

00562

3

29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS
EN LA VIA TRANSDUCCIONAL DE LOS
RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA EN
HEPATOCITOS C9**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)**

P R E S E N T A :
BIOL. AGUSTIN GARCIA CABALLERO



MEXICO, D. F. 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

266051



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y con el apoyo de la DGAPA (IN 200193 y IN 22596) y del CONACyT (4711-N9406).

El Jurado de examen para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica) es el siguiente:

| | |
|------------|------------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. José Pedraza Chaverri |
| VOCAL | Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz |
| SECRETARIO | Dra. María Elena Ibarra Rubio |
| SUPLENTE | Dr. Roberto Coria Ortega |
| SUPLENTE | Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez |

Director de tesis: Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Sustentante: Biól. Agustín García Caballero

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz mi más sincero agradecimiento por haber dirigido eficazmente el presente trabajo.

Al Dr. Fernando López Casillas y al Dr. Jorge Vázquez Ramos por sus comentarios y observaciones hechas durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, al Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz, a la Dra. María Elena Ibarra Rubio, al Dr. Luis Vaca Domínguez y al Dr. Roberto Coria Ortega, por sus comentarios y observaciones realizadas en la revisión de la tesis.

A mis compañeros del laboratorio: Rocío, Eréndira, Paty, José, Luz del Carmen, Artemio, María Elena, Tere y Claudia, por su apoyo diario y su paciencia.

A mis excompañeros del laboratorio: Gloria, Alberto, Marina, MariTere y Mario por su apoyo y haber compartido su formación académica.

A Bertha y a María Elena por su valiosa ayuda y su sincera e incondicional amistad.

A mis amigos de siempre: Leonardo, Germán, Alberto, Cristina, Claudia, Juan, Salvador, Armando, Jorge, Gaby, Samuel, Luis y Fernando.

A los Doctores inscritos al programa de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica) en la Facultad de Química, por haber compartido su conocimiento sin recelo.

A la D.G.A.P.A. y a la U.N.A.M.

A mis padres, Agustín y Lucía, por su amor y confianza durante tanto tiempo. A mis hermanas, Deya y Paty, por su cariño y su tolerancia. A Ricardo y Alexei por compartir su tiempo conmigo. Y a toda mi familia materna y paterna.

RESUMEN

En estudios previamente realizados en hepatocitos aislados de rata se ha demostrado que la angiotensina II y el éster de forbol PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) inducen la expresión de *c-fos* (88). Sin embargo, no se ha determinado si proteínas G sensibles a la toxina pertussis participan en el incremento de la expresión del proto-oncogen inducido por el octapéptido (angiotensina II). Esta interrogante nos llevó a estudiar las acciones de la angiotensina II en una línea celular adecuada.

En las células epiteliales de hígado de rata (C9) la angiotensina II incrementa la concentración intracelular del ion calcio, la producción de los fosfatos de inositol y la expresión del ARNm del proto-oncogen *c-fos*. Otras angiotensinas también incrementan la concentración del calcio intracelular con el siguiente orden de potencia: AII = AIII >> AI > AIV. Los efectos de la angiotensina, producción de segundos mensajeros y expresión génica, fueron bloqueados con concentraciones bajas (100 nM) del antagonista losartan (Dup753) pero no del antagonista PD123177. Por otro lado, la toxina pertussis no modifica las acciones de la angiotensina II. Estos resultados nos muestran que los efectos o parámetros medidos son regulados a través de la activación de receptores para angiotensina II tipo AT1 y que involucra la activación de proteínas G insensibles a la toxina pertussis.

Por otra parte, el forbol miristato acetato (PMA) también incrementa la expresión del ARNm de *c-fos* en esta línea celular. Sin embargo, el efecto de la angiotensina II fue más grande (6 ± 0.87) que la acción del éster de forbol (3.1 ± 0.5).

La expresión del ARNm de *c-fos* inducida por la angiotensina II se inhibe con los tratamientos en los cuales se utiliza el inhibidor de proteínas cinasas de serina / treonina (estaurosporina), en contraste con los experimentos en los que las células se incuban con el inhibidor de proteínas cinasas de tirosina (genisteína), en los cuales no se observa ningún efecto inhibitorio de este agente. Además, el incremento en la expresión del ARNm del proto-oncogen *c-fos* inducido, tanto por la angiotensina II como por el éster de forbol, disminuye cuando las células se incuban toda la noche con el PMA. Estos resultados sugieren que la proteína cinasa C es el principal mediador de las acciones de la angiotensina II, aunque probablemente participen otras cinasas.

Finalmente, con base en los resultados aquí mostrados de las células C9, se puede considerar a esta línea celular de origen hepático, como un modelo adecuado para estudiar los efectos de la angiotensina II.

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| Receptores para angiotensina AT ₁ | 4 |
| Estructura génica | |
| Distribución en tejidos | |
| Mecanismos transduccionales | |
| Estructura-Función | |
| Receptores para angiotensina AT ₂ | 12 |
| Estructura génica | |
| Distribución en tejidos | |
| Mecanismos transduccionales | |
| Receptores atípicos..... | 14 |
| C-FOS..... | 16 |
| Conocimiento actual de los efectos transduccionales de C-FOS / JUN..... | 18 |
| Familia de FOS..... | 19 |
| Homología entre especies | |
| Características químicas y moleculares de FOS / Fos | |
| Expresión de Fos | |
| Regulación transcripcional de fos humano | |
| ANTECEDENTES..... | 24 |
| OBJETIVOS..... | 25 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 26 |
| Mediciones de calcio intracelular | |
| Extracción de ARN | |
| Mediciones del ARNm de <i>c-fos</i> y GAPDH por el método de RT-PCR | |
| ADP-Ribosilación | |
| Producción de fosfatos de inositol | |
| RESULTADOS..... | 29 |
| DISCUSION..... | 38 |
| CONCLUSION Y PERSPECTIVAS..... | 41 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 43 |

INTRODUCCION

La angiotensina II es una hormona multifuncional que regula la presión sanguínea, algunas funciones neuronales y, además, es particularmente importante en la adaptación patológica, como sucede en la recuperación del miocardio después de un infarto y en repuestas vasculares a la hipertensión (1).

Algunas de las principales acciones de la angiotensina II son la contracción del músculo liso vascular, la estimulación de la liberación de aldosterona de las células glomerulosas de la zona adrenal y la reabsorción de sodio vía túbulo proximal e indirectamente vía la nefrona distal por aldosterona (2). Además de estos efectos directos sobre la presión sanguínea y el balance de electrolitos, esta hormona participa de manera importante en el metabolismo renal, hepático, endócrino, reproductivo y a nivel de sistema nervioso central (3). En el cerebro la angiotensina II participa en la liberación de vasopresina y la hormona adrenocorticotrópica de la glándula pituitaria.

La angiotensina II es un octapéptido, de secuencia; Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸, funcionalmente activo en humanos y en muchos mamíferos (4), si bien es la hormona responsable de muchas de las funciones del metabolismo renal, vascular, etc, no es la única. Se han caracterizado tres tipos de angiotensinas, denominadas I, II y III (Fig. 1). Las tres hormonas son de naturaleza peptídica y se sintetizan de manera secuencial a partir de una α -globulina muy abundante en el plasma, el angiotensinógeno, el cual es sustrato de la renina, una aspartil proteasa que es liberada a la circulación por el riñón y otros órganos. La acción de la renina sobre el angiotensinógeno genera una molécula deca péptida poco activa denominada angiotensina I, la cual es adicionalmente procesada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que está presente en las células endoteliales, para formar el octapéptido biológicamente activo angiotensina II (Fig. 1). Esta hormona octapeptídica es muy sensible a la proteólisis por una aminopeptidasa específica para aspártico, cuya acción da por resultado la formación de la angiotensina III. Ambas angiotensinas II y III causan efectos similares, siendo igual de potentes para estimular la secreción de aldosterona. Sin embargo, en otras acciones la angiotensina III

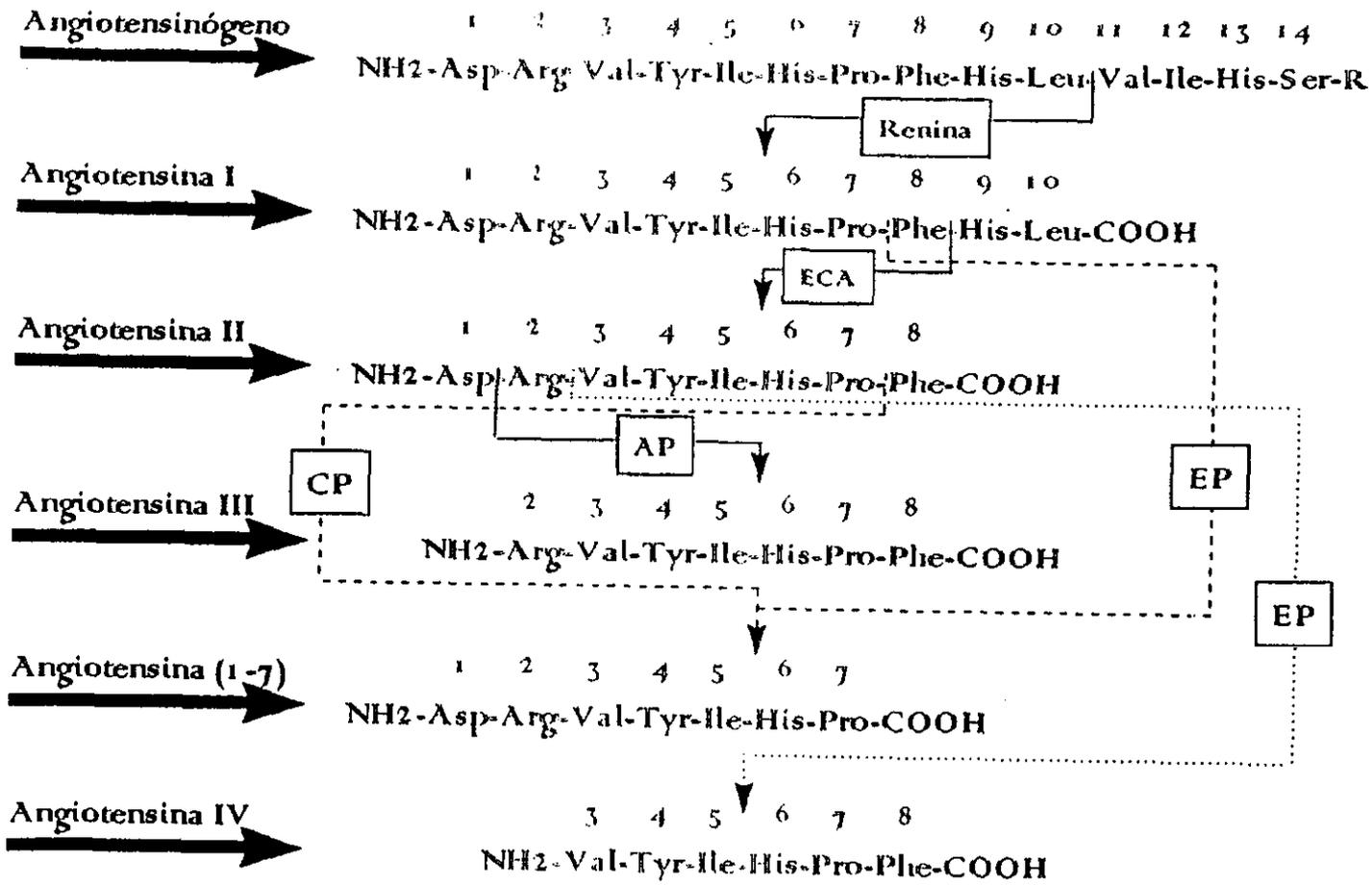


Fig.1 Síntesis de las diferentes angiotensinas. Las líneas contínuas representan la vía clásica de la síntesis de las angiotensinas I,II y III. Las líneas discontinúas indican vías alternativas para la síntesis de Ang(1-7) y Ang IV. AP-aminopeptidasa ; CP-carboxipeptidasa; EP-endopeptidasa; ECA-enzima convertidora de angiotensina (2).

es mucho menos potente que la angiotensina II, como es en la elevación de la presión sanguínea y en la estimulación de la médula suprarrenal para liberar catecolaminas (5). Anteriormente se pensaba que las angiotensinas eran inactivadas al ser degradadas por varias endopeptidasas. A la fecha se sabe que se pueden generar fragmentos con especificidad y funciones importantes en diferentes órganos. De esta manera la angiotensina I y II pueden ser metabolizadas a la angiotensina (residuos 1-7). Este fragmento ejerce efectos tan importantes como lo son la liberación de vasopresina y la estimulación de la síntesis de prostaglandinas (6). Recientemente se ha demostrado que otro fragmento producto de la degradación de la angiotensina II, conocido como angiotensina IV o como angiotensina II (residuos 3-8), tiene proteínas receptoras distribuidas principalmente en el riñón, en el cerebro y en el músculo liso vascular (7-9), en este último se ha propuesto que participa en la vasodilatación y en la regulación del flujo sanguíneo (7,8).

Ahora bien, la angiotensina II es más eficaz y potente para mediar una gran variedad de repuestas fisiológicas si se le compara con las acciones estudiadas de las otras angiotensinas I, III y IV. En lo sucesivo se considerará a la angiotensina II como la hormona directamente responsable de las funciones antes mencionadas y por lo tanto se puntualizarán algunos aspectos relacionados sólo con esta hormona.

Mediante los estudios realizados para determinar la relación entre la estructura de la angiotensina II y su actividad, se ha demostrado que el extremo carboxilo terminal de la molécula juega un papel muy importante en la actividad de la hormona; siendo particularmente importantes los tres grupos aromáticos de las cadenas laterales presentes en los residuos 4, 6 y 8 (Tyr, His y Phe). El aminoácido histidina, al parecer, es determinante para la unión al receptor (10). La importancia del grupo imidazol de este aminoácido está relacionada con su potencial para formar uniones no covalentes (11).

Los efectos de la angiotensina II en sus órganos blanco son mediados por receptores de membrana, de aquí que el receptor sea un punto de control clave para la regulación de las funciones tejido-específicas. Recientemente varios subtipos de estos receptores han sido clonados, lo cual ha ayudado a esclarecer los mecanismos moleculares que controlan la repuesta a angiotensina II en tejidos como el cardiovascular,

el renal y el neuronal (12). Afortunadamente el reciente desarrollo de antagonistas subtipo-específicos para los receptores a angiotensina ha provisto de potentes agentes terapéuticos capaces de modificar las acciones del sistema renina-angiotensina a nivel del órgano blanco.

Considerando la importancia del sistema renina-angiotensina en la regulación de la presión sanguínea y el balance de electrolitos, es de esperarse el descubrimiento de nuevas drogas como herramienta terapéutica. Así, por ejemplo, algunos inhibidores de la ECA han resultado ser eficaces en un gran número de enfermedades, además de ser bien tolerados por los pacientes. Sin embargo, una de las acciones de la ECA es idéntica a la de la proteína quinasa II, una proteasa que participa en la degradación de las quininas, como bradicinina, y en la degradación metabólica de la sustancia P. De esta manera, la inhibición de la ECA puede provocar un incremento tanto en la concentración de la sustancia P como en la de bradicinina, efectos que pueden estar involucrados en los padecimientos de tos seca y de angioedema que se presentan en las terapias que utilizan inhibidores de la ECA.

RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA AT₁

En 1989, Whitebread *et al.* y Chiu *et al.* (13,14) caracterizaron farmacológicamente dos subtipos de receptores para angiotensina, los cuales se denominan actualmente como AT₁ y AT₂ (15). Los receptores de tipo AT₁ son los responsables de mediar la mayoría de las funciones de la angiotensina II. La característica que los distingue farmacológicamente es su alta afinidad por los bifenilimidazoles, como el losartan (Dup753), y su insensibilidad a las tetrahydroimidazopiridinas, como el PD123177 (15). Una característica distintiva adicional de los receptores AT₁ radica en que su afinidad y capacidad de unión es reducida por agentes reductores sulfhidriilo, como el ditiotreitolo (14). Actualmente los subtipos de receptores mejor conocidos de la familia de los AT₁ en mamíferos son el AT_{1A} y el AT_{1B}. Aún se necesita confirmar la existencia de un tercer subtipo, AT_{1C}, que fue aislado de la placenta de rata y tiene un 90 % de

homología con el AT_{1A} y un 82 % de homología con el AT_{1B} (16). El receptor AT_{1A} se clonó originalmente de las células del músculo liso vascular de rata (17). Simultáneamente se clonó un receptor similar de la glándula adrenal de bovino (18). Las secuencias relacionadas de estos dos receptores tienen un marco de lectura abierto de 1077 pb, que codifica para 359 aminoácidos, con peso molecular de 41-kDa. Hoy en día se han clonado cDNA's que codifican para receptores AT₁ en el humano (19-21), en el conejo (22), en el cerdo (23) y en el perro (24). La homología de estas clonas con el receptor AT₁ de rata y de bovino a nivel de proteína es mayor al 90 % (13). Por otra parte se ha encontrado que las variantes AT_{1A} y AT_{1B} de rata y de ratón difieren solamente en 18 aminoácidos (25-29), principalmente en la región carboxilo terminal de las proteínas, presentando así una identidad en la secuencia del 94 %. Los estudios farmacológicos de los cDNA expresados indican que los ARNm del AT_{1A} y del AT_{1B} codifican para proteínas con afinidades idénticas por la unión a diferentes ligandos y con los mismos mecanismos transduccionales (26-29).

Los receptores para angiotensina II pertenecen estructuralmente a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Fig. 2). Cada uno de los dominios extracelulares, en total cuatro, poseen un residuo de cisteína, los cuales presumiblemente forman dos puentes disulfuro (uno entre el primero y último y otro entre el segundo y tercero) que estabilizan la estructura terciaria del receptor. Las regiones extracelulares también tienen tres sitios consenso para N-glucosilación, por lo que se le puede encontrar a este receptor en diferentes grados de glucosilación y por ello con distinto peso molecular. La tercer asa intracelular de los receptores AT₁ es más corta que la que se encuentra en la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G. El extremo carboxilo terminal que es citoplásmico es rico en residuos de serina y treonina, como sucede en los receptores adrenérgicos y muscarínicos. Estos residuos sirven como sitios de fosforilación para varias cinasas específicas como la proteína cinasa C (PKC) o bien la proteína cinasa A, dependiente del AMPc (PKA). La región carboxilo terminal también contiene secuencias consenso para la fosforilación por la cinasa de caseína II (30) y un sitio de palmitoilación (Cys³⁵⁵) que pudiera estar relacionado con el anclaje de esta parte del receptor a la membrana y/o en el acoplamiento con moléculas efectoras (24).

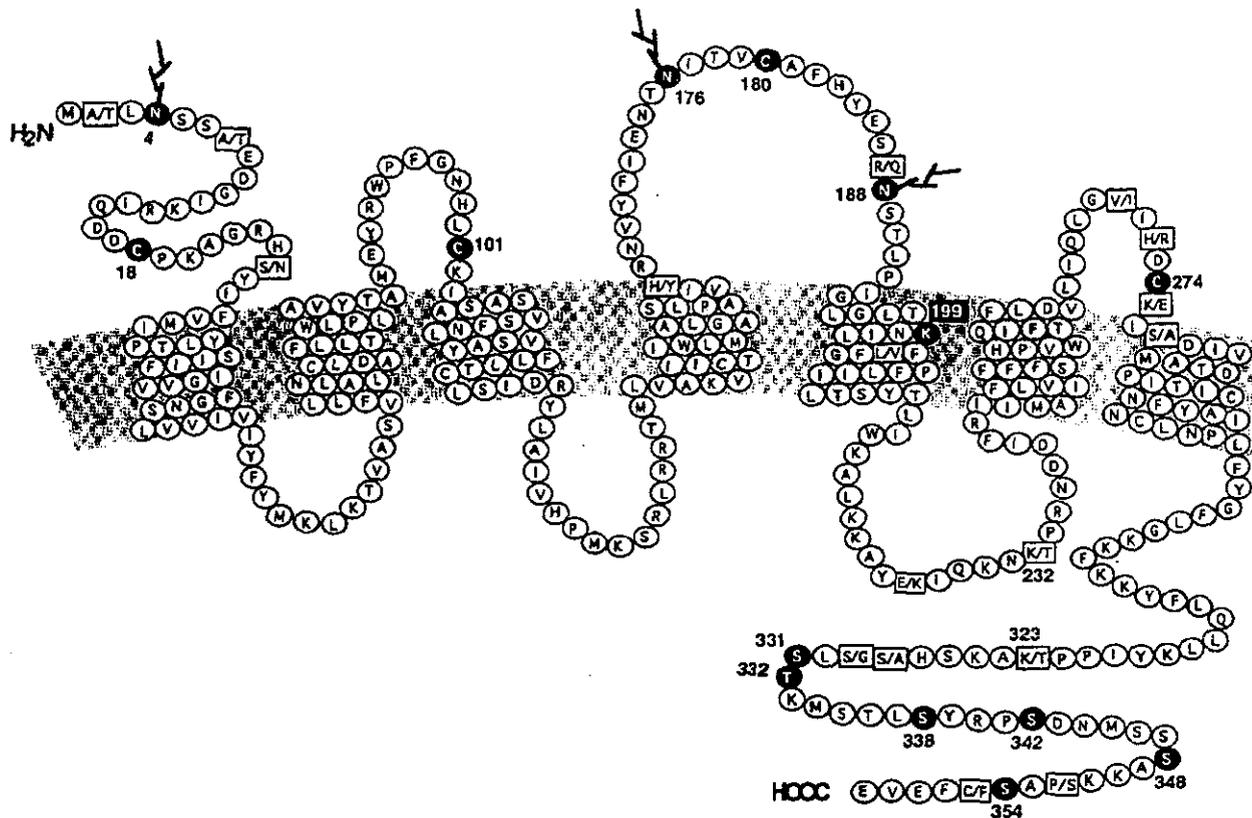


Fig.2 Diagrama esquemático de la secuencia de los receptores AT_{1A} y AT_{1B}. Se indican los cuatro residuos de cisteína involucrados en la formación de dos puentes disulfuro (C), los tres sitios potenciales de glucosilación (N) y los posibles sitios de fosforilación (S y T). Cada receptor consta de 359 residuos de aminoácidos. Los aminoácidos divergentes se indican encerrados en cuadros; los aminoácidos del lado izquierdo de cada cuadro indican los que se encuentran en la secuencia del subtipo AT_{1A} y los que se localizan del lado derecho corresponden al AT_{1B}. La formación de los puentes disulfuro, junto con la Lys¹⁹⁹ contribuyen a la unión del ligando. Presenta también un posible sitio de fosforilación por la proteína cinasa C en los residuos Ser³³¹, Thr³³², Ser³³⁸ en el receptor AT_{1A} y dos sitios adicionales en el AT_{1B} en las posiciones Thr²³² y Thr³²³; y un posible sitio de fosforilación por la enzima creatina cinasa II en la Ser³⁵⁴ (12).

ESTRUCTURA GENICA

Actualmente los genes AT_1 de humano y de rata están siendo ampliamente estudiados y lo que se conoce hasta el momento es que la región codificante de todos los subtipos conocidos está contenida en un solo exón, aunque el gen tenga varios exones (25,26,31,32). Por ejemplo, el gen para el receptor AT_1 de humano está compuesto de cinco exones divididos por cuatro intrones. Y los cuatro primeros exones constituyen la región 5' no traducida del gen, ya que el quinto exón contiene la secuencia codificante completa. Para este gen de humano se da el proceso de escisión y empalme (splicing) alternativo, pero debido a su estructura exónica resultan proteínas idénticas (31). El gen AT_{1A} de rata se ha localizado en el cromosoma 17 y el gen AT_{1B} en el cromosoma 2, mientras que ambos genes en humanos se localizan en el cromosoma 3. Por otra parte, los análisis de secuencia de la región 5' del receptor AT_1 de humano revelan que hay varios sitios potenciales de iniciación transcripcional; sin embargo, solo dos parecen ser funcionales (una caja TATA, en el primer exón y una región identificada para el elemento de respuesta específica adrenal, en el quinto exón) (31). La región promotora del gen humano contiene además cuatro posibles sitios de unión AP1, una secuencia consenso para el elemento de respuesta a estrés (shear-stress response element), dos sitios consenso Sp1, un posible sitio AP2, sitios para elementos regulatorios dependientes de AMPc y dos cajas CAAT (31,32). El gen AT_{1A} de rata tiene un posible sitio de unión Sp1 y tres secuencias consenso AP1 (33,34). Además, algunos análisis de la función indican que hay varios posibles elementos regulatorios, lo cual se ha visto en el músculo liso vascular para un elemento de respuesta a glucocorticoide en el promotor del receptor AT_{1A} (34).

DISTRIBUCION EN TEJIDOS

La distribución de los subtipos de receptores AT_{1A} y AT_{1B} se ha estudiado sólo a nivel del ARNm ya que estos receptores son indistinguibles farmacológicamente. Ambos subtipos se expresan en cantidades similares en el bazo, hígado y riñón (28,29). Sin embargo, el receptor AT_{1A} predomina en el músculo liso vascular, corazón, pulmón y cerebro (28,29,35,36); mientras que el subtipo AT_{1B} predomina en las glándulas pituitaria y adrenal (27-29,35,36). En el cerebro, el subtipo AT_{1B} es el que se expresa preferencialmente (35). Así, existe una expresión diferencial de ambos subtipos en los diversos tejidos, y, en la actualidad, la regulación de la expresión de los receptores es un área de amplio interés.

MECANISMOS TRANSDUCCIONALES

Los receptores AT_1 se acoplan a diferentes mecanismos transduccionales, por ejemplo, activan a la fosfolipasa A_2 , C y D, así como a canales de calcio dependientes de voltaje y también inhiben a la adenilato ciclasa (AC) (Fig. 3). La activación o inhibición de las moléculas efectoras por los receptores depende por completo del tipo celular del cual se trate. Además, los receptores AT_1 también activan directamente a cinasas de tirosina (37,38) aunque faltan aún más estudios para esclarecer las rutas transduccionales completas.

La activación de las fosfolipasas C y D da como resultado la producción de los ya clásicos segundos mensajeros; inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), solo que de manera distinta. Cuando los receptores AT_1 son estimulados, se activa la fosfolipasa C_β a través de la proteína Gq. La fosfolipasa hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP_2) para generar inositol 1,4,5, trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). También se puede dar un incremento de DAG indirectamente por medio de la PLD la cual hidroliza la fosfatidilcolina y produce ácido fosfatídico, el cual se transforma a DAG por una

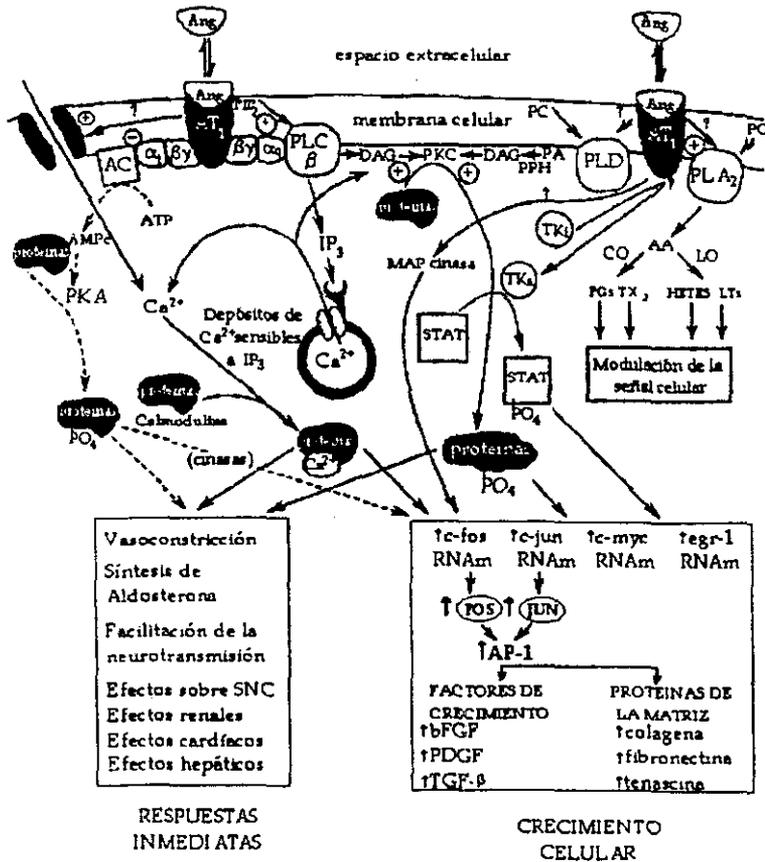


Fig.3 Vías de transducción acopladas al receptor AT_{1A}. La hormona angiotensina II (ang II) se une al receptor AT₁, el cual activa a las fosfolipasas C-β (PLC-β), D (PLD), y A₂ (PLA₂) e inhibe a la adenilato ciclasa (AC). El receptor está acoplado al efector por medio de proteínas G (representados por las subunidades α, β y γ). La PLC-β hidroliza al fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂), para producir inositol trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DGA). El IP₃ se une a un receptor específico que induce la liberación de calcio de compartimentos intracelulares; el calcio y el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC). La PLD hidroliza a la fosfatidilcolina (PC) hasta ácido fosfatídico (PA) y colina. El PA se puede convertir en DAG por acción de la fosfatido-fosfohidrolasa (PPH). La PLA₂ hidroliza a la PC liberando al ácido araquidónico (AA), un precursor de leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TX). La angiotensina II también puede abrir canales de calcio a través de los cuales entra calcio extracelular que participa en la activación de proteínas como la calmodulina. La angiotensina II participa en la activación de cascadas de fosforilación como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (cascada de fosforilación en serinas y treoninas) o la vía de las proteínas JAK/STAT (cascada de fosforilación en tirosinas). Estas vías llevan a la expresión de proto-oncogenes que regulan la transcripción de genes que participan en el crecimiento celular, incluyendo a factores de crecimiento y a proteínas de la matriz extracelular (2).

fosfohidrolasa. El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) y ésta fosforila proteínas clave que contribuyen en respuestas celulares como contracción o crecimiento en el sistema cardiovascular, para lo cual también participa el IP_3 al liberar el calcio de los reservorios intracelulares y activar a varias enzimas dependientes de calmodulina (Fig. 3). Cabe mencionar que los receptores AT_1 pueden activar a más de un solo tipo de fosfolipasa C, ya que se demostró recientemente que la fosfolipasa C- γ es activada directamente por estos receptores en músculo liso vascular de una manera independiente de proteínas G (38), en contraste con la activación de la fosfolipasa C- β para lo cual se requiere de una proteína insensible a la toxina pertussis (Ptx) como Gq.

El receptor AT_1 no solo activa a la fosfolipasa C_β , o a la PLD, sino también a la fosfolipasa A_2 (probablemente a través del incremento en Ca^{2+} y la actividad de la PKC) la cual produce ácido araquidónico, al hidrolizar el enlace éster en posición 2 de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. El ácido araquidónico es metabolizado a prostaglandinas y tromboxanos por ciclooxigenasas y a ácidos hidroxieicosatetraenóicos y leucotrienos por lipooxigenasas. Así, el ácido araquidónico y sus derivados modifican la respuesta celular final al activar sus propios receptores. Cabe mencionar que existe evidencia en células mesangiales de la participación de una proteína G_i en la activación de la fosfolipasa A_2 , ya que esta activación es inhibida por la toxina pertussis (39).

Por otro lado, en algunos tipos celulares la activación del receptor AT_1 disminuye el AMPc intracelular al inhibir a la adenilato ciclasa (AC) por medio de una proteína G_i sensible a la toxina pertussis, por lo que reduce la actividad de la PKA y el estado de fosforilación de sus substratos, atenuando así funciones como el transporte de sodio a través del epitelio tubular proximal (40).

Estudios recientes sugieren que los receptores AT_1 causan fosforilación, vía tirosina cinasas solubles, de varias proteínas como Stat91, un factor transcripcional que pudiera ser uno de los responsables en el incremento de la expresión de algunos proto-oncogenes (41), o bien fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). De hecho hay evidencia suficiente para apoyar el concepto de interacciones

entre los receptores AT₁ y la cinasa raf-1 (42) así como la cinasa src (37), entre otras cinasas de tirosina.

Los receptores AT₁ además de producir diferentes respuestas celulares inmediatas, también estimulan, por ejemplo, el crecimiento celular especialmente el de células de músculo liso vascular y de músculo cardíaco. Esta respuesta esta mediada en parte por la activación de la ruta transduccional de la MAP cinasa y el incremento en la expresión de varios proto-oncogenes particularmente *c-fos* y *c-jun* (Fig. 3). Los productos codificados por dichos proto-oncogenes (FOS, JUN) forman un heterodímero, llamado factor transcripcional AP1, el cual regula la transcripción de algunos genes involucrados en el crecimiento celular, incluyendo a muchos genes que codifican para factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular (Fig. 3).

Todos los efectos farmacológicos de la angiotensina II parecen ser mediados por el receptor AT₁ y no se ha definido un efecto funcional para el receptor AT₂. En la actualidad poco se conoce en cuanto a los mecanismos efectores activados vía receptores AT₂. De datos recientes se deduce que este receptor inhibe una proteína asociada a membrana, fosfatasa de tirosina por medio de una proteína G sensible a toxina pertussis (43), y/o regula canales de K⁺ (44).

ESTRUCTURA-FUNCION

Por medio de estudios de mutagénesis dirigida y expresión subsecuente de los cDNA mutados en las células COS (45) se demostró que al reemplazar cualquiera de las cuatro cisteínas por glicinas en los dominios extracelulares se reduce significativamente la afinidad de la [¹²⁵I]-ang II por el receptor AT₁. En este mismo trabajo se demuestra que una mutación puntual en el residuo de lisina¹⁹⁹ en el quinto dominio intramembranal por una glutamina inhibe marcadamente la unión de la [¹²⁵I]-ang II, lo cual sugiere fuertemente que el ligando se une al receptor en la parte interna de la membrana plasmática. Sin embargo, la unión del agonista también se afecta por mutaciones puntuales en la región amino terminal adyacente al dominio transmembranal I y en la

tercer asa extracelular cerca de la parte superior del dominio transmembranal VII (46). Por otro lado, también se ha visto con la ayuda de mutaciones puntuales que la unión de los antagonistas peptídicos ocurre en sitios diferentes a la de los antagonistas no-peptídicos (47). Ahora bien, con estudios de la misma naturaleza pero con distinto enfoque, al tratar de dilucidar las regiones responsables para el acoplamiento del receptor con sus moléculas efectoras y la internalización (48-50), se ha podido concluir que, en general, las mutaciones que afectan cada extremo de la segunda asa citoplásmica, la delección del extremo carboxilo terminal, y, en un menor grado, mutaciones de la tercer asa citoplásmica, atenúan el acoplamiento con la fosfolipasa C.

RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA AT₂

Con el uso de antagonistas selectivos para los diferentes subtipos de receptores para la angiotensina se demostró farmacológicamente la existencia de receptores AT₂. Estos receptores, AT₂, presentan muy baja afinidad por los bifenilimidazoles, como losartan (Dup753), y una alta afinidad por las tetrahidroimidazopiridinas, como el PD123177 (15). Además, tienen mayor afinidad por el CGP42112A que los receptores AT₁. Aunque el compuesto CGP ha sido considerado históricamente como un antagonista, evidencia muy reciente con receptores clonados y expresados en células COS-7 sugiere que esta molécula es de hecho un agonista (51). En lo que respecta a los agonistas fisiológicos, los receptores AT₂ unen angiotensina II con afinidad similar ($K_i \leq 1$ nmol/L) a la afinidad de los AT₁ ($K_i \leq 1$ nmol/L), y angiotensina III con un poco menos de afinidad ($K_i < 10$ nmol/L) para los receptores AT₂ que para los AT₁ ($K_i \leq 30$ nmol/L) (52). A diferencia de los receptores AT₁, la afinidad por el agonista de los sitios de unión AT₂ se incrementa con ditiotreitól debido muy probablemente a los ocho residuos de cisteína que se encuentran en las regiones extracelulares (15,53).

El subtipo de receptor AT₂ se clonó simultáneamente de una biblioteca genómica fetal de rata y de células PC12W (51,54). La estructura de este tipo de receptor también es

de siete dominios transmembranales con una masa molecular de 41 kDa. Sin embargo, la proteína de 363 residuos de aminoácidos es sólo 34 % idéntica a la de los receptores AT₁ (51,53). Estos receptores poseen cinco sitios de glucosilación, a diferencia de los receptores AT₁ que sólo tienen tres sitios. Finalmente, la segunda asa intracelular contiene un sitio potencial de fosforilación por la proteína cinasa C, mientras que la región de la cola citoplásmica tiene tres secuencias consenso para ser fosforiladas también por la proteína cinasa C y una para ser fosforilada por la proteína cinasa dependiente del AMPc.

ESTRUCTURA GENICA

El gen está compuesto de tres exones, no obstante que la secuencia codificante completa se encuentra en el tercer exón (55). La región promotora del gen de ratón contiene varias secuencias consenso para elementos regulatorios, que incluyen a AP1, C/EBP, PEA-3 y NF-IL6 (55,56). Se ha demostrado que el gen humano AT₂ no tiene intrones en la región codificante, y que se localiza en el cromosoma X (54).

DISTRIBUCION EN TEJIDOS

Los receptores AT₂ se expresan mayoritariamente en diversos tejidos de embrión o feto, con una disminución dramática en su expresión después del nacimiento (57-60). También estos receptores se expresan en el músculo esquelético y en la médula suprarrenal (60), en la aorta fetal (61) y en algunas áreas del cerebro de ratas recién nacidas, en áreas sensoriales y en algunas estructuras del sistema límbico (58). Mediante el análisis del ARNm para receptores AT₂ con la técnica de "Northern blot" se ha detectado la expresión de estos receptores en las glándulas suprarrenales, cerebro y útero,

por otra parte con metodología más sensible como el RT-PCR se han detectado bajos niveles de expresión de este receptor en el corazón, hígado, riñón y pulmón (12,57).

MECANISMOS TRANSDUCCIONALES

Aunque estructuralmente los receptores AT_2 pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, aún no se ha demostrado ninguna interacción entre alguna proteína G y estos receptores. De hecho, se conoce poco acerca de las moléculas efectoras que participan en los sistemas transduccionales. Hasta la fecha se han propuesto tres tipos diferentes de activación de segundos mensajeros para los receptores AT_2 en tejidos específicos; inhibición de la producción de GMPc (62,63), activación de los canales de potasio (44) e inhibición de una fosfatasa de tirosina (51,63). El acoplamiento a la guanilato ciclasa con efecto inhibitorio parece ser indirecto, ya que tal acoplamiento es bloqueado por inhibidores de canales de calcio (62), por un inhibidor selectivo de fosfodiesterasa (62) y por un inhibidor de fosfotirosina fosfatasa (63). La mejor evidencia que se tiene hasta ahora proviene de experimentos en los que se ha clonado al receptor AT_2 y se ha expresado en células COS-7 (51). En estos estudios, la angiotensina II no tuvo efecto en el GMPc, sin embargo se inhibió significativamente la actividad de fosfatasa en fosfotirosina a nivel de membrana celular, lo cual hace de conocimiento más aceptado que los receptores AT_2 estén actuando a través de una fosfatasa en tirosina.

RECEPTORES ATIPICOS

Considerando los criterios de clasificación utilizados para los receptores AT_1 y AT_2 se han identificado varios receptores que no encajan bien en esta clasificación. Así en la mayoría de los casos estos receptores se expresan en órganos de reptiles, anfibios o peces pero casi nunca en mamíferos y generalmente requieren de una mejor

caracterización tanto farmacológica como molecular. En 1992 Chaki & Inagami (64,65) describieron un receptor en células Neuro-2A de neuroblastoma de ratón que tiene una alta afinidad por la angiotensina II (12 nM), escasa afinidad por la angiotensina III, y es insensible a concentraciones micromolares de losartan o PD123319. Además, este receptor es sensible a ditiotreitól pero no a análogos de GTP (66). Este posible receptor de la familia de los AT activa a una isoforma de guanilato ciclasa soluble, a través de la estimulación con óxido nítrico (66). Cabe mencionar que hasta la fecha este subtipo de receptor se ha encontrado sólo en líneas celulares y no ha sido reconocido como una entidad separada y distinguible de los AT₁ y AT₂ por el subcomité de nomenclatura IUPHAR, aunque en algunas publicaciones se le denomine AT₃. Otro receptor identificado recientemente es el denominado AT₄, el cual se distribuye en muchos tejidos principalmente en cerebro y riñón, y parece reconocer a la angiotensina IV como su ligando natural. Este subtipo presenta el siguiente orden de afinidad por sus ligandos: ang IV >> ang III >> ang II >> losartan o PD123319 (67). El ditiotreitól aumenta la afinidad de este receptor por la angiotensina IV (66). Aunque no se ha identificado ningún mecanismo transduccional para estos receptores, se ha propuesto que participan en la modulación de algunas funciones cerebrales y en el flujo sanguíneo corticorrenal (68).

C-FOS

Los oncogenes celulares se pueden definir como genes que son capaces de inducir la transformación neoplásica de cualquier tipo celular bajo ciertas condiciones. Estos genes surgen por medio de mutaciones o cambios en la regulación de la expresión de un gen normal, denominado como "proto-oncogen" (69). Además de los oncogenes que surgen o se encuentran en el genoma celular, algunos virus tienen oncogenes en su genoma.

Generalmente se piensa que el surgimiento de células transformadas a partir de células normales en cultivo involucra la inmortalización de las células al no estar limitado su crecimiento a un número determinado de ciclos de división. Tales líneas celulares establecidas parecen estar parcialmente transformadas y una gran variedad de agentes carcinogénicos pueden causarles una subsecuente transformación, que las lleva a un estado de crecimiento no-regulado tal y como el de las células cancerosas.

Las células transformadas se pueden distinguir morfológicamente y, debido a su escasa dependencia por los factores de crecimiento exógenos, son generalmente tumorigénicas cuando son transplantadas a animales inmunológicamente compatibles.

Actualmente de cerca de 30,000 genes humanos funcionales se han identificado cerca de 100 proto-oncogenes, que bajo ciertas condiciones, son potencialmente neoplásicos (70). También se conocen diferentes mecanismos de acción de los oncogenes por lo cual a estos se les puede clasificar en grupos con actividad similar (Tabla 1).

TABLA 1

CLASIFICACION FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS DE LOS ONCOGENES

| |
|---|
| CLASE 1 Proteínas relacionadas con factores de crecimiento: PD6FB/Sis, TNT2, HSTF1/HST1. |
| CLASE 2 Cinasas de tirosina: Receptores: EPH, EGFR/ERBB, FMS, KIT, MET, HER2/NEU, TRK Proteínas solubles: ABL, FPS/FES Proteínas asociadas a membrana: SRC, FGR, FYN, HCK, LCK, YES |
| CLASE 3 Receptores que carecen de actividad de cinasa: MAS |
| CLASE 4 Proteínas G: HRAS, KRAS2, NRAS, GSP, GIP2 |
| CLASE 5 Proteínas citoplásmicas con actividad de cinasas en serina: BCR, MOS, PIM1, RAF/MIL |
| CLASE 6 Proteínas con actividad de serina, treonina y tirosina cinasas: Sty |
| CLASE 7 Reguladores citoplásmicos: CRK |
| CLASE 8 Proteínas que se unen al ADN (factores transcripcionales) o proteínas localizadas en el núcleo: FOS, JUN, ETS, MYC, MYB, REL, ERBA, P53 |
| CLASE 9 Factor mitocondrial de membrana: BCL2 |
| CLASE 10 Función desconocida: LCO |

Los productos de los genes de *Fos*, *Jun* y *Myc* funcionan como factores transcripcionales nucleares. Además de controlar la síntesis del ARNm, sólo se conocen tres mecanismos por los cuales los productos oncogénicos pueden interferir con el funcionamiento celular normal;

- 1.-Por fosforilación protéica en residuos de tirosina, serina y treonina.
- 2.-Regulación metabólica vía proteínas G.
- 3.-Participación en la replicación del ADN

Este último mecanismo de acción se ha propuesto para los virus ADN tumorales, pero no hay evidencia de que los oncogenes derivados de proto-oncogenes funcionen de igual manera.

CONOCIMIENTO ACTUAL DE LOS EFECTOS TRANSCRIPCIONALES DE C-FOS / JUN

Los miembros de las familias de genes *Fos* y *Jun* constituyen el factor transcripcional AP1. La expresión celular, por transfección de genes como: *Fos*, *Ras*, *Raf* y *Src*, induce la actividad AP1, y los elementos "enhancer" AP1 se encuentran en las regiones de control cis de un número de genes que están fuertemente expresados en las células transformadas, como el gen de la colagenasa, de la metalotioneína IIA, etc. La proteína FOS no se puede dimerizar a sí misma, a diferencia de la proteína JUN que sí lo hace, por lo que es funcional y se une al ADN solo si se dimeriza con la proteína JUN o con miembros de esta familia. Se pueden presentar entonces 18 diferentes combinaciones diméricas formadas por proteínas de las familias de FOS y de JUN. La unión al ADN se da mediante la interacción con regiones del cierre de leucinas de las proteínas. Los dímeros de JUN presentan hasta 10 veces mayor afinidad por AP1 que JUNB o JUND, mientras que el grado de afinidad para los dímeros depende del tipo de proteína FOS involucrada, es decir (FOSB>FRA1>FOS).

Con respecto a los miembros de la familia de FOS, aunque la cremallera de leucinas y los dominios básicos (hidrofóbicos) son necesarios para unirse al ADN, la regulación de la transcripción de los sitios AP1 también depende de la carga neta negativa en la región carboxilo terminal, usualmente conferida por la fosforilación (71).

Los proto-oncogenes nucleares se clasifican en dos grupos principales:

- Los que interactúan solo con ADN al formar complejos con otras proteínas (FOS-JUN, MYC).
- Los que de forma monomérica tienen una alta afinidad por secuencias específicas en el ADN (ETS: MYB y ERBA).

La actividad de los factores transcripcionales de ambas categorías puede ser regulada por fosforilación, como en el caso de las proteínas FOS y MYB, lo cual pudiera ser un mecanismo general de regulación.

FAMILIA DE FOS

Los miembros de la familia del gen *Fos* forman parte de la superfamilia de las cremalleras de leucinas / hélice-asa-hélice y son los siguientes:

Fra-1 y *Fra-2* ("Fos related antigens"), *Fosb*, *r-fos* (homólogo a el tercer exon de *Fos*) y homólogos de *Drosophila* *dfRA* y *dJRA* (72). Las proteínas FOSB de murino y FOS comparten 44 % de identidad en la secuencia protéica, mientras que FOS, FOSB y FRA1 comparten sólo el 24 %. FOS y FOSB son 70 % homólogos.

Homología entre especies

FOS: 94 % identidad entre humano, ratón y rata.

79 % identidad entre pollo y ratón.

FRA1: 90 % identidad entre humano y rata.

FRA2: 87 % identidad entre humano y pollo.

Características químicas y moleculares de FOS/Fos

El gen *Fos* tiene un tamaño aproximado de 3500 nucleótidos (pb), se localiza en el cromosoma 14q24.3 de humano y en el cromosoma 12 de ratón. El gen *Fos* humano tiene 4 exones y el ARNm es de 2.2 kb con una vida media de 20-30 min, mientras que la vida media de la proteína es de 30 min. La proteína FOS de humano, rata y ratón tiene un tamaño de 380 aminoácidos, *FRA1* y *FRA2* de humano son de 271 y de 326 aminoácidos respectivamente, y el peso molecular es de 41.6 KDa para FOS, 29 KDa para *FRA1* y 35 KDa para *FRA2*.

Expresión de *fos*

Fos es un gen de respuesta temprana y su expresión se induce de manera rápida y transitoria por factores de crecimiento y mitógenos (73). El mensajero de *Fos* se puede

detectar a los 5 minutos de estimulación, y la máxima expresión de la proteína después de los 90 min.

En células leucémicas mielomonocíticas inducidas para diferenciarse por TPA se activa transitoriamente al gen *Fos* (74-76). Por otro lado, la expresión de los genes *Fosb*, *Fra1* y *Fra2* se induce de manera similar a la de *Fos* (77,78). Así, la activación de estos proto-oncogenes se correlaciona invariablemente con la estimulación en la proliferación y en la diferenciación celular.

La evidencia que se tiene para entender el papel que juega la expresión del gen *Fos* en el control del ciclo celular normal se resume en lo siguiente:

- Todos los mitógenos fisiológicos y no fisiológicos, estimulan rápida y transitoriamente la transcripción de *Fos*.
- Los ARN oligonucleótidos antisentido dirigidos para *Fos*, inhiben la mitogénesis en fibroblastos 3T3.
- La microinyección de anticuerpos contra las proteínas FOS o JUN inhibe la mitogénesis en fibroblastos 3T3, aunque anticuerpos dirigidos contra miembros de la familia de FOS de manera individual sólo causan un 30 % de inhibición, mientras que los anticuerpos dirigidos contra JUN, JUNB o JUND causan desde un 60 % hasta un 80 % de inhibición (79-82).

El hecho de que el gen *Fos* sea activado por ionóforos para el ión calcio o por ésteres de forbol sugiere que su activación en células estimuladas mitogénicamente es una consecuencia de los rápidos incrementos (<1min) en $[Ca^{2+}]_i$; y la activación de la proteína cinasa C (PKC) que ocurre de manera normal por la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2). Sin embargo existe evidencia de que en los linfocitos T la activación de *Fos* (y *Myc*), causada por la estimulación del receptor T de estas células, es independiente de PKC o bien de señales iónicas como el calcio y se sugiere la participación de una señal adicional intracelular que involucre la activación de una proteína tirosina cinasa como p59^{FYN} (83,84).

Regulación transcripcional de *fos* humano.

La secuencia consenso de unión al ADN para los heterodímeros de FOS es el sitio AP1 (activation protein-1) TGA^C/G^TTCA, o también denominado "elemento de respuesta a TPA", (TRE: cis-acting TPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) response element).

El heterodímero FOS/JUN regula la transcripción de ciertos genes negativa o positivamente. Así, por ejemplo el heterodímero se autoregula al inhibir la transcripción del gen *Fos*. Por otra parte, en adipocitos el heterodímero bloquea la transcripción del gen de la proteína que se une al lípido P2, y en miocitos se inhibe la transcripción del factor natriurético atrial (85). Sin embargo, los dímeros FOS/JUN forman un potente complejo de activación transcripcional para los genes humanos de la metalotioneína II A, la colagenasa, la colágena $\alpha 1$ (III), la transina o estromeolisina (una metaloproteínasa que degrada la matriz extracelular) y la proencefalina. Además, parece ser que en la mayoría de las células en donde se expresa la proteína FOS también se activan otros genes de las familias de *Fos* y *Jun*, tales como *Fra1*, *Fra2*, *Fosb*, *Jun*, *Junb* y *Jund*.

Las secuencias reguladoras del promotor de *fos* son (Fig.4) (70):

- 26 a -31 pb: secuencia de caja TATA
- 56 a -63 pb: secuencia CRE (cAMP response element)
- 76 a -90 pb: secuencia DR (direct repeat), que se requiere junto con la secuencia CRE para la transcripción basal del gen.
- 73 a -102 pb: elemento de control a retinoblastoma. P105^{RB} suprime la transcripción basal de *fos* al ser estimulado por suero.
- 120 a -220 pb: secuencia activada por el virus de hepatitis B (HBV), la cual modula la transcripción al interactuar con los sitios SRE y AP-1.
- 235 a -244 pb y
- 252 a -260 pb: secuencias reguladoras homólogas a los promotores HSP70.
- 291 a -297 pb: sitio de unión AP1, los heterodímeros FOS-JUN se unen para inhibir la transcripción del gen *fos*. También la proteína FOS interacciona cooperativamente con JUN para activar otros genes, como el de la estromeolisina, de la metalotioneína II A, de la colagenasa, etc.

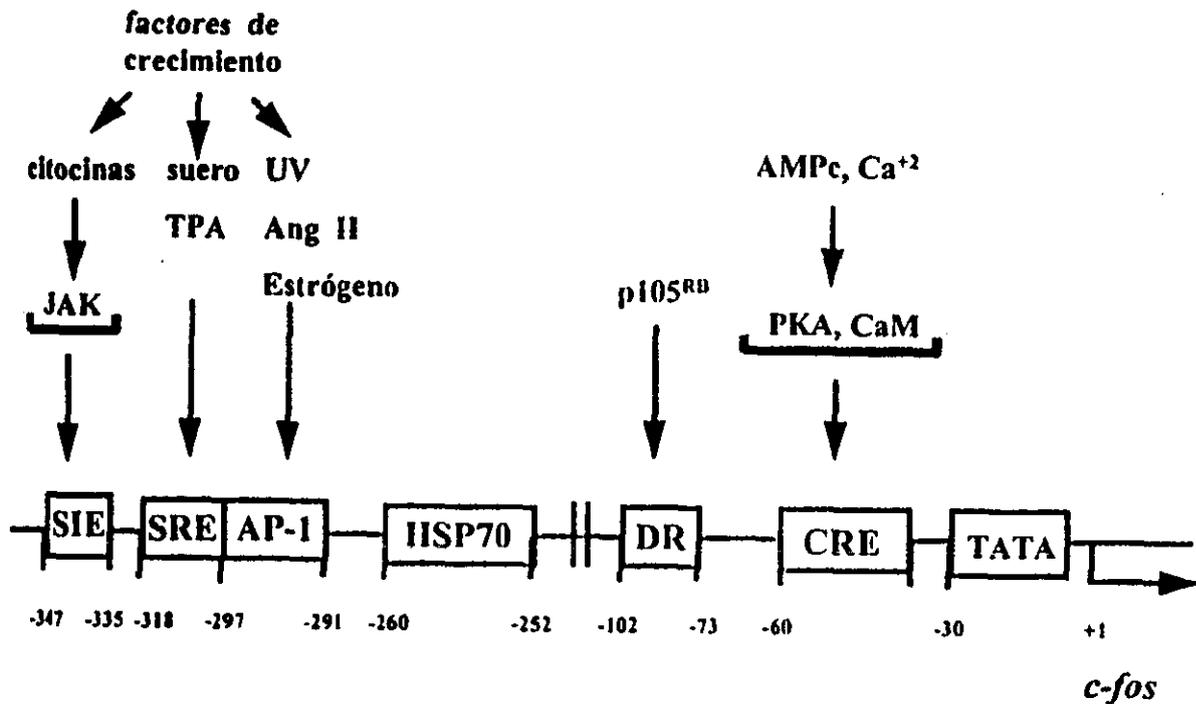


Fig.4 Secuencias reguladoras de los promotores de *c-fos*. Señales extracelulares que activan o reprimen la transcripción del proto-oncogene, *c-fos*, por medio de las secuencias reguladoras presentes en su promotor (ver significado de las siglas en el texto). Se indican ciertas proteínas cinasas; proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaM), entre otras, que participan en la expresión del gene (12).

-297 a -318 pb: secuencia SRE (serum response element), requerida para la activación por suero, PDGF (platelet derived growth factor), TPA (tetradecanoyl phorbol acetate) o por EGF (epidermal growth factor). En esta secuencia se sobrelapan varios elementos reguladores positivos como: SRE-ZBP o SRE-BP que se requieren para obtener una inducción máxima por suero del gen *fos*, o bien elementos que inhiben la transcripción del gen, como el factor transcripcional específico del músculo MyoD.

-335 a -347 pb: secuencia SIE (v-sis-conditioned medium inducible element)

208 a 218 pb: secuencia FIRE (Fos intragenic regulatory element), es una región reguladora adicional localizada al final del exón 1, capaz de causar una terminación prematura de la transcripción.

En resumen, la expresión del gen *fos* es regulada por diversos factores de manera positiva o negativamente.

ANTECEDENTES

El octapéptido angiotensina II estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos en asociación con la fosforilación en tirosina de la fosfolipasa C- γ 1 en células de músculo liso vascular de aorta de rata, lo que apoya el concepto de la fosforilación en tirosina estimulada por angiotensina II como un evento temprano en la señal de transducción (38).

En las células C9 se ha reportado el incremento en calcio intracelular por agentes externos como la exposición a oxitocina (86), sin embargo el efecto de la angiotensina II en el mismo parámetro aún no se ha reportado. Por otra parte, ya se ha observado un incremento en la producción de fosfatos de inositol por angiotensina II en las células C9 (87) y tal efecto es bloqueado por la Sar₁, Ile₈-AII (Sarile) y el losartan (Dup753) pero no por el antagonista PD123319, sugiriendo así la expresión de receptores para angiotensina II tipo AT1 en esta línea celular, lo que ha sido confirmado con estudios de asociación de ligando radiactivo con ¹²⁵I-Sarile.

En hepatocitos aislados de rata la angiotensina II y el éster de forbol PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) inducen la expresión de *c-fos*. En este trabajo se demuestra que tal inducción está regulada por reacciones de fosforilación y desfosforilación que involucran necesariamente a proteínas serina/treonina y tirosina cinasas, además de proteínas fosfatasas (88). Sin embargo, no se determinó si proteínas G sensibles a la toxina pertussis participan en el incremento de la expresión del proto-oncogen inducido por el octapéptido. Esta última interrogante nos llevó a plantear uno de los objetivos del presente trabajo.

OBJETIVOS

- Evaluar la expresión de *c-fos* mediante el efecto de la toxina pertussis sobre las proteínas Gi/Go al estimular con la hormona angiotensina II.

Además como consecuencia directa de los reportes de Marrero, et al (37,38), entre otros, sobre la activación de proteínas cinasas de tirosina o bien de serina/treonina por la angiotensina II, nos planteamos el siguiente objetivo:

- Determinar la participación de proteínas cinasas de serina/treonina y cinasas de tirosina en la expresión del mensajero del proto-oncogen *c-fos* inducida por angiotensina II.

Para estudiar los componentes moleculares que transducen la señal de angiotensina II en el hepatocito primero teníamos que partir de los siguientes objetivos:

- Seleccionar un sistema adecuado que conserve las características bioquímicas de un sistema *in vivo*.
- Caracterizar eventos transduccionales que estén ligados a la acción de la angiotensina II.

Para ello nos propusimos caracterizar en primer término tanto la producción de fosfatos de inositol como la liberación de calcio intracelular inducidos por la angiotensina en las células, epiteliales de hígado de rata, C9, en cultivo.

MATERIALES Y METODOS

El medio F12K (Kaighn's Modification), el suero fetal de bovino, los antibióticos, la tripsina y otros compuestos utilizados para el cultivo celular son de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD). El forbol miristato acetato (PMA), la estaurosporina, la angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu); la angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe); la angiotensina III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe); la angiotensina IV (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) son de Sigma Chemical Co.(St.Louis, MO). El Dup753, el PD123177 y la adenina dinucleotido nicotinamida [^{32}P] (800 Ci/mmol) son de Dupont de Nemours & Co.Inc. El dCTP [^{32}P] (3000 Ci/mmol) es de New England Nuclear (NENTM) Life Science Products. El mio-[2- ^3H]inositol (22.9 Ci/mmol) es de NENTM (Boston,MA). El Fura-2/AM- Molecular Probes (Eugene,OR). EL RNA PCR GeneAmp Kit es de Perkin Elmer Roche Molecular Systems, Inc.(Branchburg, New Jersey, USA).La genisteína es de Research Biochemicals International. La línea celular C9 es de American Type Culture Collection.

Mediciones de Calcio intracelular.

Para cuantificar la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las células C9 subconfluentes se preincuban 24 hrs en medio F12K con 1% de suero, para todos los ensayos. Para los experimentos con toxina pertussis (Ptx) también se incuban las células por 24 hrs con 1 μg de la toxina. Posteriormente se incuban con 5 μM de Fura-2/AM a 37°C por 1 hr. Después se lavan con una solución amortiguadora de Krebs-Ringer-HEPES pH=7.4, se desprenden de las cajas con un gendarme y se lavan tres veces con la misma solución amortiguadora mediante la centrifugación para eliminar el colorante que no se incorporó. Las células se resuspenden en la misma solución y se mide la fluorescencia en agitación constante a 37° C en un espectrofotómetro luminiscente (AMINCO-Bowman Series2) a 340 nm y 380 nm de excitación y a 510 nm de emisión. La concentración de calcio intracelular se calcula a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo con la ecuación $[\text{Ca}^{++}]_i = K_d \{(R-R_{\text{mín}}) /$

$(R_{\text{máx}}-R)/[Sf_2/Sb_2]$. Donde K_d representa la constante de afinidad del Fura-2 por el calcio (224 nM), R la lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias, $R_{\text{mín}}$ representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar EGTA 5 mM y $R_{\text{máx}}$ es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con tritón x-100 al 10 %. Sf_2 y Sb_2 son los coeficientes de proporcionalidad del Fura-2 libre y el unido al calcio en la longitud de onda 2, respectivamente (89).

Extracción de ARN.

Se realizan extracciones de ARN total de acuerdo a la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi, 1987 (90). La extracción del ARN se hace con tiocianato de guanidina 4M, fenol, acetato de sodio 2M pH=4, β -mercaptoetanol, cloroformo y alcohol isoamílico. El ARN se obtiene al precipitar con isopropanol y se lava con etanol, las pastillas obtenidas se resuspenden en agua con dietilpirocarbonato y se cuantifican con un espectrofotómetro Beckman DU 650 por medio del coeficiente 260/280. El ARN se analiza por electroforesis en geles de agarosa con formaldehído y su tinción con bromuro de etidio.

Mediciones del ARNm de *c-fos* y GAPDH por el método de RT-PCR.

La expresión del mensajero del proto-oncogen *c-fos* se determina al realizar reacciones en cadena de la polimerasa y transcriptasa reversa de la siguiente manera: la primera cadena de cDNA se sintetiza utilizando ARN total como templado. El ARN total (5 μ g) se incuba a 42°C durante 1 hr con una mezcla, en un volumen total de 20 μ l, de 2.5 U de Transcriptasa Reversa MulV, 1X RT solución amortiguadora, 5mM de $MgCl_2$, 1mM de cada dNTP's, 1 μ C de dCTP [^{32}P] con una actividad específica de 3000 Ci/mmol, 1 U de inhibidor de ARNasa y 0.75 μ M de los oligonucleótidos antisentido (5'-agtagattggcaatctcgg-3' para *c-fos* y 5'-agatccacaacggatatacatt-3' para GAPDH). Para la reacción de amplificación (PCR) los productos de RT (20 μ l) se mezclan (en un volumen

final de 100 µl) con 2mM de MgCl₂, 1X PCR solución amortiguadora II, agua con dietilpircarbonato, 2.5 U de DNA Polimerasa Amplitaq y 0.15 µM de los oligonucleótidos sentido (5'-cagaccatgatgttctcgg-3' para *c-fos* y 5'-tcctcaagattgtcagcaa-3' para GAPDH). Los ciclos de amplificación para *c-fos* (35 ciclos) y para GAPDH (25 ciclos) se realizan bajo las siguientes condiciones; 1) Desnaturalización a 95°C durante 1 min, 2) Alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C durante 1 min, 3) Extensión de los oligonucleótidos a 72°C durante 1.5 min. El tamaño de los productos de RT-PCR que se obtienen para *c-fos* es de 567 pb, que corresponde a las bases 128-695 del cDNA de *c-fos*, y para GAPDH es de 309 pb, que corresponde a las bases 506-814 del ARNm de GAPDH. La especificidad de la reacción de RT-PCR para *c-fos* se verifica al secuenciar el producto de PCR por métodos de secuenciación directos. Los resultados se cuantifican por densitometría con la ayuda del Phosphoimager-Storm. Los productos de RT-PCR se corren en geles de acrilamida al 7.5 % los cuales se tiñen con bromuro de etidio, se secan y exponen en placas autoradiográficas X-OMAT (Kodak) a 80 °C de 4-8 hrs.

ADP-Ribosilación.

La ADP-ribosilación de proteínas se determina por la transferencia de ADP-ribosa [³²P] del NAD⁺ a una cisteína en el carboxilo terminal de las subunidades alfa de las proteínas G. Las proteínas modificadas se visualizan por autoradiografía después de la separación de estas por SDS-PAGE. La reacción de ADP-ribosilación se realiza al mezclar en un volumen final de 100 µl: 250 mM de fosfato de potasio, 20 mM de timidina y arginina, 5 mM de MgCl₂, 1mM de ATP, 10 uM de NAD⁺, 15 mM de NADP⁺, 10 mM de GTP, 10 µCi de NAD⁺ [³²P] con una actividad específica de 800 Ci/mmol, la toxina pertussis activada previamente con DTT y las muestras o membranas substrato (91). Se incuba a 30°C durante 1 hr y la reacción se detiene con una solución fría de 250 mM KH₂PO₄, las muestras son centrifugadas a 12,500 g. Los sobrenadantes se desechan cuidadosamente y se resuspenden las pastillas en solución Laemli. Así, las proteínas ADP-ribosiladas se analizan por SDS-PAGE.

Producción de fosfatos de inositol.

Las células se preincubaban con medio con 6 $\mu\text{Ci/ml}$ de mioinositol [^3H] con una actividad específica de 22.9 Ci/mmol y suero bovino fetal al 1 % durante 24 hrs. Al día siguiente se retira el medio de marcaje radiactivo y se lavan las células dos veces con 1X de PBS y se dejan incubando en solución Krebs-Ringer-Hepes con calcio 1.3 mM, 10 mM de cloruro de litio y angiotensina II con o sin losartan (Dup753). La incubación de estimulación se detiene con ácido perclórico frío al 30 %. Después de esto a las muestras se les adiciona una solución alcalina de 1.5 M KOH, 75 mM HEPES de manera que se obtenga un $\text{pH}=7.3-7.8$. Las muestras se centrifugan a 8,500 rpm durante 10 minutos en una centrifugadora Beckman TJ-6, los sobrenadantes resultantes se eluyen en columnas Dowex de intercambio aniónico (resina AG1X8) (92). Se recolectan las fracciones eluidas de los diferentes inositoles GPI, IP₁, IP₂, IP₃, se les agrega líquido de centelleo y se les mide las emisiones radiactivas en un contador de centelleo.

RESULTADOS

Las células C9 liberan calcio de los reservorios intracelulares de manera diferencial cuando son estimuladas por las hormonas angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), angiotensina III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), ó angiotensina IV (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Así, el orden de potencia de las diferentes angiotensinas utilizadas es el siguiente: AII = AIII >> AI > AIV y los valores de EC_{50} son: AII= 5 nM, AIII= 7 nM, AI= 300 nM, AIV= 500 nM (Fig. 1a). La respuesta máxima que se alcanza en todos los casos es de aproximadamente dos y media veces mayor con respecto a la concentración del basal.

Además se probaron diferentes concentraciones de Dup753 y PD123177 (Fig. 1b) para caracterizar el efecto que ejercen estos antagonistas sobre la respuesta producida por 0.1 μM de angiotensina II y se observó un bloqueo total dependiente de la dosis en el caso

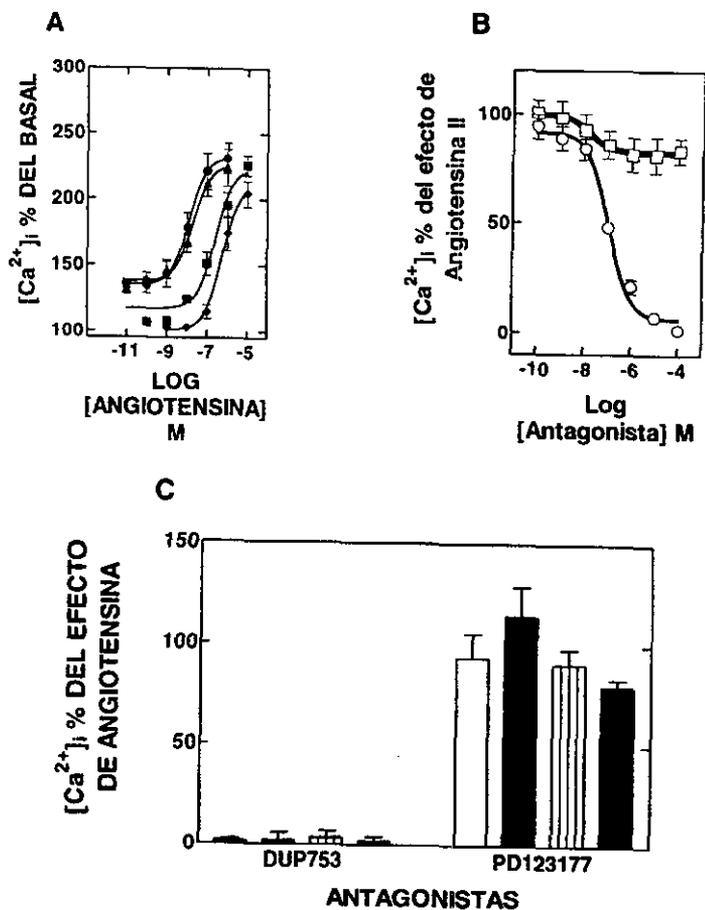


Fig.1 Efecto de los agonistas y antagonistas en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en las células C9.

Panel A. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de angiotensina II (círculos oscuros), angiotensina III (triángulos oscuros), angiotensina I (cuadros oscuros) o angiotensina IV (rombos oscuros). Los datos se presentan como porcentaje de la $[Ca^{2+}]_i$ basal la cual fue de 137 ± 5 nM. **Panel B.** Las células se incubaron con la concentración indicada de Dup753 (círculos claros) o PD123177 (cuadros claros) y se estimularon 1-2 minutos después con angiotensina II 100 nM. Los datos se presentan como porcentaje del efecto de angiotensina II. **Panel C.** Las células se incubaron con 10 μ M Dup753 o 10 μ M de PD123177 por 1 min. y se estimularon con 1 μ M de angiotensina I (barras claras), 100 nM angiotensina II (barras oscuras), 100 nM angiotensina III (barras rayadas) o 10 μ M angiotensina IV (barras punteadas). Los datos se presentan como porcentaje del efecto de cada angiotensina en ausencia del antagonista. En todos los casos se grafican los promedios y sus respectivos errores estándares de 5-7 experimentos de distintas preparaciones celulares.

de Dup753 ($IC_{50}=100$ nM, $K_i=4.7$ nM) y un efecto nulo en el bloqueo por PD123177, lo cual nos sugiere fuertemente que la respuesta de liberación de calcio intracelular es mediada a través de receptores de angiotensina tipo AT_1 .

Todas las respuestas de liberación de calcio intracelular obtenidas al estimular las células con las distintas angiotensinas son bloqueadas con $10 \mu\text{M}$ de losartan (Dup753, antagonista selectivo por los receptores AT_1) y no con $0.1 \mu\text{M}$ de PD123177 (Fig. 1c), lo cual confirma la participación de receptores tipo AT_1 .

Para caracterizar el o los mecanismos transduccionales acoplados a la activación del receptor para angiotensina en esta línea celular, se midió el segundo mensajero fosfatidilinositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3), así como sus precursores IP_1 e IP_2 (Fig. 2). Se observó un incremento de 0.5 hasta dos veces en la producción de los fosfatos de inositol sobre el basal cuando las células fueron estimuladas con angiotensina II $10 \mu\text{M}$ por 30 segundos, y tal aumento fue bloqueado totalmente cuando se utilizó el antagonista losartan (Dup753) $100 \mu\text{M}$. El antagonista por sí solo no tuvo efecto en este parámetro.

Los resultados antes mencionados, tanto el orden de potencia de las diferentes angiotensinas como el efecto de los agonistas y antagonistas sobre el incremento en la concentración del calcio intracelular y en la producción de los fosfatos de inositol, nos indican que los receptores responsables de mediar la respuesta inducida por angiotensina muy probablemente pertenecen a la familia de los AT_1 y no de los AT_2 , y que estos receptores se acoplan al mecanismo transduccional de producción de fosfoinosítidos-liberación de calcio intracelular, como se ha observado en hepatocitos aislados de rata (88).

Por otra parte, en este tipo celular se incrementa la expresión del ARN mensajero del proto-oncogen *c-fos* de manera dependiente de la dosis al estimular con angiotensina II, y se obtiene una respuesta máxima a una concentración de $0.1 \mu\text{M}$ a los 45 minutos (Fig. 3a y Fig. 3b). Con el uso de los antagonistas losartan (Dup753) y PD123177, como herramienta para distinguir entre los subtipos de receptores de manera similar a lo obtenido para los parámetros concentración de calcio intracelular y producción de los fosfatos de inositol, se pudo observar una caída en el incremento del ARNm de *c-fos*

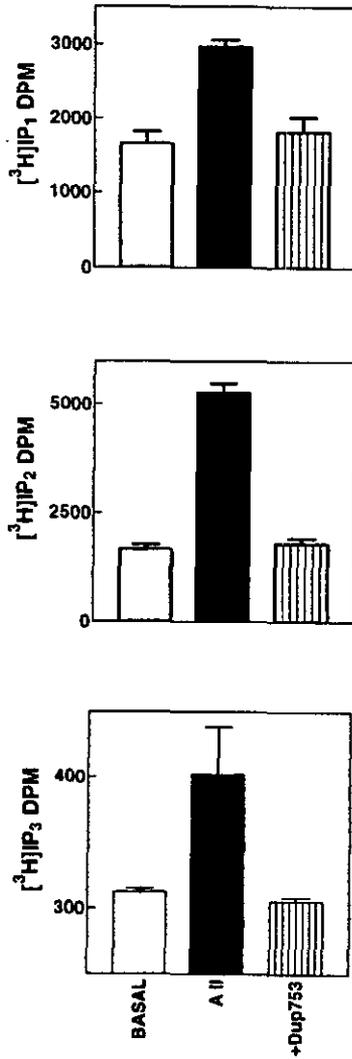
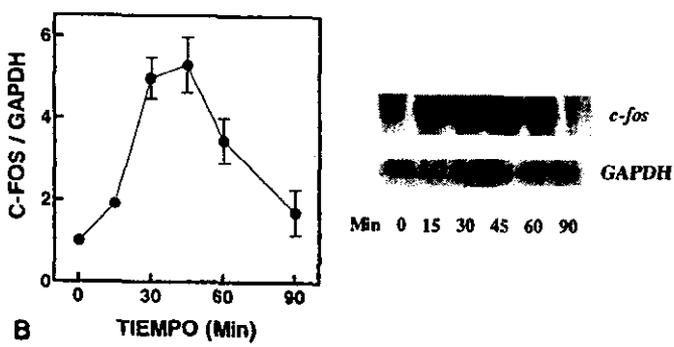


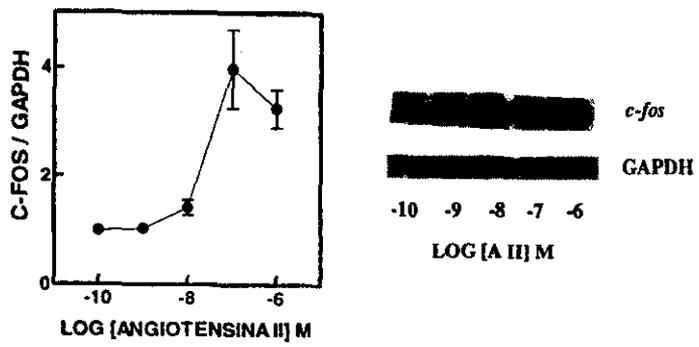
Fig.2 Efecto de angiotensina II y Dup753 en la producción de los fosfatos de inositol.

Las células marcadas con [³H]Inositol se incubaron: sin ningún agente (BASAL, barras claras), con angiotensina II 100 nM (AII, barras oscuras) o con Dup753 10 uM + angiotensina II 100 nM (+ Dup753, barras rayadas). Se graficaron los promedios y errores estándares de 4 experimentos con preparaciones celulares diferentes.

A



B



C

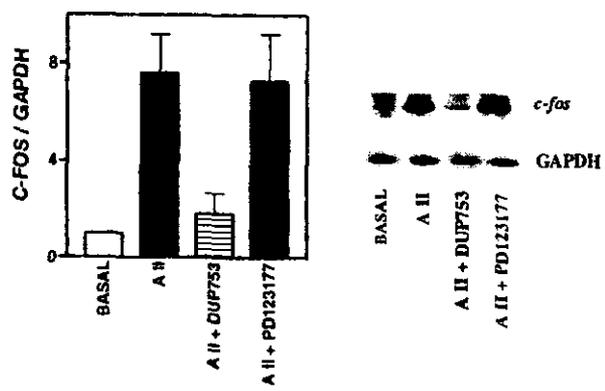


Fig.3 Efecto de angiotensina II y antagonistas en la expresión de *c-fos*.
Panel A. Las células se incubaron con angiotensina II 100 nM a distintos tiempos. **Panel B.** Las células se incubaron por 45 min. con diferentes concentraciones de angiotensina II. **Panel C.** Las células se incubaron: sin ningún agente (BASAL, barra clara), con angiotensina II 100 nM (AII, barra oscura), con angiotensina II 100 nM + Dup753 10 uM (AII + Dup753, barra rayada) o angiotensina II 100 nM + PD123177 10 uM (AII + Pd123177, barra punteada). Los datos se presentan como relación de *c-fos* / GAPDH que se considero como 1 (100 %) en ausencia de cualquier estímulo. Los datos son los promedios y errores estándares de 4-7 experimentos de diferentes preparaciones celulares. También se presentan las autoradiografías representativas.

inducido por angiotensina II 100 nM debida al losartan (Dup753) cuando se utilizó 100 mM, a diferencia del PD123177 100 mM, el cual no ejerció ningún efecto sobre el incremento de este mensajero por angiotensina II (Fig. 3c). Así, los receptores AT₁ parecen estar también regulando la inducción de la expresión del proto-oncogen *c-fos* por angiotensina II.

Para determinar si los efectos de la angiotensina II son mediados a través de las proteínas G_i/G_o, las cuales son sensibles a la toxina pertussis, se preincubaron las células con esta (1µg) durante 24 hrs. Lo que observamos es que no hay ningún efecto de la toxina en la liberación de calcio intracelular (Fig. 4a), ni tampoco en la expresión del proto-oncogen *c-fos* inducidas por las diferentes angiotensinas (Fig. 4b). Esto nos indica que la proteínas G_i/G_o, u otras sensibles a la toxina, no están participando en la cascada transduccional que induce la expresión de *c-fos*. Los resultados obtenidos hasta el momento confirman la inducción de la expresión de *c-fos* por angiotensina II a través, muy probablemente, del sistema transduccional de producción de fosfoinosítidos- liberación de calcio intracelular, mediado por proteínas G insensibles a PTX como G_q.

Para demostrar que la toxina es activa y está ADP-ribosilando correctamente a las proteínas G_i/G_o, se realizó el ensayo de ADP-ribosilación con membranas extraídas de las células C9, sometidas o no a pretratamiento con la toxina pertussis. Como se puede observar en la Fig. 4c, al pretratar las células con PTX la [³²P] ADP-ribosilación se bloquea por completo en las membranas incubadas con la toxina *in vitro*.

Los siguientes experimentos se realizaron con la finalidad de determinar si proteínas cinasas de serina/reonina (como la proteína cinasa C), y/o proteínas cinasas de tirosina, están siendo activadas por la angiotensina II para inducir la expresión del proto-oncogen *c-fos* en las células C9.

En un primer enfoque se realizaron experimentos con células pretratadas y no pretratadas con un éster de forbol (PMA, el cual mimetiza la acción del diacilglicerol, activador endógeno de la PKC) que, mediante incubaciones prolongadas, inactiva a la mayoría de las isoformas de PKC o bien, a las isoformas sensibles a este agente. Las células se incubaron toda la noche con PMA 1µM para estimularlas al día siguiente con

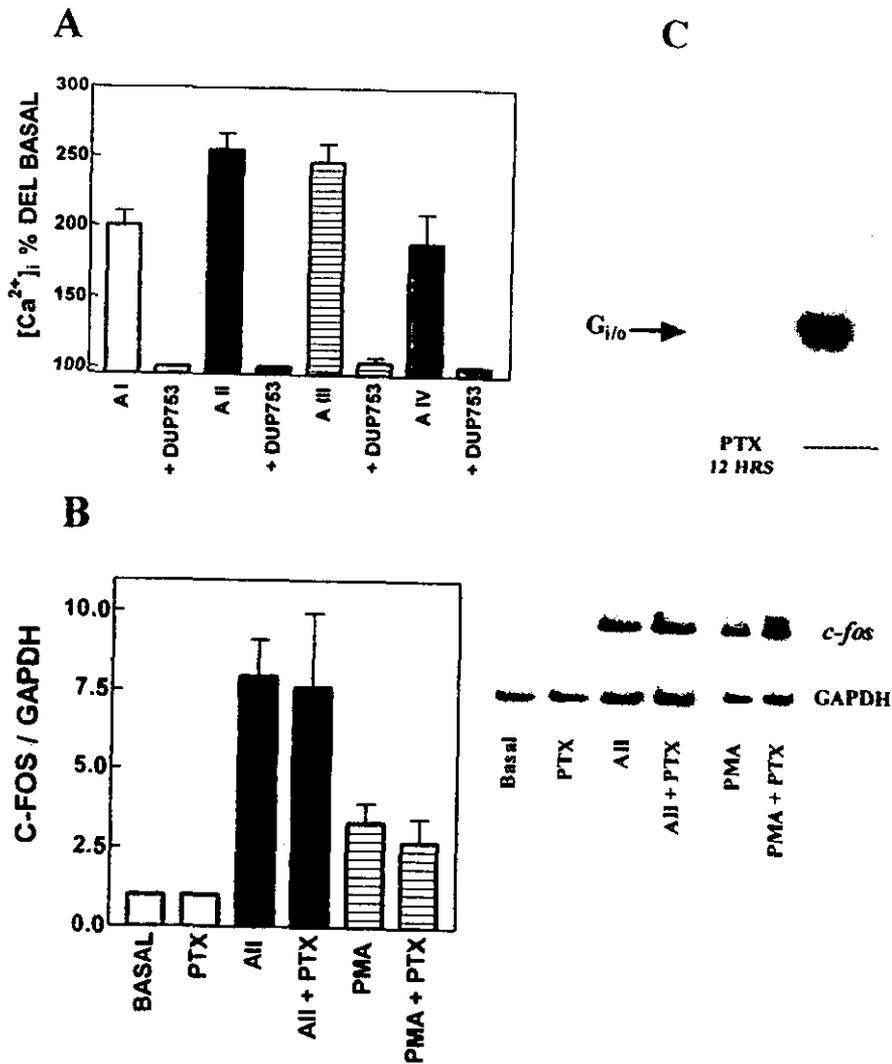


Fig.4 Efecto de la toxina pertussis en las acciones de la angiotensina en la concentración del calcio intracelular y la expresión del ARNm de *c-fos*.

Panel A. Las células tratadas con toxina pertussis se incubaron con angiotensina I 1 μ M (A I, barra clara), con angiotensina II 100 nM (A II, barra oscura), con angiotensina III 100 nM (A III, barra rayada), o angiotensina IV 10 μ M (A IV, barra punteada). Se agregó Dup753 10 μ M donde se indica 1 min. antes de los agonistas. Los datos se presentan como porcentaje de la [Ca²⁺]_i basal la cual fue de 120 ± 7 nM. **Panel B.** Las células se preincubaron en ausencia o presencia de la toxina pertussis (PTX) y se estimularon con angiotensina II 100 nM (barras oscuras) o con PMA 1 μ M (barras rayadas). Los datos son los promedios y errores estándares de 4-7 experimentos de diferentes preparaciones celulares. También se presentan las autoradiografías representativas. **Panel C.** Autoradiografía representativa de un ensayo de ADP-ribosilación catalizado por la toxina pertussis en membranas de células preincubadas toda la noche en ausencia (-----) o presencia de la toxina pertussis.

angiotensina II 100 nM y PMA 1 μ M y así poder medir la expresión de *c-fos* con la ayuda de la técnica RT-PCR. Se observó una disminución parcial del efecto de la angiotensina II y del PMA en la expresión de *c-fos* en las células pretratadas con PMA toda la noche (Fig. 5b) si se les compara con las células no pretratadas (Fig. 5a). Con respecto a la disminución parcial observada con angiotensina II en las células pretratadas, si bien la PKC está siendo activada por la angiotensina II para inducir la expresión de *c-fos*, a través del mecanismo transduccional de producción de fosfatos de inositol-liberación de calcio intracelular, probablemente no es la única cinasa que está siendo activada para tal efecto como puede observarse en la Fig. 5b debido a la expresión residual de *c-fos*.

En un segundo enfoque se hicieron experimentos en los cuales se utilizaron inhibidores de proteínas cinasas, como la estaurosporina (que inhibe cinasas que fosforilan en residuos de serina y treonina) y la genisteína (que inhibe cinasas que fosforilan en residuos de tirosina), para determinar la participación de unas proteínas cinasas u otras, o bien de ambas, en la inducción de la expresión de *c-fos* por angiotensina en esta línea celular. Como se puede observar en la figura 5c, el efecto de la angiotensina II sobre la expresión de *c-fos* es bloqueado casi en su totalidad cuando se preincuban las células con estaurosporina, caso contrario cuando se incuban las células con genisteína, en donde la expresión de *c-fos* es muy similar a la inducida con angiotensina sola.

Con estos resultados y los descritos anteriormente de los experimentos en los que se pretrataron las células con PMA toda la noche (Fig. 5), se puede concluir que las proteínas cinasas de serina/treonina, particularmente la PKC, está siendo activada por la angiotensina II y es la principal responsable de la inducción de la expresión de *c-fos*, aunque no es la única. Existe, por tanto, una contribución menor de proteínas cinasas distintas a la PKC como lo indica la caída parcial (55 %) de la expresión de *c-fos* inducida por angiotensina en las células pretratadas con PMA toda la noche (Fig. 5b), así como la pequeña expresión residual de *c-fos* cuando se preincuban las células con estaurosporina (Fig. 5c).

Finalmente, la expresión de *c-fos* observada cuando se estimula con PMA en células incubadas y no incubadas con los inhibidores de proteínas cinasas, es la esperada en

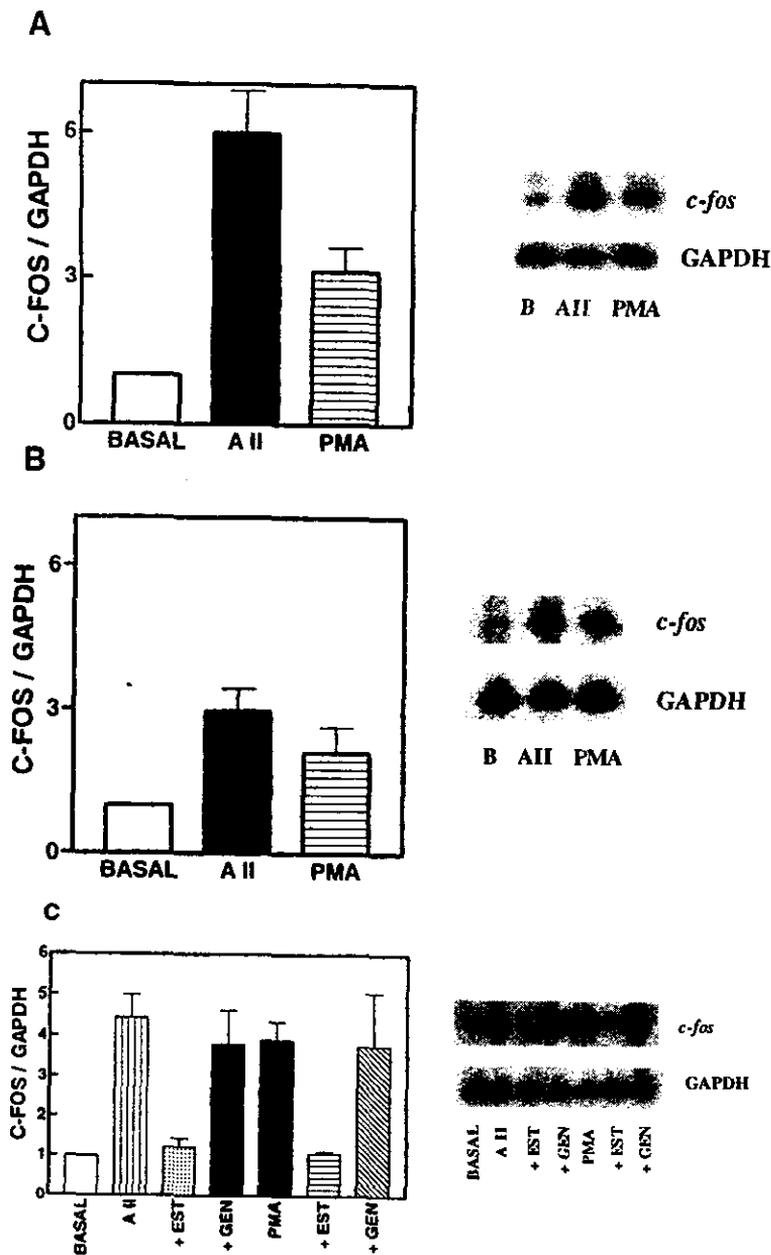


Fig.5 Efecto del PMA y angiotensina II en la expresión del ARNm de *c-fos*.

Paneles A y B. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de PMA 1 μ M durante 24 hrs. Las células se lavaron y estimularon con angiotensina II 100 nM (barras oscuras) o PMA 1 μ M (barras rayadas). Panel C. Las células se incubaron con los agonistas en ausencia y presencia de estaurosporina 1 μ M (+ES) o genisteína 3 μ M (+GEN). Los datos son los promedios y errores estándares de 4-7 experimentos de diferentes preparaciones celulares. También se presentan las autoradiografías representativas.

cuanto a que la estaurosporina disminuye la expresión de *c-fos* en su totalidad, mientras que la genisteína no la afecta en nada. De esta manera, estas condiciones nos sirven como controles del efecto que tienen los inhibidores en la inducción de *c-fos* por angiotensina II.

DISCUSION

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y en contraste con los estudios en cultivos primarios de hepatocitos, se puede decir que las células C9 son un buen modelo para estudiar las acciones de la angiotensina II y se debe a que los hepatocitos en cultivos primarios reducen su número de receptores (93), lo cual no permite estudiar los efectos de la angiotensina II.

En las células C9, la angiotensina II induce un rápido incremento tanto en la concentración de calcio intracelular como en la producción de fosfatos de inositol. El orden de potencia de las diferentes angiotensinas fue el esperado para un receptor de angiotensina, y como el losartan (Dup753) inhibió eficazmente las acciones de las diferentes angiotensinas con una afinidad aparente muy alta, de acuerdo al valor de la K_i obtenida, el subtipo de receptor que es activado por la angiotensina II en esta línea celular corresponde a la familia de los receptores AT_1 . Estos datos son similares a los obtenidos en hepatocitos de rata (94,95).

Ya se ha reportado la expresión de proto-oncogenes en respuesta a una gran variedad de agentes y/o mensajeros celulares. En el hígado de rata, se ha demostrado el incremento en la expresión de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-myc* y *c-ras* durante la carcinogénesis, la regeneración hepática y el daño hepático generalizado (96). También se ha observado el aumento en la expresión de estos proto-oncogenes durante las fases iniciales del cultivo de hepatocitos normales de rata adulta (97). Además, en hepatocitos aislados de rata (96), la expresión de *c-fos* se induce cuando las células son estimuladas con angiotensina II o el éster de forbol, PMA. Sin embargo, la manera en que ocurre el aumento en la expresión del proto-oncogen es diferente a como sucede en la línea C9. Es

cuanto a que la estaurosporina disminuye la expresión de *c-fos* en su totalidad, mientras que la genisteína no la afecta en nada. De esta manera, estas condiciones nos sirven como controles del efecto que tienen los inhibidores en la inducción de *c-fos* por angiotensina II.

DISCUSION

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y en contraste con los estudios en cultivos primarios de hepatocitos, se puede decir que las células C9 son un buen modelo para estudiar las acciones de la angiotensina II y se debe a que los hepatocitos en cultivos primarios reducen su número de receptores (93), lo cual no permite estudiar los efectos de la angiotensina II.

En las células C9, la angiotensina II induce un rápido incremento tanto en la concentración de calcio intracelular como en la producción de fosfatos de inositol. El orden de potencia de las diferentes angiotensinas fue el esperado para un receptor de angiotensina, y como el losartan (Dup753) inhibió eficazmente las acciones de las diferentes angiotensinas con una afinidad aparente muy alta, de acuerdo al valor de la K_i obtenida, el subtipo de receptor que es activado por la angiotensina II en esta línea celular corresponde a la familia de los receptores AT_1 . Estos datos son similares a los obtenidos en hepatocitos de rata (94,95).

Ya se ha reportado la expresión de proto-oncogenes en respuesta a una gran variedad de agentes y/o mensajeros celulares. En el hígado de rata, se ha demostrado el incremento en la expresión de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-myc* y *c-ras* durante la carcinogénesis, la regeneración hepática y el daño hepático generalizado (96). También se ha observado el aumento en la expresión de estos proto-oncogenes durante las fases iniciales del cultivo de hepatocitos normales de rata adulta (97). Además, en hepatocitos aislados de rata (96), la expresión de *c-fos* se induce cuando las células son estimuladas con angiotensina II o el éster de forbol, PMA. Sin embargo, la manera en que ocurre el aumento en la expresión del proto-oncogen es diferente a como sucede en la línea C9. Es

decir, hay evidencia de que proteínas cinasas (Ser/Thr) y cinasas (Tyr) están siendo activadas por PMA y angiotensina II para aumentar la expresión de *c-fos* en hepatocitos aislados de rata (96), mientras que en el caso de la línea celular C9, las proteínas cinasas involucradas son del tipo Ser/Thr y no de Tyr. Las evidencias de esto están dadas por los experimentos en los que se preincubaban las células C9 con genisteína (inhibidor de proteínas cinasas en tirosina) y no se ve modificación alguna en el incremento de *c-fos* inducido tanto por angiotensina II como por PMA. En contraste, con los experimentos hechos en los hepatocitos aislados de rata se observó que la genisteína inhibió de manera dependiente de la dosis los efectos de ambos agentes, bloqueando el efecto de la angiotensina II casi por completo, mientras que el PMA solo parcialmente.

En cuanto a la expresión del ARNm de *c-fos* en las células C9, que fue de particular interés en este trabajo, las curvas de dosis respuesta y curso temporal de la angiotensina II fueron similares a las obtenidas en hepatocitos aislados por perfusión del hígado de rata (98). Además, la capacidad del losartan (Dup753) y no de PD123177 para bloquear la expresión del mensajero, indica claramente que en las células C9 éste efecto es mediado a través de receptores AT₁ como se observó también en células frescas aisladas del hígado de rata (98).

Resulta interesante que la toxina pertussis sea capaz de inhibir el efecto que tiene la angiotensina II sobre la síntesis y expresión del angiotensinógeno en hepatocitos aislados de rata, ya que al incubar los hepatocitos con la toxina, tanto el incremento del ARNm del angiotensinógeno inducido por la angiotensina II como la disminución de los niveles de AMPc son bloqueados por completo (99,100).

Los experimentos del presente trabajo con toxina pertussis, nos dan información importante en cuanto a la participación o no de proteínas G sensibles a la misma, como G_i/G_o, en el incremento de la expresión del ARNm de *c-fos* por angiotensina II. Este aspecto no se había podido determinar anteriormente en hepatocitos de rata debido, sobre todo, a la toxicidad que produce la toxina en el organismo a causa de los tratamientos crónicos necesarios para que la toxina ejerza sus acciones, o bien, tenga efecto. Así, en las células C9, la capacidad de la angiotensina II para incrementar la expresión del

mensajero de *c-fos* fue independiente o insensible a la toxina pertussis, sugiriendo fuertemente que las proteínas G_i/G_o no están involucradas en este efecto, y que muy probablemente es una proteína del tipo G_q la que está participando.

Actualmente los eventos de fosforilación y desfosforilación protéica son procesos bioquímicos estudiados con cierta profundidad para comprender los diferentes mecanismos de transducción celular, a través de los cuales la célula regula su metabolismo. Por ejemplo, la fosforilación de residuos de serina y treonina en proteínas clave es esencial para la regulación de diferentes rutas metabólicas como el metabolismo del glucógeno, la biosíntesis de proteínas y la transducción de mensajes a través de receptores transmembranales en las células, entre otros.

Por otra parte, la fosforilación en residuos de tirosina de ciertas proteínas, también necesaria para regular el metabolismo celular, ha sido estudiada ampliamente en el control de la proliferación celular y en los mecanismos transduccionales mediados por receptores que responden a una gran variedad de hormonas, como por ejemplo receptores a factores de crecimiento, a citocinas, a mitógenos, etc.

Actualmente hay evidencia tanto de la activación de proteínas cinasas en tirosina, principalmente a largo plazo (38,101,102,103), como de proteínas cinasas en serina y treonina (activación temprana de la PKC) por angiotensina II.

En este trabajo, con los experimentos de estaurosporina y los pretratamientos con un éster de forbol durante toda la noche, se concluye que la PKC participa de forma mayoritaria en los efectos que ejerce la angiotensina II sobre la expresión de *c-fos* concretamente, en las células C9. Ahora bien, el hecho de que la estaurosporina sea un inhibidor relativamente selectivo para la PKC y pueda inhibir otras cinasas distintas a ésta, plantea la posibilidad de que otras cinasas pudieran estar involucradas en las acciones de angiotensina II. Las cinasas en tirosina no serían buenos candidatos debido a que en los experimentos, en donde se utilizó la genisteína, no se observó ningún efecto sobre la acción de angiotensina. Por tanto, otras cinasas diferentes a la familia de la PKC sensibles a la estaurosporina, serían mejores candidatos.

CONCLUSION

En resumen, con los datos obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo se concluye que en la línea celular C9 (epitelial de hígado de rata) la angiotensina II estimula la producción de fosfatos de inositol y la liberación de calcio intracelular, vía receptores de la familia AT₁. De tal manera que los receptores para angiotensina II transducen la señal del octapéptido al acoplarse al sistema transduccional de recambio de fosfoinosítidos-liberación de calcio intracelular.

Por otra parte, tanto la angiotensina II como el éster de forbol, PMA, inducen un aumento en la expresión del ARNm del proto-oncogen *c-fos*, aunque con distinta magnitud (6 ± 0.87 y 3.1 ± 0.5 veces sobre el basal, respectivamente), y este aumento en la expresión de *c-fos* involucra la participación de proteínas cinasas de serina y treonina como la PKC, y no de proteínas cinasas de tirosina.

De los experimentos en los cuales las células fueron pretratadas con toxina pertussis, se deduce que proteínas G (G_{i/o}) sensibles a la toxina no están participando en ninguna de las acciones producidas por la angiotensina II que fueron cuantificadas en este trabajo.

Finalmente, puede considerarse la línea celular C9 de origen hepático como un buen modelo para estudiar las acciones de la hormona angiotensina II, en contraste con los cultivos primarios de hepatocitos o bien con los hepatocitos aislados al perfundir el órgano.

PERSPECTIVAS

Al estudiar la manera en que una célula hepática transduce un mensaje extracelular para realizar una determinada función como la proliferación celular o la regulación del metabolismo hepático, resulta indispensable tratar de identificar los factores y mecanismos intracelulares que están involucrados en la transducción de señales extracelulares.

Dado que la angiotensina II actúa en diferentes órganos blanco (hígado, riñón, glándula suprarrenal) y está involucrada en distintas y muy variadas acciones regulatorias

CONCLUSION

En resumen, con los datos obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo se concluye que en la línea celular C9 (epitelial de hígado de rata) la angiotensina II estimula la producción de fosfatos de inositol y la liberación de calcio intracelular, vía receptores de la familia AT₁. De tal manera que los receptores para angiotensina II transducen la señal del octapéptido al acoplarse al sistema transduccional de recambio de fosfoinosítidos-liberación de calcio intracelular.

Por otra parte, tanto la angiotensina II como el éster de forbol, PMA, inducen un aumento en la expresión del ARNm del proto-oncogen *c-fos*, aunque con distinta magnitud (6 ± 0.87 y 3.1 ± 0.5 veces sobre el basal, respectivamente), y este aumento en la expresión de *c-fos* involucra la participación de proteínas cinasas de serina y treonina como la PKC, y no de proteínas cinasas de tirosina.

De los experimentos en los cuales las células fueron pretratadas con toxina pertussis, se deduce que proteínas G (G_{i/o}) sensibles a la toxina no están participando en ninguna de las acciones producidas por la angiotensina II que fueron cuantificadas en este trabajo.

Finalmente, puede considerarse la línea celular C9 de origen hepático como un buen modelo para estudiar las acciones de la hormona angiotensina II, en contraste con los cultivos primarios de hepatocitos o bien con los hepatocitos aislados al perfundir el órgano.

PERSPECTIVAS

Al estudiar la manera en que una célula hepática transduce un mensaje extracelular para realizar una determinada función como la proliferación celular o la regulación del metabolismo hepático, resulta indispensable tratar de identificar los factores y mecanismos intracelulares que están involucrados en la transducción de señales extracelulares.

Dado que la angiotensina II actúa en diferentes órganos blanco (hígado, riñón, glándula suprarrenal) y está involucrada en distintas y muy variadas acciones regulatorias

del sistema neuroendócrino, es necesario tener un modelo celular adecuado para estudiar los efectos de la angiotensina II y la manera en que éstos son producidos. Así, al haber caracterizado someramente uno de los mecanismos transduccionales al cual se acopla el receptor para angiotensina II en esta línea celular, se provee de herramientas para estudiar, por ejemplo, la comunicación cruzada que existe entre diferentes mecanismos transduccionales, o bien, otros aspectos interesantes como lo es la modulación del receptor para angiotensina; es decir, la desensibilización homóloga y heteróloga por fosforilación de algunos residuos localizados en el extremo carboxilo terminal del receptor.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tewksbury DA. 1990. Angiotensinogen: Biochemistry and Molecular Biology. In Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management, ed. JH Laragh, BM Brenner, 75:1197-216. NY:Raven.2360 pp.
- 2.- Jackson E. K. and Garrison J. C. 1996. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman, J. G.,Lombird, L. E, Molinoff, P. B., Ruddpm R. W. & Gilman, A. G., eds). 733-758 pp. McGrwa-Hill, New York.
- 3.- Phillips M. I. 1978. Angiotensin II in the brain. Neuroendocrinology. 25: 354-377.
- 4.- Takei Y., Hasegawa Y., Watanabe T. X., Nakajima K. and Hazon N. 1993. A novel angiotensin I isolated from an elasmobranch fish. J. Endocrinol. 139: 281-285.
- 5.- Peach M.J. 1977. Renin-Angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. Physiol. Rev. 57:313-370.
- 6.- Ferrario C.M.,Brosnihan K.B., Diz D.I., Jaiswal N., Khosla M.C., Milsted A., Tallant E.A. 1991. Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system. Hypertension. 18(5): III126-III133.
- 7.- Swanson G. N., Hanesworrrh J. M., Sardinia M. F., Coleman J. K., Wright J. W., Miller-Wing A. V., Stobb J. W., Cook V. L, Harding E. C. and Harding J. W. 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. Regul. Pept. 40: 409-419.
- 8.- Hall K. L., Hanesworth J. M., Ball A. E., Felgenhaner G. O., Hosick H. L. and Harding J. W. 1993. Identification and characterization of a novel angiotensin binding sites in a cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV. Regul. Pept. 44: 225-232.
- 9.- Roberts K. A., Krebs L. T., Kramár E. A., Shaffer M. J., Harding J. W. and Wright J. W. 1995. Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding site and differential c-fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats. Brain Res. 682: 13-21.

- 10.- García-Sáinz J. A. and Olivares-Reyes J. A. 1995. Glycyl-Histidyl-Lysine interacts with the angiotensin II AT₁ receptor. *Peptides*. 16 (7): 1203-1207.
- 11.- Peach M. J. 1979. Structural Features of angiotensin II which are important for biologic activity. *Kidney Intl*. 15: S3-S6
- 12.- Griendling K. Kathy, Lassegue Bernard and Wayne R. A. 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:281-306.
- 13.- Whitebread S; Mele M, Kamber B and de Gasparo M. 1989. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptors subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:284-291.
- 14.- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, et al, 1989. Identification of Angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:196-203.
- 15.- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de-Gasparo M, Goodfriend T, et al., 1991. Nomenclature for Angiotensin Receptors. *Hypertension* 17:720-721.
- 16.- Hahn AWA, Jonas J, Buehler FR, Resink TJ, 1993. Identification of a fourth angiotensin AT₁ receptor subtype in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:1260-65.
- 17.- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS; Bernstein KE. 1991. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 351:233-36.
- 18.- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, et al., 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351:230-33.
- 19.- Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H, et al., 1992. Cloning and characterization of a human angiotensin II type-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:989-95.

- 20.- Furuta H, Guo DF, Inagami T. 1992. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type I receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:8-13.
- 21.- Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, et al., 1992. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-I Angiotensin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:910-916.
- 22.- Burns KD, Inagami T, Harris RC. 1993. Cloning of a rabbit kidney cortex AT₁ angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. *Am. J. Physiol.* 264:1645-54.
- 23.- Itazaki K, Shigeri Y, Fujimoto M. 1993. Molecular cloning and characterization of the angiotensin subtype in porcine aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 245:147-56.
- 24.- Sandberg K. 1994. Structural analysis and regulation of angiotensin II receptors. *Trens. Endocrinol. Metab.* 5:28-35.
- 25.- Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, et al, 1992. Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:1067-73.
- 26.- Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. 1992. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT₁) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:253-59.
- 27.- Iwai N, Inagami T, 1992. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* 298:257-60.
- 28.- Kahar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD. 1992. Angiotensin II type-I receptor subtype cDNA's: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:1090-96.
- 29.- Sandberg K, Ji H, Clark AJL, Shapira H, Catt KJ. 1992. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 267:9455-58.
- 30.- Griendling KK, Lassegue B, Murphy TJ, Alexander RW. 1994. Angiotensin II receptor *Pharmacology. Adv. Pharmacol.* 28:269-306.

- 31.- Su B, Martin MM, Beason B, Miller PJ, Elton TS. 1994. The genomic organization and functional analysis of the promoter for the human angiotensin II type-I receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:1039-46.
- 32.- Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. 1994. The genomic organization of human angiotensin II type-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:313-19.
- 33.- Langford K, Frenzel K, Martin BM, Bernstein KE. 1992. The genomic organization of the rat AT1 angiotensin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:1025-32.
- 34.- Murasawa S, Matsubara H, Urakami M, Inada M. 1993. Regulatory elements that mediate expression of the gene for the angiotensin II type-1a receptor for the rat. *J. Biol. Chem.* 268:26996-7003.
- 35.- Kakar SS, Riel KK, Neill JD. 1992. Differential expression of Angiotensin II receptor subtype mRNA's in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:688-92.
- 36.- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K. 1992. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptors subtypes in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188:446-52.
- 37.- Paxton WG, Marrero MB, Klein JD, Delafontaine P, Berk BC, Bernstein KE. 1994. The angiotensin II AT1 receptor is tyrosine and serine phosphorylated and can serve as a substrate for the src family of tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:260-67.
- 38.- Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. 1994. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269:10935-39.
- 39.- Pfeilschifter J, Bauer C. 1986. Pertussis toxin abolishes angiotensin II-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin synthesis in rat renal mesangial cells. *Biochem. J.* 236:289-94.
- 40.- Douglas JG, Romero M, Hopfer U. 1990. Signalling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. *Kidney. Int. Suppl.* 30:543-547.

- 41.- Bhat G.J., Thekkumkara T.J., Thomas W.G., Conrad K.M. and Baker K.M. 1994. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT_{1A} receptor activates transcription factor Stat91 and/or a related protein. *J. Biol. Chem.* 265:31443-31449.
- 42.- Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. 1993. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 268:7338-45.
- 43.- Kambayashi Y., Takahashi K., Bardhan S., and Inagami T. 1994. Molecular structure and function of Angiotensin type 2 receptor. *Kidney Int.* 46:1502-1504.
- 44.- Kang J, Posner P, Summers C. 1992. Angiotensin-II type-1 (AT₁) and angiotensin II type-2 (AT₂) receptors mediated changes in potassium currents in cultured neurons:role of intracellular calcium. *FASEB J.* 6:1012 (Abstr)
- 45.- Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, Guo D.F, Inagami T. 1992. Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1426-31.
- 46.- Hjorth SA, Schambye HT, Greenlee WJ, Schwartz TW. 1994. Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT₁ receptor. *J. Biol. Chem.* 269:30953-30959.
- 47.- Ji H, Sandberg K, Zhang Y, Catt KJ. 1993. Molecular cloning sequencing and functional expression of an amphibian angiotensin II receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131:75-86.
- 48.- Ohyama K, Yamano Y, Chaki S, Kondo T, Inagami T. 1992. Domains for G-protein coupling in Angiotensin II receptor type-1: studies by site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:677-83.
- 49.- Thomas W.G, Thekkumkara TJ, Motel TJ, Baker KM. 1995. Stable expression of a truncated AT_{1A} receptor in CHO-K1 cells. *J. Biol. Chem.* 270:207-13.

- 50.- Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ. 1994. Identification of a cytoplasmic ser-thr-leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT₁ angiotensin receptor. *J. Biol. Chem.* 269:31378-82.
- 51.- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H. 1993. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* 268:24543-46.
- 52.- de Gasparo M., Husain A., Alexander W., Catt K.J., Chiu A.T., et al. 1995. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension.* 25:924-27.
- 53.- Chang RS, Lotti VJ. 1990. Two distinct angiotensin II receptor binding sites in rat adrenal revealed by new selective nonpeptide ligands. *Mol. Pharmacol.* 37:347-51.
- 54.- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. 1993. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* 268:24539-42.
- 55.- Ichiki T, Inagami T. 1995. Expression, genomic organization and transcription of the mouse angiotensin II type 2-receptor gene. *Circ. Res.* 76:693-700.
- 56.- Ichiki T, Inagami T. 1995. Transcriptional regulation of the mouse angiotensin II type 2-receptor gene. *Hypertension.* 25:720-25.
- 57.- Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. 1994. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:1842-50.
- 58.- Tsutsumi K, Saavedra JM. 1991. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am. J. Physiol.* 261:R209-16.
- 59.- Gradi EF, Sechi LA, Griffin CA, Scambelan M, Kalinyak JE. 1991. Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.* 88:921-33.
- 60.- Feuillan PP, Millan MA, Aguilera G. 1993. Angiotensin II binding sites in the rat fetus: characterization of receptor subtypes and interaction with guanyl nucleotides. *Regul. Pept.* 44:159-69.

- 61.- Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM, Saavedra JM. 1991. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:1361-67.
- 62.- Sumners C, Myers LM. 1991. Angiotensin II decreases cGMP levels in neuronal cultures from rat brain. *Am. J. Physiol.* 260:C79-C87.
- 63.- Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, deGasparo M. 1992. The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:206-11.
- 64.- Chaki S, Inagami T. 1992. Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:388-94.
- 65.- Chaki S, Inagami T. 1993. New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Mol. Pharmacol.* 43:603-8.
- 66.- Jarvis MF, Gessner GW. 1994. Dithiothreitol, sodium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid increase the binding affinity of [¹²⁵I] angiotensin IV to AT₄ receptors in bovine adrenal cortex. *Peptides.* 15:1037-44.
- 67.- Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT. 1994. AT₄ receptors : specificity and distribution. *Kidney Int.* 46:1510-12.
- 68.- Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW. 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul. Pept.* 40:409-19.
- 69.- Huebner R.J. and Todaro G.J. 1969. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64:1087-1094.
- 70.- Hesketh R. 1994. The oncogene handbook. Harcourt Brace. Academ. Press. INC. San Diego, CA 9201, U. S. A. 178-199 pp.

**ESTA TESIS
SALIR DE LA
NO DEBE
BIBLIOTECA**

- 71.- Hunter,T. and Karin M. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*. 70:375-387.
- 72.- Perkins K.K., Admon A., Patel N and Tjian R. 1990. The *Drosophila fos*-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes. Devel.* 4:822-834.
- 73.- Muller R., Bravo R., Burckhardt J and Curren T. 1984a. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*. 312:716-720.
- 74.- Muller R., Muller D., and Guilbert L. 1984b. Differential expression of *c-fos* in hematopoietic cells: correlation with differentiation of monomyelocytic cells in vitro. *EMBO J.* 3:1887-1890.
- 75.- Muller R.,Curran T.,Muller D. and Guilbert L. 1985. Induction of *c-fos* during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature*. 314:546-548.
- 76.- Sariban E., Mitchell T. and Kufe D. 1985. Expression of the *c-fms* proto-oncogene during human monocytic differentiation. *Nature*. 316:64-66.
- 77.- Zerial M., Toschi L., Ryseck R.P.,Schuermann M., Muller R. and Bravo R. 1989. The product of a novel growth factor activated gene, *fosB*, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* 8:805-813.
- 78.- Cohen D.R. and Curran T. 1988. *fra-1*: a serum inducible, cellular immediate-early gene that encodes a *fos*-related antigen. *Mol. Cell. Biol.* 8:2063-2069.
- 79.- Holt J.T., Gopal V., Moulton A.D., and Nienhuis A.W. 1986. Inducible production of *c-fos* antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4794-4798.
- 80.- Nishikura K. and Murray J.M. 1987. Antisense RNA of proto-oncogene *c-fos* blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:639-649.
- 81.- Riabowol K.T., Vosatka R.J., Ziff E.B., Lamb N.J. and Feramisco J.R. 1988. Microinjection of *fos*-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol. Cell. Biol.* 8:1670-1676.

- 82.- Kovary K and Bravo R. 1991. The *jun* and *fos* protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 11:4466-4472.
- 83.- Moore J.P., Todd J.A., Hesketh T.R. and Metcalfe J.C. 1986. *c-fos* and *c-myc* gene activation, ionic signals and DNA synthesis in thymocytes. *J. Biol. Chem.* 261:8158-8162.
- 84.- Moore J.P., Menzel G.E., Hesketh T.R. and Metcalfe J.C. 1988. *c-fos* gene activation in murine thymocytes by a mechanism independent of protein kinase C or a calcium signal. *FEBS Letts.* 233:64-68.
- 85.- McBride K., Robitaille L., Tremblay S., Argentin S and Nemer M. 1993. *fos/jun* repression of cardiac-specific transcription in quiescent and growth-stimulated myocytes is targeted at a tissue-specific *cis* element. *Mol. Cell. Biol.* 13:600-612.
- 86.- Barhoumi R, Mouneimne Y, Phillips TD, Safe SH and Burghardt RC. 1996. Alteration of oxytocin-induced calcium oscillations in clone 9 cells by toxin exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* 33 (2):220-8.
- 87.- Kozlowski MR, Arcuri M and Zynardi L. 1993. Comparison of the binding and functional actions of angiotensin agonists in clone 9 cells: additional evidence for angiotensin II receptor heterogeneity. *J. Recept. Res.* 13 (7): 1031-1040.
- 88.- González-Espinosa C. and García-Sáinz J.A. 1996. Hormonal modulation of *c-fos* expression in isolated hepatocytes. Effects of angiotensin II and phorbol myristate acetate on transcription and mRNA degradation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1310:217-222.
- 89.- Gryniewicz G., Poenie M., and Tsien R.Y. 1985. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
- 90.- Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- 91.- García-Sáinz J.A., Huerta-Bahena M.E. and Malbon C.C. 1989. *AM. J. Physiol.* 256, C384-C389.
- 92.- García-Sáinz J.A. and Macías-Silva M. 1990. Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (2):780-785.

- 93.- Bouscarel B, Augert B, Taylor SJ and Exton JH. 1990. Alterations in vasopressin and angiotensin II receptors and responses during cell culture of rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1055: 265-272.
- 94.- García-Sáinz JA and Macías-Silva M. 1990. Angiotensin II stimulates phosphoinositides turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 780-785.
- 95.- Bauer HP, Chiu AT and Garrison JC. 1991. DUP753 can antagonize the effects of angiotensin II in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 39: 579-585.
- 96.- González-Espinosa C. and García-Sáinz J.A. 1995. Protein kinases and phosphatases modulate *c-fos* expression in rat hepatocytes. Effects of angiotensin II and phorbol myristate acetate. *Life Sciences.* 56 (10):723-728.
- 97.- Etienne P.L., Baffet G., Desvergne B., Boissard-Rissel M., Glaise D. and Guguen-Guillouzo C. 1988. *Oncogene Res.* 3:255-262.
- 98.- González-Espinosa C and García-Sáinz JA. 1992. Angiotensin II and active phorbol esters induce protooncogene expression in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1136: 309-314.
- 99.- Klett C., Muller F., Gierschik P., and Hackenthal E. 1990. Angiotensin II stimulates angiotensinogen synthesis in hepatocytes by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *FEBS Lett.* 259:301-304.
- 100.- Klett C., Nobiling R., Gierschik P., and Hackenthal E. 1993. Angiotensin II stimulates the synthesis of angiotensinogen in hepatocytes by inhibiting adenylyl cyclase activity and stabilizing angiotensin mRNA. *J. Biol. Chem.* 268:25095-25107.
- 101.- Huckle WR, Prokop CA, Sy RC, Herman B and Earp S. 1990. Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6290-6298.
- 102.- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerd L, Berk BC, Delafontaine P and Berstein KE. 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature.* 375: 247-250.

103.- Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM and Dy R. 1995. Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells. Separation of the major calcium-regulated tyrosine kinase from p125 FAK. *J. Biol. Chem.* 270 (47):28440-28447.