (1.8 mM, final concentration); plasma samples had also EDTA. Then, 1 mL of maleate buffer was added. One half of the volume of these mixtures was incubated at 37°C and the other one at 4°C (zero time) for 1 h. At the end of the incubation time, samples at 37°C were placed on ice to terminate the renin reaction and the generated AI was measured by RIA.⁴⁰ For plasma incubation mixtures 100 µL were used, 50 µL plus 50 µL 5% bovine serum albumin (BSA) for urine incubation mixture, 25 µL plus 75 µL BSA for 37°C kidney homogenate incubation mixtures, and 50 µL plus 50 µL BSA for zero time mixtures. Renin activity was defined as the difference between zero time values and the level of AI detected in 37°C incubation mixtures. Inactive renin was defined as the absolute difference between the rate of AI generation in trypsin treated (*i.e.* total) and untreated (*i.e.* active) samples. With this methodology, curves with different incubation times (data not shown) and trypsin concentrations were done to define the optimum conditions to activate prorenin for each studied biological sample.

Total kidney RNA was isolated according to the method of Chomczynski and Sacchi⁴¹ by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform, and that from brain and liver was isolated with the Trizol-reagent (Gibco-BRL, Life Technologies, MD, USA) according to the manufacturer instructions.

A full-length rat renin cDNA (pRen44.ceb) was obtained from Dr. K. R. Lynch (University of Virginia, Charlottesville, VA).⁴² This clone was grown, plasmids were isolated, and renin cDNA fragment was removed by digestion with Bam H1 and Hind III.

Aliquots of 15 µg of total RNA, as measured by absorbance at 260 nm, were applied to Gene Screen filters (DuPont-New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA) using a Milli Blot-S apparatus (Millipore Intertech, Bedford, MA, USA). Before applying the RNA, it was denatured for 15 min at 68°C in a solution containing 50% formamide, 7% formaldehyde, and 1x sodium chloride-sodium citrate (SSC). The RNA was cross-linked to the filter with the UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The filters were prehybridized for 1 h at 42°C in a solution of 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate (500 000 Av. Mol. Wt.), 1% SDS, 1 M sodium chloride, and 100 µg/mL denatured sonicated salmon testes DNA. Hybridization of filters was carried out by adding 2×10^8 cpm/mL of the appropriate cDNA which was radiolabeled with the Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer instructions. The hybridization reaction was carried out at 42°C for 14-18 h. Filters were washed under high stringency conditions. Briefly, this included

one low-stringency wash (2x SSC-0.1% SDS, 15 min, room temperature) and three high-stringency washes (0.1x SSC-0.1% SDS, 15 min, 65°C). The washed filters were exposed to Kodak XAR film at -70°C in the presence of image-intensifying screens. The autorradiographs were quantitated by using the program Gel Scan Area of the DU 640 spectrophotometer from Beckman Instruments Inc. (Fullerton, CA, USA). Before analyzing renin mRNA, slot blots were done loading 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ng of total RNA and a linearity was observed until 20 ng (data not shown); therefore, determinations were done loading 15 ng of total RNA.

For quantitation of mRNA abundance, all samples from each tissue were analyzed together on a single slot blot to control for day-to-day variation in hybridization efficiency. Each slot blot was done in duplicate, one of them was hybridized with renin cDNA and the other one with β -actin cDNA in parallel to correct for differences in RNA loading and to determine whether the responses were gene specific. Densitometric values represent the integration of the area under the curve corrected for the baseline background reading. Renin mRNA levels were expressed as relative densitometry units factored for β -actin. Each hybridization experiment was done twice, at least. Average values for each animal, and then for groups of animals were calculated.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm s.e.m. One way ANOVA or ANOVA on ranks and multiple comparison methods of Student-Newman-Keuls or Dunn's tests, as the case may be, were used to compare the results of the different groups by using the SigmaStat statistical software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA). A probability less or equal to 0.05 was considered significant.

RESULTS

Table 1 shows that nephrotic rats presented the characteristic alterations of the nephrotic syndrome: hypoproteinemia, hypercholesterolemia, and sodium retention. In addition, these rats showed an increase in PRA and a decrease in PAoC (Table 1). In PF animals, serum total protein, cholesterol, and PAoC were normal, sodium excretion was decreased but not as much as in NS rats and PRA tended to increase yet did not reach statistical significance. In figure 1 are depicted the food intake (A), body weight (B), and proteinuria (C) profiles. Food intake clearly diminished in NS rats which influenced body weight. The body weight decrease was

more profound in PF rats than in nephrotic animals since NS group presents ascites and edema from day 4 which induce a body weight increase.

Before determining total, active, and inactive renin, plasma and kidney homogenate from C rats and urine from NS rats were incubated on ice with different trypsin concentrations. Curves of the total renin, prorenin, and prorenin percentage in plasma, urine, and kidney homogenates are shown in figures 2, 3, and 4, respectively. In plasma a maximum was reached by incubation for 1.5 hours with 7.5 mg/mL of trypsin and there was a plateau until 30 mg/mL. In urine a maximum was reached by incubation for 1.5 hours with 10-12.5 mg/mL of trypsin with a trend to decline at higher concentrations of trypsin and a clear decrease at 25 mg/mL. In kidney homogenate a plateau was reached from 5 mg/mL to 20 mg/mL of trypsin during 1.5 hours. Therefore, based on these curves, prorenin determinations were done with an incubation on ice for 1.5 h with a final trypsin concentration of 15 mg/mL in plasma and kidney homogenates and 12.5 mg/mL in urine. Results of plasma total, active, and inactive renin in C, PF and NS rats are in table 2. Total renin did not change in NS or PF groups, but active renin increased in NS group with respect to C and PF, and in PF group increased with respect to C, and prorenin percentage decreased in NS animals with respect to C and PF, and in PF group decreased with respect to C. Inactive renin tends to decrease in NS rats with respect to C and PF, and in PF rats with respect to C, but these changes did not reach statistical significance. Total, active, and inactive renin were importantly excreted by urine in NS rats whereas very low quantities of them were excreted in C and PF animals, however the prorenin percentage was similar among the three groups (Table 3). There were no changes in the kidney renin content of total, active and inactive renin as well as in prorenin percentage (Table 4).

Renin mRNA levels did not change in kidney, liver or brain neither in NS nor in PF groups on day 6 (Table 5). Likewise, nephrotic syndrome or low food intake had no effect on renal renin mRNA on days 1, 3, 5, or 7 (Table 6). We also attempted to study renin mRNA levels in heart, but they could not be detected with the used technique.

DISCUSSION

It is known that the RAS is profoundly altered in PAN-nephrotic rats,^{1,6-8,30} and, among these alterations, PRA and PRC are increased and renin is importantly excreted by urine. It is unknown the mechanism by which circulating renin is increased in spite of its important urinary

loss. Therefore, in this work we studied total, active, and inactive renin levels in plasma, kidney and urine, and renin mRNA levels in kidney, brain and liver in NS, PF and C rats.

On day 6 after PAN injection, nephrotic syndrome was clearly established as proteinuria, hypoproteinemia, sodium retention and hypercholesterolemia indicate. Also, the decrease in food intake in NS rats was clear, and the importance of this decrease was made evident by the alterations observed in PF rats such as the decrease in urinary sodium excretion, the increase in plasma active renin concentration, the decrease in plasma prorenin percentage and the growth retardation; although this last observation may also be explained by a decrease in insulin-like growth factor I and a reduction in growth hormone receptor mRNA.³⁶ The increased body weight in NS rats as compared to PF group is probably explained by edema and ascites formation starting on day 4 in nephrotic animals. It is important to note that the changes observed in nephrotic rats were not completely explained by the decrease in food intake since the changes in NS group were more marked than in PF group.

Curves with increasing trypsin concentrations were done to determine the optimum trypsin concentration to convert prorenin to renin for each biological sample. Also, the use of small volumes of test sample (0.05 mL) with a large volume (0.45 mL) of renin substrate (nephrectomized rat plasma) result in low to nondetectable blank values that account for less than 2% of the total AI detected after a 1 h incubation with the optimum trypsin concentration.⁴³ Also, we observed that blank was higher (up to 15%) with no optimum trypsin concentrations. Moreover, addition of exogenous renin substrate after trypsin incubation and inhibition avoid the possibility of error or kinetic biases due to endogenous renin substrate degradation by trypsin.⁴⁴⁻⁴⁷ With these cautions the method for activation of inactive renin was validated in plasma, urine, and kidney homogenate.

PRA was increased in nephrotic rats but this increase was limited because renin activity was determined with endogenous Ao which is markedly decreased in NS rats and that is why the increase in PRC is greater as this determination is done in the presence of exogenous Ao and therefore the substrate is not limiting.

In the present study, plasma total renin did not change, but active renin increased almost four-fold in NS rats, and twice in PF animals; plasma prorenin decreased (although did not reach statistical significance) and its percentage also decreased 23% in NS rats and 9% in PF animals. The increase in plasma active renin coincides with the decrease in the inactive one in both, NS and PF groups. These results support the hypothesis of the circulating prorenin as a

source of "quick renin".⁴⁵ Although the question that renin levels may rise in high renin states through prorenin conversion has not been conclusively answered, this has been found to happen in rats.²⁰ Barret and Eggena¹⁷ found that acute stress plus pentobarbital anesthesia or pentobarbital alone¹⁸ induces a decrease in prorenin and an increase in renin. Jindra and Kvetnansky¹⁹ proposed changes in the conversion of prorenin to renin as responsible for the changes in renin in acute stress. Also, Jindra *et al.*⁴⁸ found reciprocal changes of plasma active and inactive renin under an initial interval of immobilization stress in rats and they suggest an activation of circulating inactive renin. These authors observed a slight decrease in circulating inactive renin passing through the kidney suggesting that, at least in rats, *in vivo* pathways for activation of inactive renin might exist, other than that proceeding before secretion from renin granules.

Other possible explanation for our results is that a major proportion of prorenin just synthesized is sorted to the regulated pathway where prorenin is activated and secreted by mature secretory granules as active renin.^{11,13,14,16} The exact mechanism(s) by which this process is regulated is yet unknown,⁴⁹ although it has been proposed that the chemiosmotic environment is a factor that regulates prorenin processing.⁵⁰ Diabetic patients, with the syndrome of hyporeninemic hypoaldosteronism, have high circulating levels of prorenin and low renin, and a defect in the enzymatic processing of prorenin has been suggested as an explanation for this observation⁵¹ as well as in most cases of low renin syndromes.⁵²

There may be an increase in renal renin synthesis, but, if this is true, the secretion rate should be increased at the same extent since there were no changes in the renal content of renin and/or prorenin. In fact, it has been proposed that renin just synthesized is not stored in kidney but is quickly secreted into circulation during sodium depletion and captopril treatment.²¹ Moreover, Gómez *et al.*⁵³ have found an increase in PRA and renal mRNA with no changes in renal content during enalapril treatment. However, this possible increase in renin synthesis is little probable since it has been found that *in vitro* renal renin secretion is not increased in PAN-nephrotic rats.³⁰

Theoretically, another possible explanation for the increase in circulating levels of active renin in PAN-nephrotic rats is the decrease in renin degradation. It is known that plasma prorenin is removed from the circulation mainly by the kidneys⁵⁴ and plasma renin by the liver,⁵⁵ but actually little is known about the regulation of renin clearance and degradation. Alterations in the plasma half-life of active renin have been found in acute stimulation of renal renin

secretion by losartan.⁵⁶ It is yet unknown whether preferential clearance or degradation changes may play a role on the differential changes of renin and prorenin in PAN-nephrotic rats.

On the other hand, renin gene expression did not change neither in kidney nor in brain or liver. Moreover, there were no changes in kidney renin mRNA levels at any of the studied times (days 1,3,5,7) after PAN injection. Therefore, renin mRNA did not correlate with active or inactive renin, but correlated with total renin which did not change in this experimental model. As in the present work, no correlation among mRNA, PRA, PRC, renal renin content and/or renal renin secretion changes was found during sodium depletion, captopril treatment and angiotensin II infusion,²¹ experimentally induced hypertension,²² and with enalapril treatment.²³ These authors proposed posttranscriptional and most likely posttranslational mechanisms as the main contributors in regulating the plasma renin levels in these experimental models as now we do in the experimental acute nephrotic syndrome. Recently, Campbell *et al.*⁵⁷ found that renal renin mRNA is more consistently related to plasma prorenin than to plasma renin concentration in Dahl S and R rats under high, medium or low sodium diets and they concluded that renin gene expression determines prorenin synthesis, not renin formation, and that the rate of renin formation is also determined by factors that regulate the proportion of prorenin diverted into the renin processing pathway. In the same way, we think that renin and prorenin changes observed in PAN-nephrotic rats are regulated by the proportion of prorenin sorted into the regulated renin secreting pathway and, also, in part, by the activation of circulating prorenin in liver and/or kidney.⁵⁸ King *et al.*⁵⁰ have also proposed that conversion of prorenin to renin is a key site of regulation of renin expression, meaning that renin secretion will be elevated so long as conversion is enhanced, and, conversely, renin secretion will be suppressed either when prorenin expression is inhibited or conversion is aborted.

Therefore, the results in the present work strongly suggest that the mechanism by which plasma renin activity is increased in nephrotic rats is not at transcriptional level but most probably at translational or posttranslational level.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (No. 1760-M9210) given to M.E.I.R.

REFERENCES

1. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia and renin-angiotensin-aldosterone system on the sodium retention. *Rev. Invest. Clin.* 1990;42:29-38.
2. Glasscock RJ, Cohen AH, Adler SG. Primary glomerular diseases. In: Brenner BM (ed). *The Kidney, 5th. Edition.* WB Saunders Co., Philadelphia. 1996; Ch. 30.
3. Pyo HJ, Summer SN, Niederberger M, Kim JK, Schrier RW. Arginine-vasopressin gene expression in rats with puromycin-induced nephrotic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* 1995;25:58-62.
4. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol. *Exp. Nephrol.* 1995;3:270-9.
5. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: Pathophysiology and complications. In: Stein JH (ed). *Contemporary Issues in Nephrology.* Churchill Livingstone, New York. 1982; Ch. 4.
6. Yayama K, Konishi K, Ohta A, Takano M, Ohtani R, Itoh N, Okamoto H. Elevation of plasma angiotensinogen in rats with experimentally induced nephrosis. *Nephron* 1993;63:89-93.
7. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC. Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 1991;57:106-8.
8. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin I converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin. Chim. Acta* 1990;191:175-84.
9. Morris BJ, Smith DL. Prorenin and gene activation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1367-74.
10. Hollenberg NK, Ingelfinger JR, Dzau VJ. The renin angiotensin system. In: Narins RG (ed). *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism, 5th. Edition.* McGraw-Hill Inc., New York. 1994; Ch. 16.
11. Morris BJ. New possibilities for intracellular renin and inactive renin now that the structure of the human renin gene has been elucidated. *Clin. Sci.* 1986;71:345-55.
12. Sealey JE, von Lutterotti N, Rubattu S, Campbell WG. Jr., Gahnem F, Halimi JM, Laragh JH. The greater renin system. Its prorenin-directed vasodilator limb: Relevance to diabetes mellitus, pregnancy, and hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. 2nd. Edition.* Raven Press Ltd., New York. 1995; Ch. 111.

13. Nielsen AH, Poulsen K. Is prorenin of physiological and clinical significance? *J. Hypertens.* 1988;6:949-58.
14. Hsueh WA, Baxter JD. Human prorenin. *Hypertension* 1991;17:469-79.
15. Derkx FHM, Schalekamp MADH. Human prorenin: pathophysiology and clinical implications. *Clin. Exp. Hypertens.* 1988;A10:1213-25.
16. Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Menard J, Schambelan M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. *J. Clin. Invest.* 1989;83:679-87.
17. Barret JD, Eggena P. The influence of acute stress on active and inactive renin in the rat. *Clin. Exp. Hypertens.* 1986;A8:1171-8.
18. Barret JD, Eggena P, Sambhi MP. In vivo and in vitro alterations of active and inactive plasma renins in the rat. *Hypertension* 1982;4(suppl):1175-9.
19. Jindra A, Jr., Kvetnansky R. Stress-induced activation of inactive renin. Molecular weight aspects. *J. Biol. Chem.* 1982;257:5997-9.
20. Hare GMT, Ioannous P, Dubiski S, Osmond DH. Regulated systemic activation of rat plasma prorenin. *Hypertension* 1987;10:122-6.
21. Nakamura N, Soubrier F, Menard J, Panthier JJ, Rougeon F, Corvol P. Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content, and rat renin messenger RNA. *Hypertension* 1985;7:855-9.
22. Moffet RB, McGowan RA, Gross KW. Modulation of kidney renin messenger RNA levels during experimentally induced hypertension. *Hypertension* 1986;8:874-82.
23. Barret GL, Morgan TO, Smith M, Alcorn D, Aldred P. Effect of converting enzyme inhibition on renin synthesis and secretion in mice. *Hypertension* 1989;14:385-95.
24. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1992;938-50.
25. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. El concepto actual del sistema renina-angiotensina. *Rev. Invest. Clin.* 1993;45:165-77.
26. Ekker M, Tronik D, Rougeon F. Extrarenal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:5155-8.
27. Lou Y, Smith L, Robinson BG, Morris BJ. Renin gene expression in various tissues determined by single-step polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1991;18:357-62.
28. Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin angiotensin system. *Am. J. Physiol.* 1988;255:F563-73.

29. Suzuki F, Lindpaintner K, Keuneke C, Hellman W, Takahashi S, Nakamura Y, Ohkubo H, Nakanishi S, Murakami K, Ganten D. Tissue-specific regulation of gene expression for renin and angiotensinogen. *Clin. Exp. Hypertens.* 1988;A10:1317-9.
30. Lou Y, Liu DT, Whitworth JA, Morris BJ. Renin mRNA, quantified by polymerase chain reaction, in renal hypertensive rat tissues. *Hypertension* 1995;26:656-64.
31. Morris BJ. Some physiological outcomes of renin gene studies. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995;22:966-75.
32. Schunkert H, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Evolving concepts of the intrarenal renin-angiotensin system in health and disease: contributions of molecular biology. *Renal Physiol. Biochem.* 1991;14:146-54.
33. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988;77(Suppl I):I 4-13.
34. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 1987;79:1-6.
35. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J, Panduro A. Differential regulation in the expression of hepatic genes in nephrotic and pair-fed rats. *Nephron* 1993;65:119-24.
36. Thabet MA, Challa A, Chan W, Liu F, Hintz RL, Chan JCM. Insulin like growth factor and growth hormone receptor in nephrotic rats. *Am. J. Physiol.* 1994;266:E102-6.
37. Iwao H, Fukui K, Kim S, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, Youichi A. Sodium balance effects on renin, angiotensinogen, and atrial natriuretic polypeptide mRNA levels. *Am. J. Physiol.* 1988;255:E129-36.
38. Rosenberg ME, Chimielewski D, Hostetter TH. Effect of dietary protein on rat renin and angiotensinogen gene expression. *J. Clin. Invest.* 1990;85:1144-9.
39. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. *In vitro* release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev. Invest. Clin.* 1990;42:120-6.
40. Pedraza-Chaverri J, Zúñiga-Estrada A, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC. Producción de anticuerpos policlonales para la cuantificación del decapeptido angiotensina I por radioinmunoanálisis. *Rev. Invest. Clin.* 1988a;40:365-77.
41. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9.
42. Burnham ChE, Hawelu-Johnson CL, Frank BM, Lynch KR. Molecular cloning of rat renin cDNA and its gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:5605-9.

43. Barret JD, Eggena P. Trypsin activation of inactive renin: plasma blanks and angiotensin I radioimmunoassay. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1315-20.
44. Barret JD, Eggena P. Effects of trypsin on the measurement of inactive renin in rat plasma by radio-immunoassay. decrease in inactive renin following nephrectomy. *J. Hypertens.* 1988;6:49-55.
45. Osmond DH, Sealey JE, Mckenzie JK. Activation and function of prorenin: different viewpoints. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1308-14.
46. Poulsen K, Nielsen AH, Johannessen A. Measurement of inactive renin in normal, nephrectomized, and adrenalectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1381-4.
47. Ioannou P, Loh AY, Osmond DH. Activation and measurement of plasma prorenin in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1331-40.
48. Jindra A, Jr., Bultas J, Ort J. Investigation of human and rat inactive renin in plasma and kidney. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1341-9.
49. Hsueh WA, Do YS, Wang PH. Observations on the renal processing and sorting of prorenin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991;69:1327-30.
50. King JA, Lush DJ, Fray JCS. Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am. J. Physiol.* 1993;265:C305-20.
51. Luetscher JA, Kramer FB, Wilson DM. Prorenin and vascular complication of diabetes. *Am. J. Hypertens.* 1989;2:382-6.
52. Lush DJ, King JA, Fray JCS. Pathophysiology of low renin syndromes: Sites of renal renin secretory impairment and prorenin overexpression. *Kidney Int.* 1993;43:983-999.
53. Gómez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, Peach MJ, Carey RM. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am. J. Physiol.* 1988;254:F900-6.
54. Nielsen AH, Poulsen K. Evidence for a predominant renal secretion and clearance of inactive plasma renin, studied by in vitro inhibition of protein synthesis. *J. Hypertens.* 1989;2:382-6.
55. Marks DL, Kost LJ, Kuntz SM, Romero JC, LaRusso NF. Hepatic processing of recombinant human renin: Mechanisms of uptake and degradation. *Am. J. Physiol.* 1991;261:G349-58.
56. Opsahl JA, Goldberg MR, Katz SA. Effect of acute and chronic losartan therapy on active and inactive renin and active renin glycoforms. *Am. J. Hypertens.* 1995;8:1090-8.
57. Campbell WG, Jr., Catanzaro DF, Gahnem F, Sealey JE. Prorenin better reflects renal renin mRNA than renin. *J. Hypertens.* 1996;14:S211.

58. Kim S, Hosoi M, Ikemoto F, Murakami K, Ishizuka Y, Yamamoto K. Conversion to renin of exogenously administered recombinant human prorenin in liver and kidney of monkeys. *Am. J. Physiol.* 1990;258:E451-8.

Table 1. Serum, plasma and urine determinations on day 6 after PAN injection.

	Control	Pair-fed	Nephrotic syndrome
Total protein, g/dL	7.03 ± 0.28	7.60 ± 0.45	3.97 ± 0.11*
Cholesterol, mg/dL	60 ± 3	61 ± 4	263 ± 21*
Urinary sodium, mEq/24h	2.89 ± 0.19	1.60 ± 0.18*	0.06 ± 0.01*
PRA, ng AI/mL/h	3.6 ± 0.4	4.9 ± 0.6	6.0 ± 0.7*
PAoC, ng AI/mL/h	978 ± 62	941 ± 42	509 ± 22*

Data are expressed as mean ± s.e.m. n = 11-13 for pair-fed and control groups, and n = 17-19 for nephrotic syndrome group. * = p ≤ 0.05 vs. control and pair-fed. ** = p ≤ 0.05 vs. control. PRA = Plasma renin activity, PAoC = Plasma angiotensinogen concentration, AI = Angiotensin I.

Table 2. Renin determinations in plasma.

Renin	Control	Pair-fed	Nephrotic syndrome
Total, ng AI/mL/h	127 ± 11	108 ± 11	107 ± 8.4
Active, ng AI/mL/h	8.5 ± 1.6	16 ± 1.7 [#]	31 ± 4.1 [*]
Inactive, ng AI/mL/h	117 ± 11	93 ± 12	82 ± 6.8
% Inactive	92 ± 1.5	83 ± 2.3 [#]	69 ± 3.6 [*]

Data are expressed as mean ± s.e.m. n = 11-13 for pair-fed and control groups, and n = 17-19 for nephrotic syndrome group. * = p ≤ 0.05 vs. control and pair-fed, # = p ≤ 0.05 vs. control. AI = Angiotensin I.

Table 3. Renin determinations in 24 h urine.

Renin	Control	Pair-fed	Nephrotic syndrome
Total, ng AI/mL/24h	25 ± 3.8	14.2 ± 1.3	5030 ± 557 [*]
Active, ng AI/mL/24h	14.7 ± 4.5	9.6 ± 3.9	3385 ± 587 [*]
Inactive, ng AI/mL/24h	10.7 ± 3.4	4.6 ± 1.4	1645 ± 413 [*]
% Inactive	42 ± 5	32 ± 7.2	33 ± 6.9

Data are expressed as mean ± s.e.m. n = 11-13 for pair-fed and control groups, and n = 17-19 for nephrotic syndrome group. * = p ≤ 0.05 vs. control and pair-fed. AI = Angiotensin I.

Table 4. Renin determinations in kidney homogenates.

Renin	Control	Pair-fed	Nephrotic syndrome
Total, ng AI/ mg prot	10.3 ± 1.5	12.1 ± 1.1	10.6 ± 0.8
Active, ng AI/ mg prot	6.2 ± 0.8	6.2 ± 0.7	6.2 ± 0.4
Inactive, ng AI/ mg prot	5.0 ± 0.7	6.0 ± 0.5	4.4 ± 0.5
% Inactive	44 ± 3.6	50 ± 2.9	41 ± 2.3

Data are expressed as mean ± s.e.m. n = 11-13 for pair-fed and control groups, and n = 17-19 for nephrotic syndrome group. AI = Angiotensin I.

Table 5. Renin mRNA levels on day 6 after PAN injection.

Tissue	Control	Pair-fed	Nephrotic syndrome
Kidney	0.40 ± 0.05	0.66 ± 0.08	0.60 ± 0.08
Liver	1.10 ± 0.11	1.52 ± 0.23	0.87 ± 0.12
Brain	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.03

Data are mean ± s.e.m. of relative densitometry units factored for β-actin. n = 11-13 for pair-fed and control groups, and n = 17-19 for nephrotic syndrome group.

Table 6. Kidney renin mRNA levels.

	Control	Pair-fed	Nephrotic syndrome
Day 1	0.87 ± 0.06	1.13 ± 0.09	0.86 ± 0.07
Day 3	1.12 ± 0.09	1.35 ± 0.14	1.13 ± 0.01
Day 5	0.82 ± 0.06	1.22 ± 0.16	0.93 ± 0.07
Day 7	1.08 ± 0.08	1.29 ± 0.12	1.13 ± 0.14

Data are mean ± s.e.m. of relative densitometry units factored for β-actin. n = 2

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Food intake (A), body weight (B), and proteinuria (C) in control (\blacktriangle), pair-fed (\blacksquare), and nephrotic syndrome (\bullet) groups. Results represent the mean \pm s.e.m. of 11-13 determinations for control and pair-fed groups, and 17-19 determinations for nephrotic syndrome group. a = $p \leq 0.05$ vs. control group, b = $p \leq 0.05$ vs. control and pair-fed groups.

Figure 2. Effect of trypsin concentration on activation of inactive renin in the plasma from control rats during a 1.5 h incubation time. Trypsin concentrations are final.

Figure 3. Effect of trypsin concentration on activation of inactive renin in the urine from nephrotic rats during a 1.5 h incubation time. Trypsin concentrations are final.

Figure 4. Effect of trypsin concentration on activation of inactive renin in the kidney homogenate from control rats during a 1.5 h incubation time. Trypsin concentrations are final.

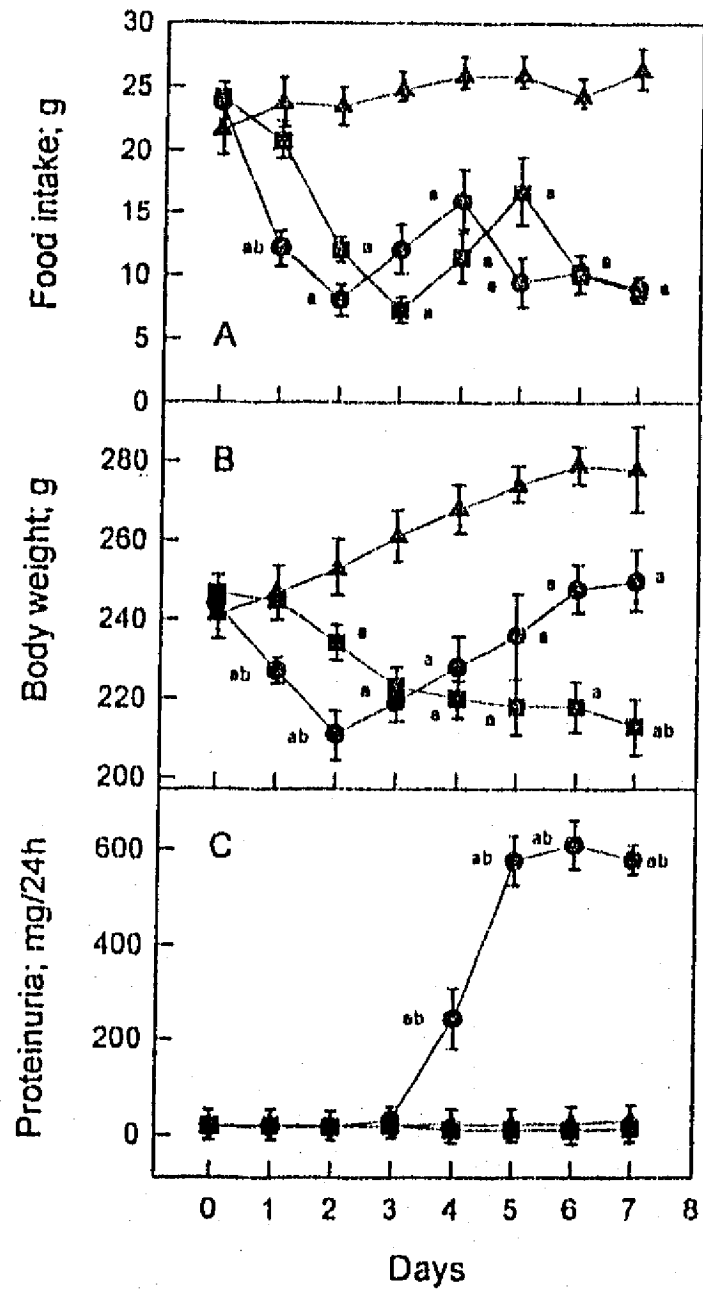


Figure 1.

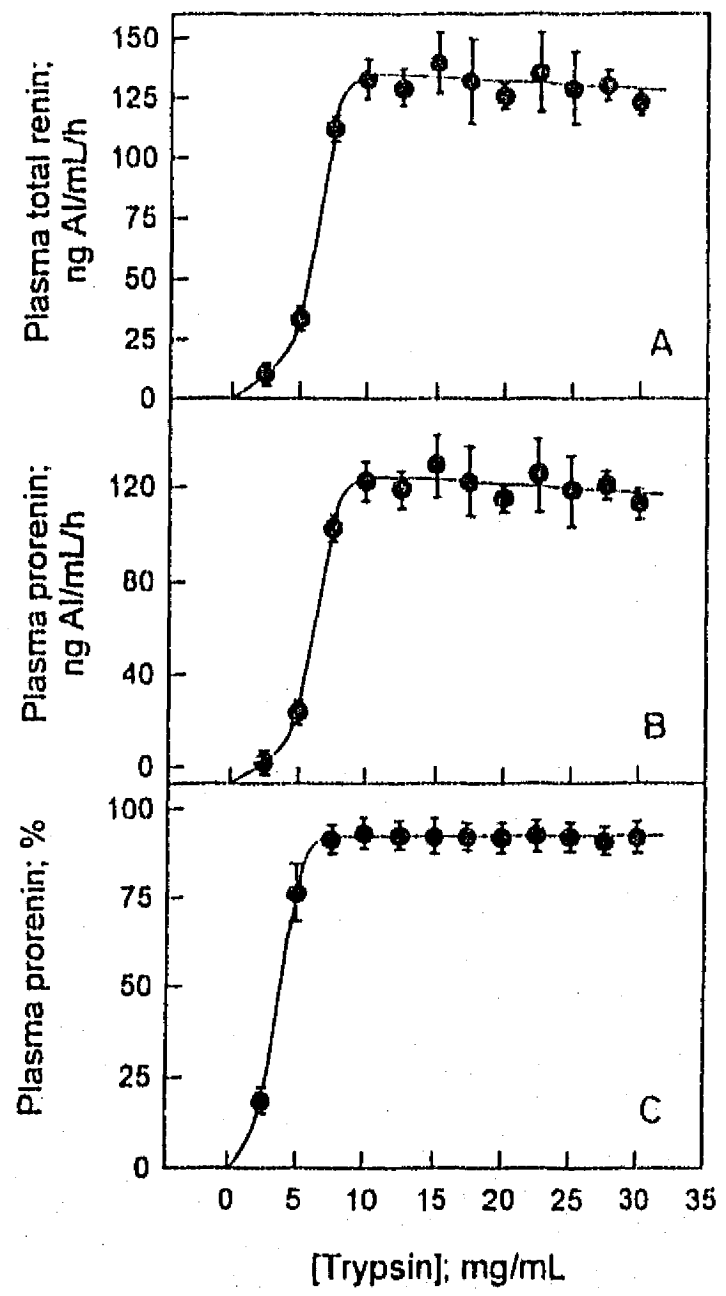


Figure 2.

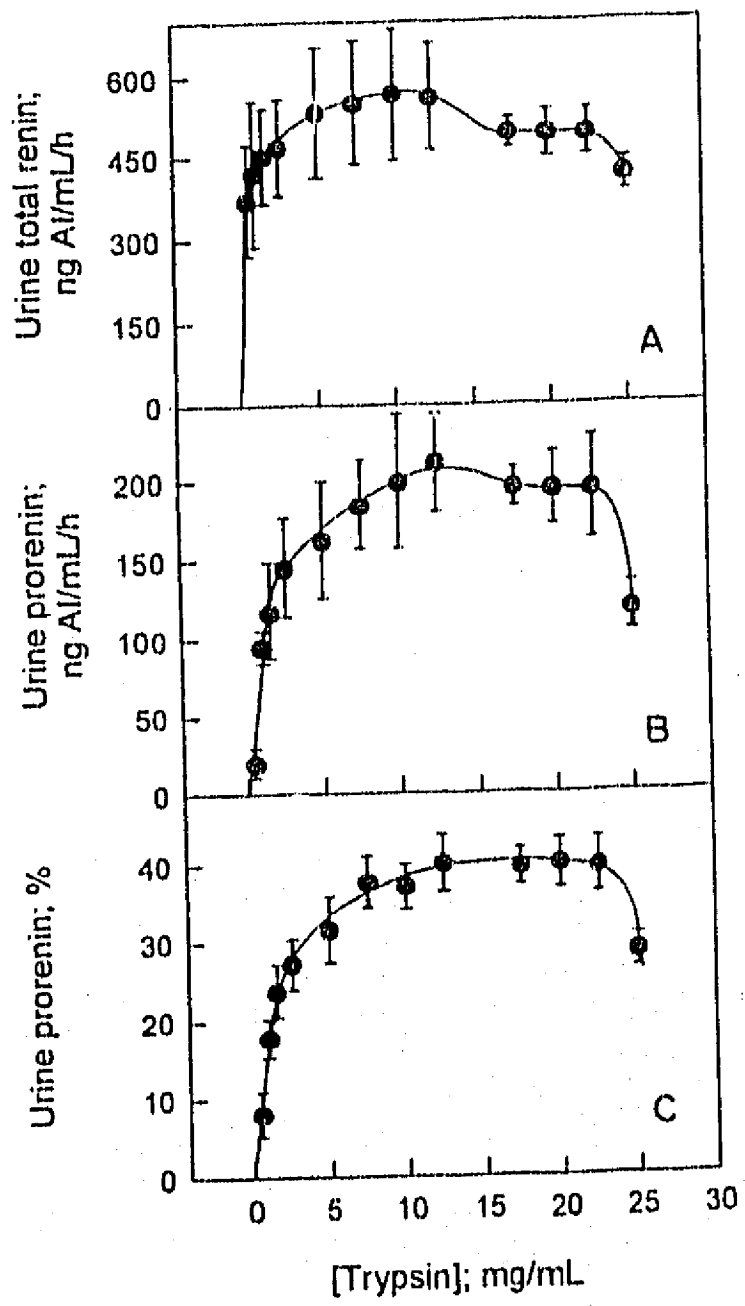


Figure 3.

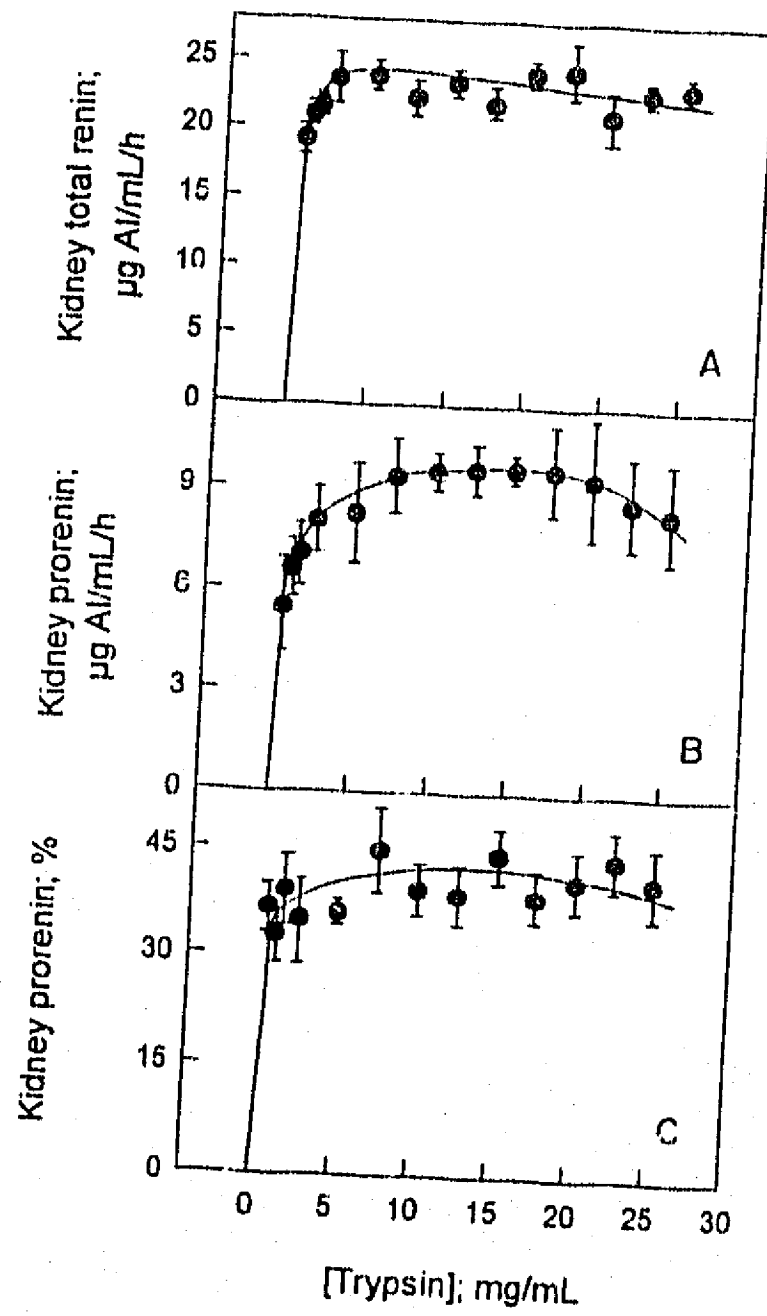


Figure 4.

CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY

Editorial Office, 54 University St (PO Box 378), Carlton South, Victoria 3053, Australia. Telephone (+613) 9347 0300, Fax (+613) 9349 3016

EDITOR-IN-CHIEF
Prof. Warwick P. Anderson

20th September 1996

RECEIVING EDITORS
Professor Y. Yamori
Graduate School of Human and
Environmental Studies
Kyoto University
Yoshida Nihonmatsucho
Sakyo-ku, Kyoto 606
JAPAN
Tel (+81) 75 753 6000
Fax (+81) 75 753 2997

Dr Maria E Ibarra-Rubio
Depto. Nefrologia y Metabolismo Mineral
Instituto Nacional de la Nutrición
'Salvador Zubiran'
Vasco de Quiroga #15, Tlalpan
14000 Mexico D F MEXICO

Professor J. Sarrard
Département de Physiologie et
Pharmacologie Clinique
Faculté de Pharmacie
8 Avenue Rockefeller
69373 - Lyon Cedex 08
FRANCE
Tel (+33) 78 77 70 06
Fax (+33) 78 77 71 18

Dear Dr Ibarra-Rubio,

Manuscript Number: 96 171

Title: Renin, prorenin and its gene expression in rats with acute nephrotic syndrome

Professor G. F. DiBona
Department of Internal Medicine
University of Iowa
College of Medicine
230 Hawkins Drive
Iowa City, IA 52242-1001 USA
Tel (+1) 319 339 7195
Fax (+1) 319 339 7023

Thank you for submitting your manuscript to *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.

As corresponding or senior author, please ensure the enclosed Transfer of Copyright form is signed by all authors. Please return the completed form immediately and your manuscript will be sent out for review. In accordance with journal policy, I will write to you once the referee's comments are received.

REVIEW EDITOR
John Ludbrook

Please note that, to conform with the uniform requirements of Biomedical Journals, we are currently changing the referencing prerequisites. All manuscripts submitted from 1 June 1995 should follow the Vancouver system (superscript references in the text and a numbered reference list). Please refer to the current 'Notes to Contributors' for further details.

EDITORS' ADVISORY COUNCIL

James A. Angus
John P. Chalmers
Murray D. Esler
John W. Funder
Stephen B. Harrap
D. Ian McCloskey
Michael J. Rand
Judith A. Whitworth

To ensure that the contact numbers we have on record are accurate and up to date please supply the following information:

Phone Number: (525) 622-3515

Facsimile Number: (525) 655-0382

e-mail address: _____

SCIENTIFIC SOFTWARE
REVIEW EDITOR
Peter H. Barry

Yours sincerely,

Warwick P. Anderson

Professor Warwick Anderson
Editor-in-Chief

b

Blackwell
Science

IV. RESUMEN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se estudió la regulación de la expresión de dos de las proteínas del sistema renina-angiotensina en ratas con síndrome nefrótico agudo inducido por aminonucleósido de la puromicina: renina y angiotensinógeno. Asimismo, como control se incluyó un grupo de ratas alimentadas a la par debido a que los animales con síndrome nefrótico disminuyen su ingesta de alimento de manera importante, y la expresión de las proteínas del sistema renina-angiotensina se altera por cambios en la alimentación.

Seis días después de la inyección del aminonucleósido de puromicina el síndrome nefrótico estaba claramente establecido como se pudo demostrar por la presencia de hipoproteinemia, proteinuria, retención de sodio e hipercolesterolemia. Las ratas alimentadas a la par también presentaron una disminución significativa en la excreción urinaria de sodio pero no tan marcada como las ratas nefróticas.

Las alteraciones encontradas en cada una de las proteínas estudiadas fueron las siguientes:

Angiotensinógeno

a) La concentración plasmática de angiotensinógeno disminuyó en las ratas nefróticas 6 días después de la inyección del aminonucleósido de puromicina a casi la mitad de los valores encontrados en las ratas control. En las ratas alimentadas a la par no hubo cambios.

b) Se perdieron grandes cantidades de esta proteína por orina.

c) Los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno no se modificaron ni en las ratas nefróticas ni en las alimentadas a la par.

d) No se observaron cambios en los niveles del ARNm de angiotensinógeno en los tejidos extrahepáticos estudiados: riñón, corazón, cerebro y glándula adrenal en el día 6 después de la inyección del aminonucleósido de puromicina.

e) Los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno no mostraron cambios en los días 1, 3, 5 y 7 después de la inyección del aminonucleósido de puromicina. Las ratas alimentadas a la par tampoco mostraron cambios en ninguno de estos días.

Renina

a) En plasma, la renina total no cambió y la renina activa aumentó en las ratas nefróticas con respecto a las alimentadas a la par y control, así como en el grupo alimentado a la par con respecto al control.

b) El porcentaje de la renina inactiva disminuyó en el plasma de las ratas nefróticas con respecto a las alimentadas a la par y control, así como en el grupo alimentado a la par con respecto al control.

c) El contenido renal de renina total, activa e inactiva no presentó cambios en ninguno de los grupos experimentales.

d) Tanto la renina activa como la inactiva se excretaron en grandes cantidades por orina en ratas nefróticas sin presentar cambios en el porcentaje de prorenina con respecto a los grupos control y alimentado a la par.

e) Los niveles renales del ARNm de renina no se alteraron en ninguno de los grupos experimentales en el día 6 después de la inyección del aminonucleósido de puromicina.

f) No se encontraron cambios en los niveles del ARNm de renina ni en cerebro ni en hígado en el día 6.

g) Los niveles renales del ARNm de renina no presentaron cambios en los días 1, 3, 5 y 7 después de la inyección del aminonucleósido de puromicina.

En resumen, la disminución en la ingesta de alimento indujo cambios en la renina circulante, pero no afectó el angiotensinógeno. Tanto la renina como el angiotensinógeno circulantes y su excreción urinaria se encontraron profundamente alterados en el síndrome nefrótico agudo, sin embargo los niveles de sus ARNm no cambiaron.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V. DISCUSIÓN GENERAL

El síndrome nefrótico se caracteriza fundamentalmente por la pérdida urinaria y alteraciones en el metabolismo de muchas proteínas plasmáticas (1,2), entre las cuales se encuentran las proteínas del sistema renina-angiotensina (9). La renina, el angiotensinógeno y la enzima convertidora de angiotensina I se pierden por orina, mientras que en plasma las actividades de renina y enzima convertidora de angiotensina I aumentan y la concentración de angiotensinógeno disminuye (9,60-62). Estas observaciones conducen a investigar los mecanismos que se desencadenan para poder "compensar" las pérdidas por orina de estas proteínas. En este trabajo se exploró la posible participación de cambios en la expresión de los genes de renina y angiotensinógeno para tratar de mantener la homeostasis de estas proteínas circulantes. Es importante señalar que la concentración de una proteína en circulación depende de, al menos, cuatro factores: a) síntesis y secreción, b) degradación o catabolismo, c) pérdidas corporales, y d) distribución corporal. La síntesis puede regularse a varios niveles: a) transcripcional (síntesis del ARNm), b) postranscripcional (procesamiento y estabilidad del ARNm), c) traduccional y d) postraduccional (modificaciones intracelulares que suceden hasta que la proteína es secretada). Por lo tanto, en este trabajo se exploró solo una parte de los factores involucrados en la síntesis de una proteína. Debido a que los niveles del ARNm de renina y angiotensinógeno no cambiaron en las ratas nefróticas a pesar de que estas proteínas se pierden de manera abundante en orina y que hay cambios importantes en circulación, se propone que el nivel de regulación de ambas proteínas es a nivel traduccional o postraduccional. El nivel de regulación traduccional se ha encontrado para la glicoproteína ácida alfa-1 en ratas con síndrome nefrótico: la síntesis de esta proteína aumenta a pesar de que los niveles de su ARNm no cambian (63). Asimismo, se ha encontrado que efectivamente otras proteínas plasmáticas en el síndrome nefrótico se regulan a nivel transcripcional como la albúmina (41,42). En el presente trabajo se esperaba que el ARNm de ambas proteínas aumentara claramente para favorecer su síntesis y así compensar las pérdidas urinarias. Sobre todo el ARNm de renina, ya que, a pesar de su pérdida por orina, sus niveles circulantes aumentan, sin embargo, también se esperaba un aumento en el ARNm de angiotensinógeno a pesar de que su concentración en circulación disminuye, ya que, además de su gran pérdida por orina, su degradación también aumenta por el importante incremento que se observa en renina. De hecho, otras proteínas que se pierden por orina en el síndrome nefrótico se

acompañan por un aumento en los niveles de su ARNm; por ejemplo: albúmina, transferrina y apolipoproteína AI (42,64).

En el presente trabajo no se exploraron los posibles cambios en el catabolismo (vida media), la velocidad de secreción y/o la distribución corporal, por lo que no se puede descartar la participación de alteraciones en estos niveles de regulación en las alteraciones de estas proteínas circulantes. Las posibilidades que se desprenden en el caso de la renina son las siguientes: (1) que la prorenina circulante se esté convirtiendo en renina activa, (2) que mayor proporción de la prorenina recién sintetizada se esté canalizando a la vía regulada en la cual se secreta en forma activa, (3) que la degradación de la renina activa esté disminuida y/o (4) que aumente la síntesis y la liberación de la proteína. En el caso del angiotensinógeno se propone que su degradación por los altos niveles de renina circulante y su pérdida por orina se tratan de compensar por un aumento en la velocidad de traducción del ARNm en hígado, aunque no se puede descartar una disminución en la degradación de esta proteína circulante o una mayor secreción de otros tejidos que la sintetizan como es el caso del tejido adiposo café (65,66). En la diabetes espontánea en ratas se encontró un aumento en los niveles circulantes de angiotensinógeno sin cambios en los niveles hepáticos de su ARNm; esto condujo a los autores a proponer cambios a nivel traduccional para explicar lo anterior (67), aunque en general se ha aceptado que el nivel de regulación de esta proteína es transcripcional (68).

Los mecanismos de regulación de las dos proteínas estudiadas en el presente trabajo en el síndrome nefrótico aún no se conocen completamente. Solo se ha podido descartar el que estén involucrados cambios en los niveles de sus ARNm. Se tienen que realizar experimentos dirigidos para poder contestar las interrogantes planteadas a lo largo del presente trabajo. Por ejemplo, la determinación de la vida media de la renina y del angiotensinógeno radiactivos inyectados parenteralmente, nos podría decir si hay cambios en el catabolismo de estas proteínas; o bien, medir la síntesis de las proteínas en sistemas *in vitro* para lo cual se requiere un anticuerpo específico para inmunoprecipitar la proteína recién sintetizada.

VI. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión renal del gen de renina y la expresión hepática del gen de angiotensinógeno no se altera durante el desarrollo del síndrome nefrótico agudo inducido con aminonucleósido de puromicina.
2. No se encontró relación entre los niveles del ARNm de renina y el contenido renal, concentración plasmática y excreción urinaria de esta proteína tanto en su forma activa como en su forma inactiva. Asimismo, tampoco se encontró relación entre los niveles hepáticos del ARNm de angiotensinógeno y la concentración plasmática y excreción urinaria de su proteína. Esto sugiere que la regulación de los niveles plasmáticos de ambas proteínas se da a nivel traduccional o postraduccional en este modelo experimental.
3. La expresión de los genes de renina y angiotensinógeno parece no presentar alteraciones en los tejidos extrarrenales y extrahepáticos, respectivamente, estudiados en el presente trabajo.

VII. REFERENCIAS

1. Bernard DB. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome: pathophysiology and complications. En: Brenner BM, Stein JH, eds. *Contemporary issues in nephrology*, Vol 9, Nephrotic syndrome. New York:Churchill Livingstone, 1982:85-120.
2. Skorecki KL, Nadler SP, Badr KF, Brenner BM. Renal and systemic manifestations of glomerular disease. En: Brenner BM, Rector FC, eds. *The kidney*. Philadelphia: Saunders, 1986:891-928.
3. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988;33:1184-1202.
4. Schnaper HW, Robson AM. Nephrotic syndrome: minimal change disease, focal glomerulosclerosis, and related disorders. En: Schrier RW, Gottschalk CW, eds. *Diseases of the kidney*. 4a edición, Vol. II. Boston/Toronto:Little Brown, 1988:1949-2004.
5. Heymann W, Lund HZ. Nephrotic syndrome in rats. *Pediatrics* 1951;7:691-698.
6. Frenk S, Antonowics I, Craig JH, Metcalf J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.
7. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982;46:16-21.
8. Vernier RL, Papermaster BW, Bood RA. Aminonucleoside nephrosis: I Electron microscopic studies of the renal lesions in rats. *J Exp Med* 1959;109:115-126.
9. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:29-38.
10. Lewandowski AE, Liao WSL, Stinson-Fisher CA, Kenk JD, Jefferson LS. Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Am J Physiol* 1988;254:C634-C642.
11. Gherardi E, Vecchia L, Calandra S. Experimental nephrotic syndrome in the rat induced by puromycin aminonucleoside. Plasma and urinary lipoproteins. *Exp Mol Pathol* 1980;32:128-142.
12. Katz J, Bonorris G, Sellers AL. Albumin metabolism in aminonucleoside nephrotic rats. *J Lab Clin Med* 1963;62:910-934.
13. Yamauchi A, Imai E, Noguchi T, Tanaka T, Yamamoto S, Mikami H, Fukuhara Y, Fujii M, Orita Y, Kamada T. Albumin gene transcription is enhanced in liver of nephrotic rats. *Am J Physiol* 1989;254:E676-E679.

14. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. III. Effect of captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, on sodium retention and proteinuria. *Rev Invest Clin* 1990;42:210-216.
15. Nathans D, Neidle A. Structural requirements for puromycin inhibition of protein synthesis. *Nature* 1963;197:1076-1077.
16. Rabinovitz M, Fisher JM. A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein synthesis by Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 1962;237:477-481.
17. Derr RF, Alexander CS, Nagasawa HT. Metabolism of puromycin aminonucleoside in the normal, "pre-nephrotic", and nephrotic rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;125:248-252.
18. Alexander CS, Nagasawa HT, Fiblin D. Distribution and excretion of aminonucleoside-8-C¹⁴ in normal and nephrotic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:521-526.
19. Kanwar YS. Biology of disease. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest* 1984;51:7-21.
20. Schneeberger EE. Glomerular permeability to protein molecules. Its possible structural basis. *Nephron* 1974;13:7-14.
21. Rennke HG, Venkatchalam MA. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. *J Clin Invest* 1979;63:713-717.
22. Mohos SC, Skoza L. Histochemical demonstration and localization of sialoproteins in the glomerulus. *Exp Mol Pathol* 1970;12:316-323.
23. Kanwar YS, Farquhar MG. Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the lamina rara by cationic probes. *J Cell Biol* 1979;81:137-153.
24. Skoza L, Mohos SC. Glomerular sialoproteins. *Science* 1969;164:1519-1521.
25. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM. Mechanism of puromycin induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1977;60:152-161.
26. Hunsicker LG, Shearer TP, Shaffer SJ. Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexadimethrine. *Kidney Int* 1981;20:7-17.
27. Charest PM, Roth J. Localization of sialic acid in kidney glomeruli; regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8508-8512.

28. Kerjaschki D, Vernillo AT, Farquar MG. Reduced sialylation of podocalyxin - the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus - in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1985;118:343-349.
29. Lelongt B, Makino H, Kanwar YS. Status of glomerular proteoglycans in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1987;31:1299-1310.
30. Vernier RL, Klein VJ, Sisson SP, Mahan DJ, Oegama TR, Brown DM. Heparan sulfate-rich anionic sites in the human glomerular basement membrane. Decreased concentration in congenital nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1983;309:1001-1009.
31. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis. *N Engl J Med* 1972;286:748-757.
32. Gitlin D, Janeway CA, Farr LE. Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. I. Albumin, gamma-globulin and iron-binding globulin. *J Clin Invest* 1956;35:44-56.
33. Kaysen GA, Gambertoglio J, Jimenez I, Jones H, Hutchison FN. Effects of dietary protein intake on albumin homeostasis in nephrotic patients. *Kidney Int* 1986;29:572-577.
34. Glasscock RJ, Cohen AH, Bennet CM, Martinez-Maldonado M. Primary glomerular disease. En: Brenner BM, Rector FC Jr, eds. *The Kidney*, 2a. edición. Philadelphia:WB Saunders, 1981:1351-1492.
35. Hutchison F, Gambertoglio J, Jimenez I, Jones H, Kaysen G. Effect of reduced dietary protein intake on albumin homeostasis and albuminuria in man. *Kidney Int* 1985;27:141A.
36. Kaysen GA, Kirkpatrick W, Couser WG. Nutritional status affects albumin homeostasis in rats with Heymann nephritis. *Clin Res* 1984;32:415A.
37. Katz J, Sellers AL, Bonorris G. Effect of nephrectomy on plasma albumin catabolism in experimental nephrosis. *J Lab Clin Med* 1964;63:680-686.
38. Katz J, Bonorris G, Okuyama S, Sellers AL. Albumin synthesis in perfused liver of normal and nephrotic rats. *Am J Physiol* 1967;212:1255-1260.
39. Marsh JB, Drabkin DL, Braun GA, Parks JS. Factors in the stimulation of protein synthesis by subcellular preparations from rat liver. *J Biol Chem* 1966;241:4168-4174.
40. Zähringer J, Baliga BS, Munro HN. Increased levels of microsomal albumin-mRNA in the liver of nephrotic rats. *FEBS Lett* 1976;62:322-325.
41. Pedraza-Chaverri J, Huberman A. Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats. *Nephron* 1991;59:648-650.
42. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J, Panduro A. Differential regulation in the expression of hepatic genes in nephrotic and pair-fed rats. *Nephron* 1993;65:119-124.

43. Rothschild MA, Oratz M, Wimer E, Schreiber SS. Studies on albumin synthesis: the effects of dextran and cortisone on albumin metabolism in rabbits studied with albumin-¹³¹I. *J Clin Invest* 1961;40:545-554.
44. Huberman A. The in vitro effect of colloid osmotic pressure on albumin synthesis in normal rat liver. *Rev Invest Clin* 1973;25:321-326.
45. Exaire E, Pollak VE, Pesce AJ, Ooi BS. Albumin and gamma-globulin in the nephron of the normal rat and following the injection of aminonucleoside. *Nephron* 1972;9:42-54.
46. Olbricht CJ, Cannon JK, Tisher CC. Cathepsin B and L in nephron segments of rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1987;32:354-359.
47. Reineck HJ. Mechanisms of edema formation in the nephrotic syndrome. En: Brenner BM, Stein JH, eds. *Contemporary issues in nephrology*, vol. 9. Nephrotic syndrome. N York:Churchill Livingstone, 1984:31-46.
48. Brown EA. The nephrotic syndrome. *Postgrad Med J* 1985;61:1057-1062.
49. Brown EA, Markandu ND, Sagnella GA, Squires M, Jones BE, MacGregor GA. Evidence that some mechanism other than renin system causes sodium retention in nephrotic syndrome. *Lancet* 1982;2:1237-1240.
50. Kalant N, DasGupta D, Despointes R, Giroud CJP. Mechanisms of edema in experimental nephrosis. *Am J Physiol* 1962;202:91-96.
51. DiBona, Herman PJ, Sawin LL. Neural control of renal function in edema-forming states. *Am J Physiol* 1988;254:R1017- R1024.
52. Koepke JP, DiBona GF. Blunted natriuresis to atrial natriuretic peptide in chronic sodium-retaining disorders. *Am J Physiol* 1987;252:F865-F871.
53. Dorhout Mees EJ, Roos JC, Boer P, Oei HI, Simatupang TA. Observations on edema formation in the nephrotic syndrome in adults with minimal lesions. *Am J Med* 1979;67:378-384.
54. Shapiro MD, Nichols KM, Groves BM, Schrier RW. Role of glomerular filtration rate in the impaired sodium and water excretion of patients with the nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 1986;8:81-87.
55. Brown EA, Markandu ND, Sagnella GA, Jones BE, MacGregor GA. Lack of effect of captopril on the sodium retention of the nephrotic syndrome. *Nephron* 1984;37:43-48.
56. Düsing R, Vetter H, Kramer HJ. The renin-angiotensin- aldosterone system in patients with nephrotic syndrome: effects of 1-sar-8-ala-Angiotensin II. *Nephron* 1980;25:187-192.

57. Brown EA, Markandu N, Sagnella GA, Jones BE, MacGregor GA. Sodium retention in nephrotic syndrome is due to an intrarenal defect: evidence from steroid-induced remission. *Nephron* 1985;39:290-295.
58. Ichikawa I, Rennke HG, Hoyer JR, Badr KF, Schor N, Troy JL, Lechene CP, Brenner BM. Role of intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1983;71:91-103.
59. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Chávez MT, López A, Ibarra-Rubio ME, Tapia E, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. II. *In vitro* release of renin, angiotensinogen and aldosterone. *Rev Invest Clin* 1990;42:120-126.
60. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Hernández C, Tapia E, Peña JC. Urinary excretion of renin and angiotensinogen in nephrotic rats. *Nephron* 1991;57:106-108.
61. Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Serum angiotensin-converting enzyme activity and plasma renin activity in experimental models of rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990;17:391-399.
62. Arévalo AE, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Peña JC, Pedraza-Chaverri J. Angiotensin I-converting enzyme activity in puromycin aminonucleoside-nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 1990;191:175-184.
63. Sun X, Martin V, Weiss RH, Kaysen GA. Selective transcriptional augmentation of hepatic gene expression in the rat with Heymann nephritis. *Am J Physiol* 1993;264:F441-F447.
64. Panduro A, Castrillón L, Pedraza-Chaverri J, Vargas F, Ibarra-Rubio ME. Regulation of apolipoprotein A-I and E gene expression in liver and intestine of nephrotic and pair-fed rats. *Nephron* 1993;65:100-107.
65. Gómez RA, Cassis L, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Carey RM, Peach MJ. Fetal expression of the angiotensinogen gene. *Endocrinology* 1988;123:2298-2302.
66. Cassis LA, Saye JA, Peach MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 1988;11:591-596.
67. Everett AD, Scott J, Wilfong N, Marino B, Rosenkranz RP, Inagami T, Gez RA. Renin and angiotensinogen expression during the evolution of diabetes. *Hypertension* 1992;19:70-78.
68. Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Estructura y regulación de la expresión del gen de angiotensinógeno. *Rev Invest Clin* 1993;45:387-398.