

Efecto de la angiotensina I en el transporte de sodio y de agua

Ayud. Cát. ADRIANA I. SALAZAR, Ayud. Cát. JOSE A. ALLEMAND, Ayud. Cát. DIEGO SALAS, JUAN C. PERSEGUINO, Lic. MARIA C. PROTTO, Lic. CLAUDIA E. I. ALONSO, Bioq. SILVIA S. GAMUNDI, Bioq. GRACIELA A. CASTILLO, GABRIEL G. F. ORCE, ALFREDO COVIELLO*

Departamento de Fisiología, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Universidad Nacional de Tucumán (UNT) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Dirección para separatas: Casilla de Correo 38, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina

* Para optar a Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

La angiotensina I humana (AT_I) aumenta significativamente la corriente de cortocircuito (CCC) y la permeabilidad osmótica (P_{osm}) en piel aislada de sapo en concentraciones altas (10^{-6} a $10^{-5}M$) cuando es agregada al lado dérmico de la piel. Los efectos sobre la CCC son variables mientras que los efectos sobre la P_{osm} tienen mejor reproducibilidad. En el riñón aislado del sapo la AT_I ($0,4 \cdot 10^{-8}M$) perfundida por la vena porta renal aumenta en forma variable la reabsorción de Na^+ y de H_2O y disminuye la filtración glomerular. Los efectos en piel de sapo no pudieron ser bloqueados con SQ 20881 (10^{-6} y $5 \cdot 10^{-5}M$) y los efectos en riñón tampoco con SQ 14225 ($2,2 \cdot 10^{-3}M$), inhibidor que careció de efectos sobre la función renal. La bilirrubina no conjugada, que tiene efecto inhibitor sobre la enzima de conversión en concentraciones elevadas ($3 \cdot 10^{-4}M$), tampoco modificó la respuesta de la P_{osm} a la AT_I ; en cambio, un bloqueador competitivo de la angiotensina II, la 8-Leu-angiotensina II, fue efectivo. Los presentes resultados sugieren una acción directa de la AT_I sobre los mecanismos de transporte de sodio y de agua y su acción vascular glomerular, y apoyan la hipótesis de la existencia de un receptor común a ambas angiotensinas en los epitelios de transporte de anfibios.

La angiotensina I (AT_I) produce en los tejidos efectos que han sido atribuidos a la existencia en los mismos de la enzima de conversión, generadora de la angiotensina II (AT_{II}).¹ Recientemente, el uso de inhibidores de la enzima de conversión ha permitido atribuir a la AT_I funciones propias y diferentes de las reconocidas para la AT_{II} .^{2,3} La AT_{II} , por otra parte, participaría en la regulación de la reabsorción de sodio y de agua mediante efectos tubulares directos, punto de vista que se

apoya en experiencias realizadas en nuestro laboratorio en tejidos de anfibios.^{4,5} Estos efectos podrían explicar resultados obtenidos en otros sistemas, entre ellos el riñón del perro, mediante el uso de inhibidores de la enzima de conversión, tanto para la reabsorción de sodio como para la de agua.^{6,7}

Por estas razones consideramos que era interesante estudiar los posibles efectos de la AT_I en modelos de transporte de sodio y de agua como el riñón aislado y la piel de los sapos *Bufo arenarum* *chaguar* y *platensis*,⁸ en los que la AT_{II} produce efectos natriféricos e hidrosmóticos.⁹⁻¹¹

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron sapos *Bufo arenarum* (exclusivamente machos para los experimentos en riñón) que fueron inmovilizados por destrucción encefalomedular, procediéndose luego de la siguiente manera.

Medición de la reabsorción de sodio y de agua en riñón aislado

Los detalles de esta técnica han sido previamente descritos y consisten en perfundir Ringer con insulina o creatinina por un catéter implantado en la aorta y a través de la vena porta renal de cada riñón (uno es usado como control, por el otro se perfunde la AT_I).^{9,12} La filtración glomerular (FM) se calcula a partir de la insulina o creatinina y la reabsorción de sodio y de agua en porcentaje de la cantidad filtrada. El sodio es medido por fotometría de llama y el volumen de orina por pesada. El diseño experimental permite usar un doble control: después de un primer período de 20 minutos se procede a perfundir en uno de los riñones (E) AT_I , quedando el otro riñón como control. Después de un período de 20 minutos de recuperación se procede a realizar un segundo período experimental en presencia de un inhibidor, usando

el riñón no perfundido previamente con AT_1 para evitar posibles fenómenos de taquifilaxia. La diferencia entre el período experimental y el control del mismo riñón se compara con la diferencia obtenida en los mismos períodos del riñón que ha quedado de control usando una prueba de "t" para muestras apareadas.

Medición del transporte activo de sodio

El transporte activo de sodio es medido a partir del llamado método de la corriente de cortocircuito (CCC) de Ussing y Zerahn.¹³ La técnica consiste en montar la piel alisada como diafragma entre dos cámaras de acrílico bañadas por 3 ó 5 ml de Ringer en el que se hace burbujear aire.

El transporte de sodio origina una diferencia de potencial que se mide en milivoltios (mV) y una corriente (CCC) que se mide en $\mu A \cdot cm^{-2}$ mediante un aparato automático de 8 canales conectado al baño de Ringer de cada cámara por puentes de agar-Ringer y electrodos de calomel.¹⁴

El diseño experimental permite la aplicación de la prueba de "t" para muestras apareadas usándose tres trozos de piel abdominal inferior, uno que permanece como control durante todo el experimento, otro en el cual se agrega la AT_1 y un tercero al cual se agrega un agente inhibidor antes del agregado del péptido. En todos los casos los agentes son añadidos en un pequeño volumen al lado dérmico de la preparación.

Con ciertas reservas, derivadas de la observación realizada en nuestro laboratorio sobre la existencia de transporte de Cl^- en determinadas épocas del año, puede aceptarse que la CCC es un exponente del transporte activo de sodio en la piel aislada del sapo.¹⁵

Debido a que las pieles, aun proviniendo del mismo animal, pueden presentar diferencias en la CCC, los valores son expresados en cocientes referidos a la primera lectura control de cada piel (CCC_t/CCC_0).

Medición de la permeabilidad osmótica (P_{osm})

Este método, muy usado, consiste en montar la piel ventral del sapo como diafragma en un tubo, colocándose luego Ringer diluido en el interior (superficie epidérmica) y Ringer isotónico en el exterior (superficie dérmica).¹⁶ El agua pasa al exterior y la pérdida de peso es medida en una balanza (0,1 mg) en períodos de 20 minutos. Luego de un período de equilibración se procede a realizar mediciones control que preceden al período experimental en el cual se agrega el agente al baño dérmico. Como en el caso de la CCC se obtienen tres trozos de piel abdominal inferior, usán-

dose una de ellas como control durante todo el experimento y las otras dos (mitades pélvicas simétricas) para probar la AT_1 en presencia o ausencia de inhibidor elegido.

Los resultados son expresados en $mg/cm^{-2}/h^{-1}$. Como en los métodos anteriores, se aplica una prueba de "t" para muestras apareadas.

Ringer y drogas

La solución de Ringer para riñón fue similar a la de Whittembury y Fishman,¹⁷ mientras que para piel aislada se usó un Ringer descrito en un trabajo previo.²²

Se usó angiotensina I humana, bilirrubina no conjugada y taurocolato de sodio adquiridos en Sigma Chemical Co. (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), SQ 14225 y SQ 20881, generosamente donados por los Dres. M. J. Antonaccio y Z. P. Horovitz, de The Squibb Institute for Medical Research (Princeton, New Jersey, Estados Unidos). La angiotensina II usada (corresponde a la existente en el pez ganso japonés) fue donación de los Dres. M. F. Bumpus y M. C. Khosla, de la Cleveland Clinic, Cleveland, Estados Unidos.²² El inhibidor competitivo de angiotensina II usado (8-Leu-angiotensina II) fue donación del Dr. A. C. Paiva, Escola Paulista de Medicina, San Pablo, Brasil.

Los inhibidores de la enzima de conversión fueron guardados desecados a $0-4^\circ C$ y disueltos en Ringer momentos antes de ser usados.

RESULTADOS

Experimentos en riñón aislado

La Fig. 1 muestra que el inhibidor de la enzima de conversión (SQ 14225) no posee efectos sobre la FG, la reabsorción de Na^+ o la de H_2O cuando es perfundido durante 20 minutos por la vena porta renal. Es interesante hacer notar que este compuesto posee efectos inhibidores sobre la CCC en piel aislada de sapo.¹⁸

La AT_1 en concentraciones de $0,4/10^{-8} M$ en el frasco de perfusión portal (Fig. 2) produjo disminución de la FG y aumentos variables de la reabsorción de Na^+ y la H_2O , que no fueron inhibidos después de perfundir el riñón durante 20 minutos con el SQ 14225.

Experimentos en piel aislada

a) CCC

La Fig. 3 muestra que la AT_1 ($10^{-5} M$, lado dérmico) produjo un aumento significativo de la CCC en experimentos realizados en el verano. El SQ 20881 $10^{-6} M$ no tiene efectos sobre la CCC o la P_{osm} en piel aislada de sapo.¹⁸

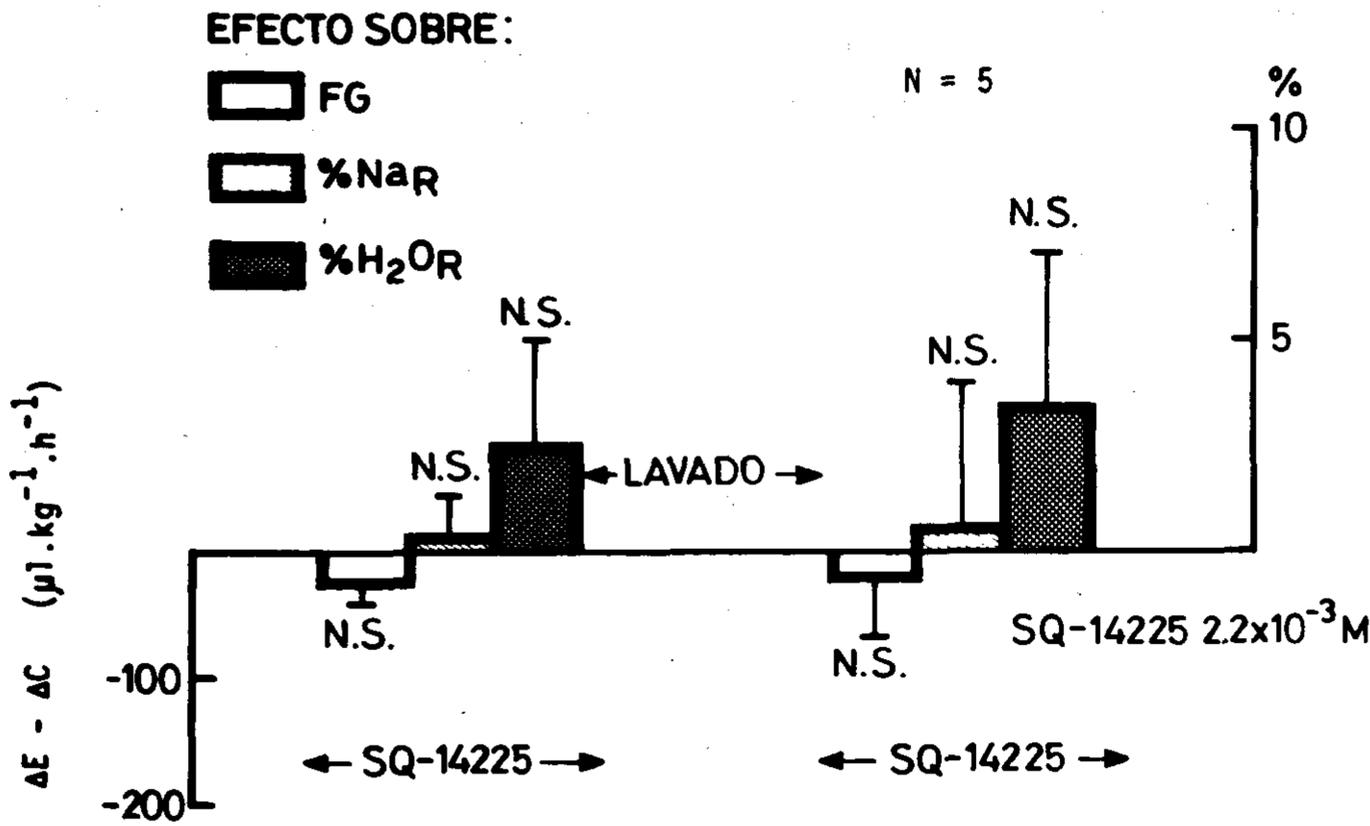


Fig. 1. Ausencia de efectos del SQ 14225 ($2,2/10^{-3}$ M) perfundido por la vena porta del riñón aislado del sapo *Bufo arena-rum*. $\Delta E - \Delta C$ es la diferencia entre la variación del parámetro en estudio observada durante el período en que un riñón recibe un tratamiento experimental dado, y el valor de ese parámetro en el mismo riñón en el período inmediatamente previo al tratamiento, y la variación observada entre los mismos períodos en el otro riñón, usado como control.

Este inhibidor de la enzima de conversión, al ser agregado previamente a una mitad apareada de piel, no consiguió inhibir el efecto de la AT_I.

En experimentos realizados en otoño, con el objeto de verificar posibles variaciones estacionales, el SQ 10881 (10^{-6} M) no produjo cambios en la CCC basal (control $20,6 \pm 5,6 \mu A/cm^{-2}$ con respecto a la mitad experimental $22,0 \pm 3,5$) mientras que la AT_I produjo un aumento del 23,9% en la mitad tratada con el inhibidor ($5,1 \pm 1,3 \mu A/cm^{-2}$,

$p < 0,01$) y del 18,5% en la no tratada ($4,1 \pm 0,9$, $p < 0,01$). La diferencia entre ambos efectos no fue significativa ($1,0 \pm 1,0$) en siete experimentos apareados.

Es interesante destacar que el SQ 20881, aun en concentraciones muy elevadas (10^{-3} M), careció de efectos sobre la CCC, y que la AT_I agregada a la piel del sapo previamente sometido a tratamientos salinos no produjo respuestas en concentraciones elevadas (10^{-5} M). En ningún caso la

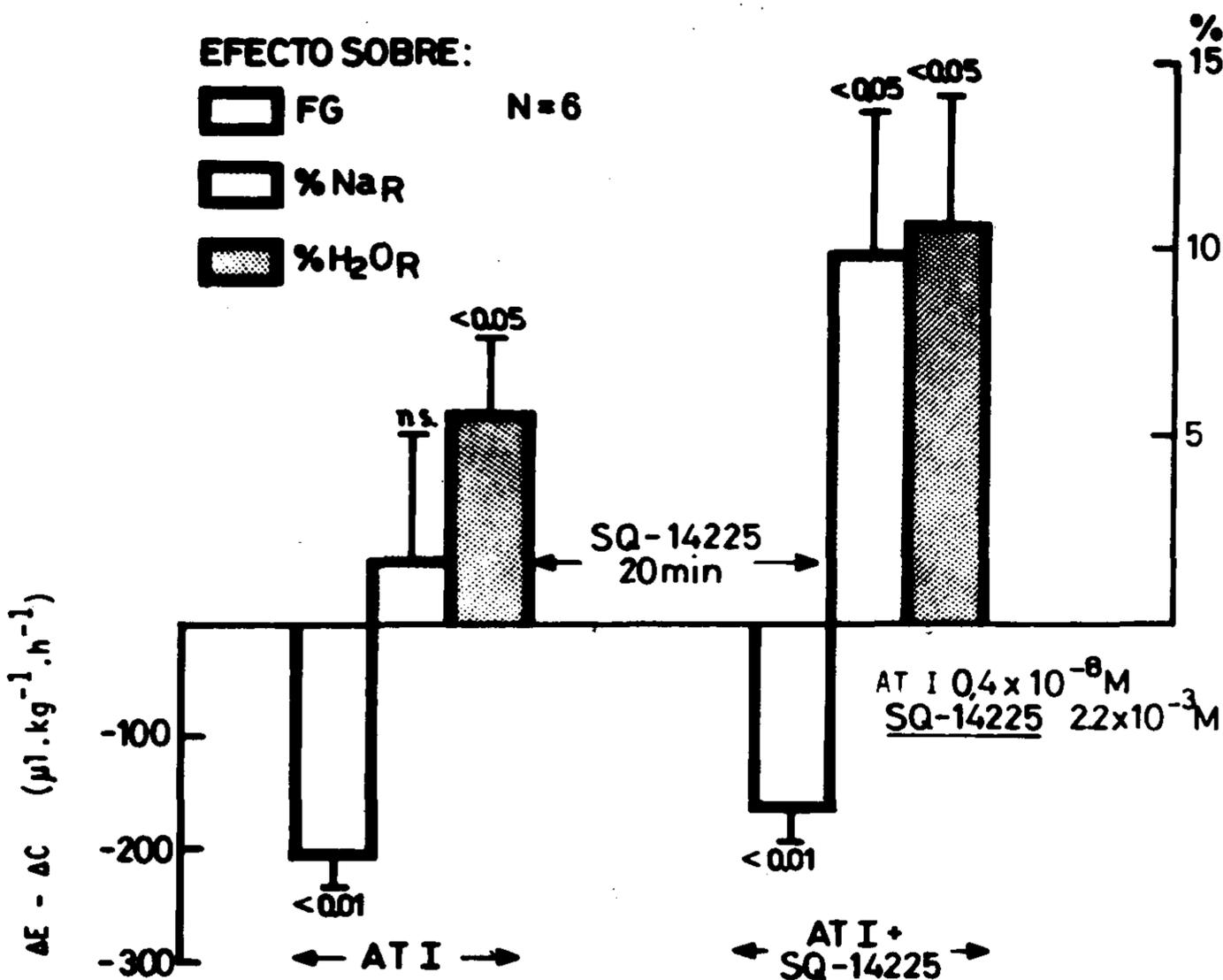


Fig. 2. Experimento similar al anterior pero perfundiendo AT_I ($0,4/10^{-8}$ M). Luego de 20 minutos de recuperación en los cuales se perfunde SQ 14225, se repite la administración de AT_I en el riñón opuesto. La significación de los efectos sobre FG, % Na⁺ y de H₂O están expresados en el gráfico.

AT_I fue efectiva al ser agregada al lado epidérmico de la preparación.

b) P_{osm}

La Fig. 4 muestra un experimento de medición de la P_{osm} en piel aislada de sapo realizado durante el otoño. El efecto de la AT_I (5/10⁻⁶ M) no fue inhibido por el SQ 20881 agregado, en la misma concentración, 20 minutos antes. Después de lavar la preparación se realizaron mediciones para verificar la recuperación de las basales y se agregó SQ 20881 a la mitad que no lo había recibido. A continuación se estimuló ambas mitades con AT_{II} (5/10⁻⁶ M), produciéndose un aumento significativo de la P_{osm} en ambas pieles, sin diferencia significativa entre ambas respuestas. En una serie de experimentos realizados en verano se encontró inhibición de la respuesta a la AT_I usando SQ 20881, pero estos resultados no fueron luego reproducidos ni aun en la misma época del año.

La bilirrubina no conjugada (BNC) inhibe la enzima de conversión en el plasma de los ictericos.¹⁹ Por esta razón se decidió probar su posible acción sobre la respuesta a la AT_I usando como agente solubilizador el taurocolato de sodio (TcNa), 2/10⁻³ M, que fue agregado a la membrana control. La Fig. 5 muestra que la BNC (3/10⁻⁴ M) no inhibe la respuesta a la AT_I (10⁻⁶ M), produciendo una ligera potenciación sin significación estadística.

Los efectos de la AT_{II} en piel de sapo son bloqueados por el inhibidor competitivo 8-Leu-angiotensina II (8-Leu-AT_{II}).²⁰ La Fig. 6 muestra la

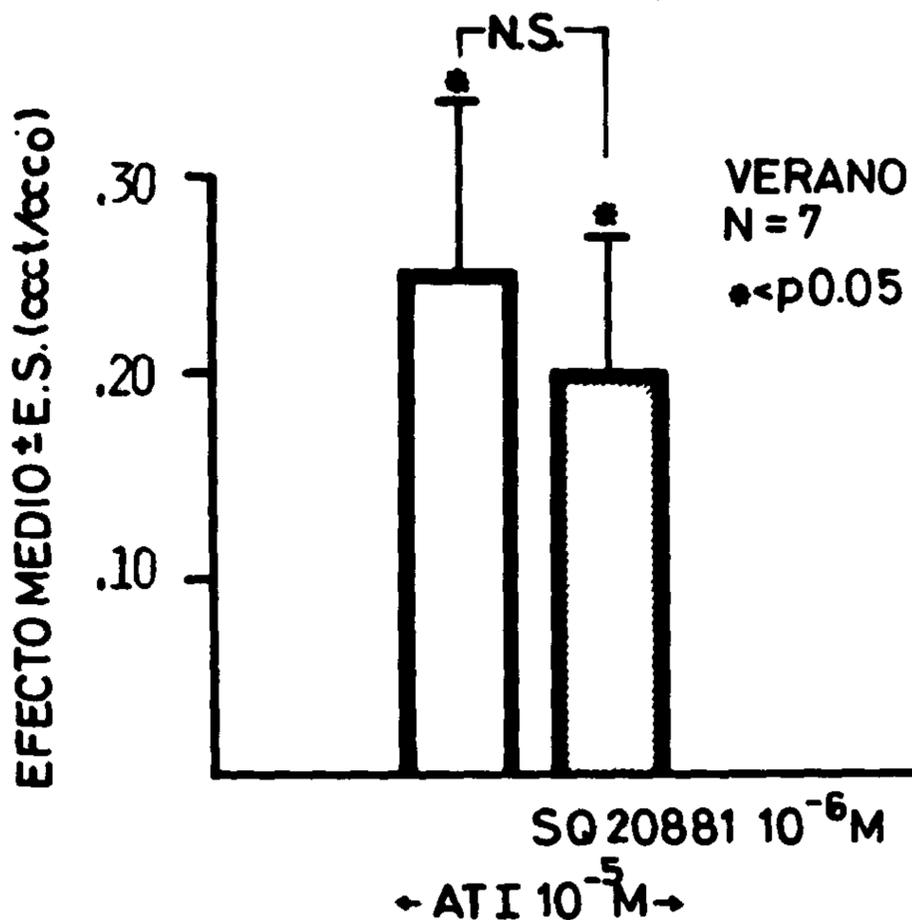


Fig. 3. Efecto de la AT_I en concentración de 10⁻⁵ M sobre la CCC en piel aislada de sapo *Bufo arenarum*. La mitad apareada, que recibió 40 minutos antes SQ 20881 (10⁻⁶ M) reacciona también a la AT_I, no existiendo diferencias significativas en la respuesta.

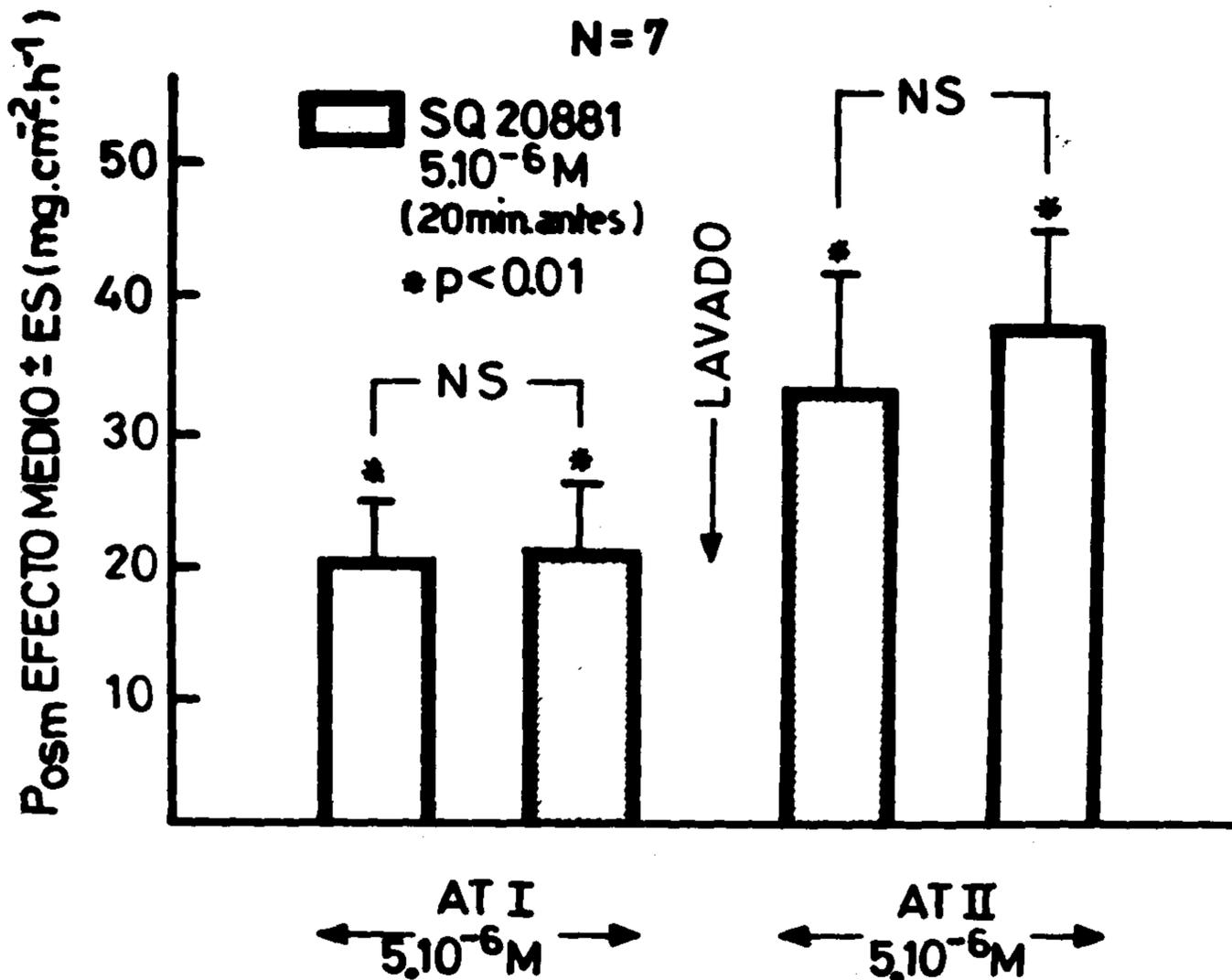


Fig. 4. Efecto de la AT_I (5/10⁻⁶ M) sobre P_{osm} y ausencia de inhibición del efecto por acción del SQ 20881 (5/10⁻⁶ M) en la mitad apareada. Después de un lavado y recuperación se probó en concentraciones similares la respuesta a la AT_{II} sin modificación de su efecto por el SQ 20881.

acción inhibitoria de ese compuesto sobre la respuesta a la AT_I .

DISCUSION

Los experimentos descriptos muestran que la AT_I tiene efectos estimulantes sobre la CCC y la P_{osm} en piel aislada del sapo, tejido con propiedades funcionales similares a las del nefrón distal de los mamíferos.²¹ Estos efectos son obtenidos en concentraciones relativamente elevadas, como sucede con otras angiotensinas en este tejido.²²

En el riñón aislado, la AT_I produce una reducción significativa de la FG, hecho que revela que la perfusión portal (realizada a una presión hidrostática de 10 cm en contra de los 25 cm de la aórtica) de alguna manera llega a los vasos glomerulares. Los efectos de la AT_I sobre la reabsorción de Na^+ o de H_2O son variables pero no son inhibidos, al igual que la FG, por la perfusión previa del inhibidor de la enzima de conversión, el SQ 14225, sugiriendo una acción directa y no mediada por la conversión a AT_{II} . Este agente, como ha sido señalado, produce efectos sobre el transporte de Na^+ en piel de sapo, pero en las concentraciones usadas no afectó la función del riñón aislado. Halvorsen y colaboradores demostraron que la AT_I produce efectos vasoconstrictores similares a los de la AT_{II} en el tren posterior del sapo.²³

La AT_I aumentó, también en forma variable, la CCC en la piel aislada del sapo, no pudiéndose inhi-

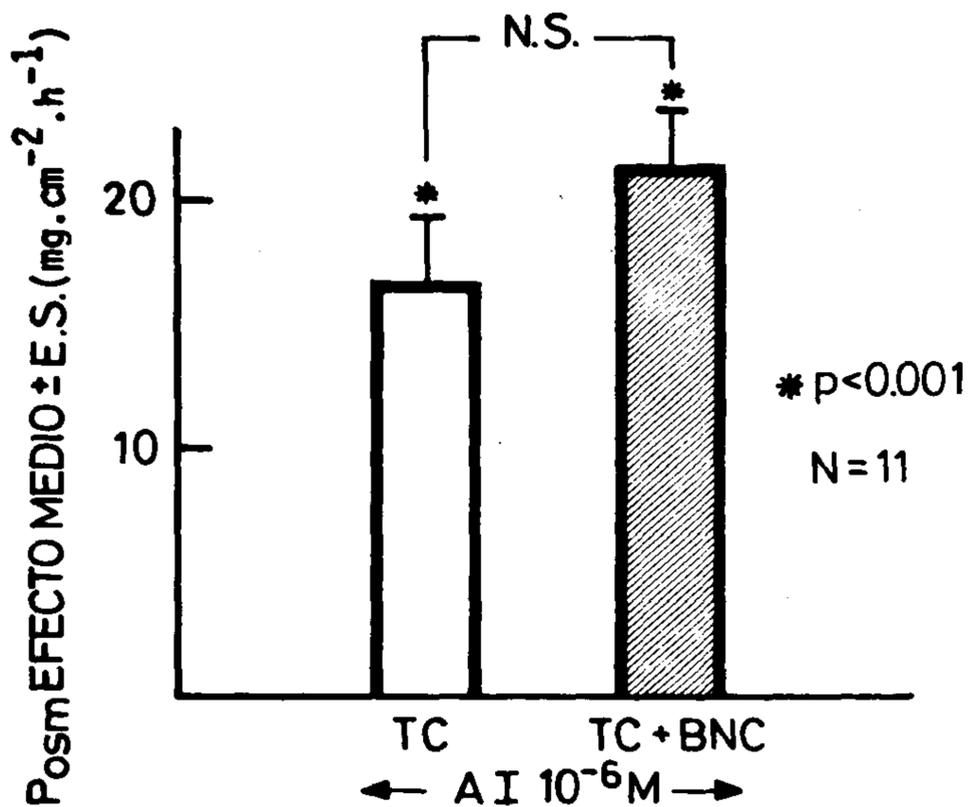


Fig. 5. Efecto de la AT_I (10^{-6} M) sobre la P_{osm} en piel aislada de sapo *Bufo arenarum*. La mitad apareada fue previamente tratada con bilirrubina no conjugada (BNC) durante 40 minutos, maniobra que no impidió la respuesta a la AT_I . Para solubilizar la bilirrubina se agergó taurocolato de sodio (Tc) a la mitad control.

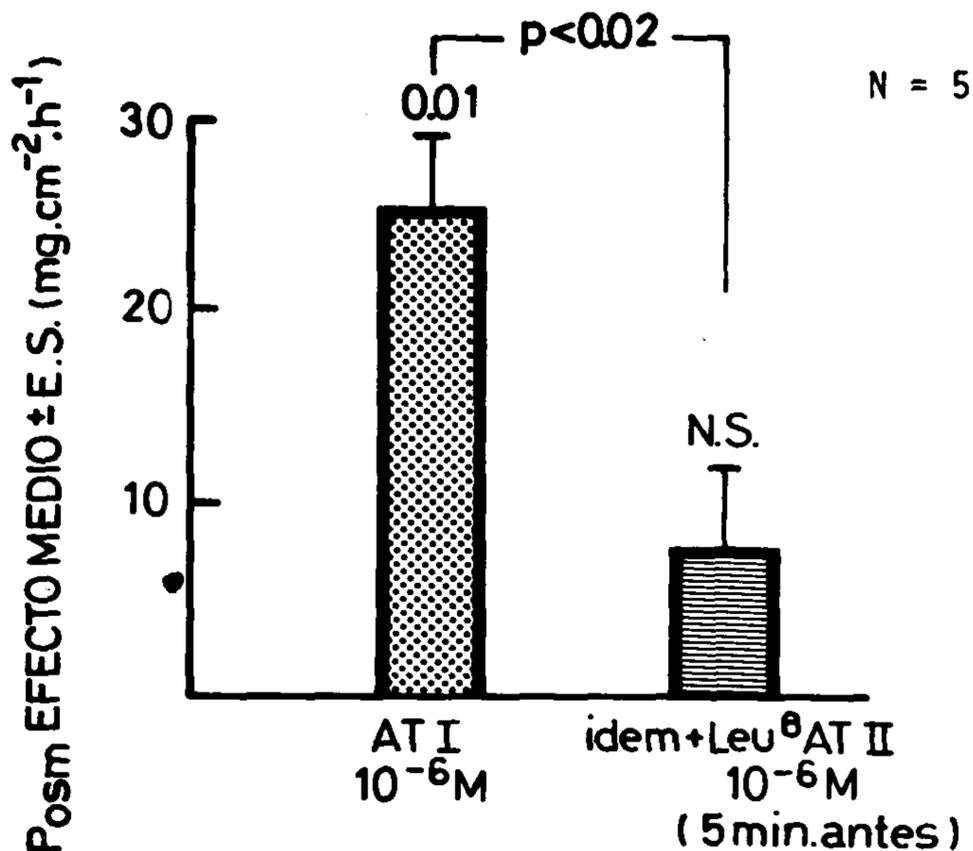


Fig. 6. Acción bloqueadora del inhibidor competitivo de la angiotensina II (8-Leu-angiotensina II) sobre la respuesta hidrosmótica de la angiotensina I en la piel aislada del sapo *Bufo arenarum*.

bir esta respuesta mediante el inhibidor de la enzima de conversión SQ 20881, que carece de efectos *per se* sobre esta preparación.¹⁸

El inhibidor tampoco fue capaz de bloquear la respuesta de la piel del sapo (P_{osm}) a la AT_I . El efecto hidrosmótico de la AT_I tampoco pudo ser bloqueado por otros agentes como la BNC.

El efecto hidrosmótico de la AT_{II} no fue afectado por el SQ 20881. En experimentos previos se encontró que el inhibidor competitivo de la AT_{II} (8-Leu- AT_{II}) es capaz de bloquear los efectos natriféricos e hidrosmóticos de la AT_{II} en piel de sapo.²⁰ Esta acción inhibitoria es también eficaz para bloquear la respuesta hidrosmótica de la AT_I .

Si bien los efectos del SQ 20881 sobre la enzima de conversión deben ser confirmados mediante la medición *in vitro* de la actividad de la enzima, los presentes resultados sugieren que la AT_I produce efectos directos sobre el transporte de Na^+ y de H_2O en piel de sapo y que el receptor que media estos efectos puede ser el mismo que el de la AT_{II} , ya que ambos son bloqueados por el mismo antagonista.

La posibilidad de que la AT_I sea capaz de estimular directamente el transporte activo de Na^+ o de modificar la permeabilidad al H_2O en un tejido con propiedades similares a las del nefrón distal de los mamíferos, abre interesantes perspectivas de especulación sobre mecanismos de regulación intrarrenal de estos parámetros o de la hemodinamia renal.²⁴

Abe y colaboradores²⁵ señalaron que la conversión de AT_I en AT_{II} en la circulación renal es pequeña y que los efectos del sistema renina-angiotensina en el control de la hemodinamia renal no serían mediados a través de la AT_{II}.

Nuevos experimentos en preparaciones de mamíferos deben ser realizados para confirmar estas hipótesis.

SUMMARY

Human angiotensin I (AT_I) in high concentrations (10^{-6} to 10^{-5} M) significantly increased short-circuit current (SCC) and osmotic water permeability (P_{osm}) when added to the dermal side of isolated toad skin. The effects on SCC were variable whereas the P_{osm} response was more reproducible. AT_I ($0.4/10^{-8}$ M) perfused through the renal portal vein increased in variable manner Na⁺ and H₂O reabsorption and decreased glomerular filtration in the isolated toad kidney. The effects in toad skin could not be blocked with the converting enzyme inhibitor SQ 20881 (10^{-6} and $5/10^{-6}$ M) nor was SQ 14225 ($2.2/10^{-3}$ M) able to block the effects of AT_I in the toad skin. The latter inhibitor was devoid of any effects on renal function. Another inhibitor of converting enzyme—non conjugated bilirubin—in high concentration ($3/10^{-4}$ M), was also ineffective in blocking the effects of AT_I on P_{osm} in toad skin. The effects of human angiotensin I and of teleost angiotensin II on P_{osm} were blocked by the competitive inhibitor 8-Leu-angiotensin II. The present data support the view that AT_I has a direct action on SCC and P_{osm} in isolated toad skin, and directly increases Na⁺ and H₂O reabsorption, and decreases glomerular filtration, in the isolated toad kidney. The data also support the notion that the effects of either angiotensin are mediated through the same receptor in amphibian transport epithelia.

AGRADECIMIENTO

El trabajo fue realizado con fondos provenientes del CONICET, SUBCYT y de la Fundación Banco Empresario de Tucumán. Los autores agradecen la eficaz colaboración de la Sra. María Mercedes López de Rivas.

BIBLIOGRAFIA

- Vane JR: The fate of angiotensin I. In Page IH, Bumpus FM (eds): Angiotensin, p 17. Springer-Verlag, Berlin-New York, 1974.
- Goodfriend ThL, Peach MJ: Specific functions of angiotensin I, II and III. In Genest J, Koiw E, Kuchel O (eds): Hypertension, p 168. Mc Graw Hill Co, New York, 1977.
- Chaud M, Viggiano M, Gimeno MF, Gimeno AL: Efecto de indometacina sobre curvas dosis-respuestas para angiotensina I y II en el útero aislado de ratas ovariectomizadas. Resumen presentado en la XV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental, 1983.
- Coviello A: Efecto de la angiotensina II en el metabolismo del sodio y del agua en los anfibios. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Tucumán, 1972.
- Coviello A: Efecto de la angiotensina II en dosis no-presoras en la función renal. *Rev Fac Med de Tucumán* 12: 25, 1979.
- Kimbrough HM, Vaughan ED, Carey RM, Ayers CR: Effect of intrarenal angiotensin II blockade on renal function in conscious dogs. *Circ Res* 40: 174, 1977.
- Levens NR, Peach MJ, Vaughan ED, Carey RM: Demonstration of a primary antidiuretic action of angiotensin II: effects of intrarenal converting enzyme inhibition in the conscious dog. *Endocrinology* 108: 318, 1981.
- Gallardo JM: Una nueva subespecie chaqueña *Bufo arenarum chaguar*. *Neotrópica* 11: 84, 1965.
- Coviello A: Tubular effect of angiotensin II on the toad kidney. *Acta Physiol Lat Am* 19: 73, 1969.
- Coviello A, Elso G, Fernández FM: Effect of angiotensin II on short-circuit current in amphibian membranes. *Biochem Pharmacol* 25: 106, 1976.
- Coviello A, Brauckmann ES: Hydrosmotic effect of angiotensin II: Isolated toad skin. *Acta Physiol Lat Am* 23: 18, 1973.
- Coviello A, Biondi AC, Perseghino JC: Sodium transport in vitro: the effects of angiotensin II. In Villarreal H (ed): Hypertension, p 69. John Wiley & Sons, New York, 1981.
- Ussing HH, Zerahn K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110, 1951.
- Iglesias GE, Zamzoum HO, Coviello A: Automatic system for short-circuit current. *Com Biol* 1: 61, 1983.
- Castillo GA, Orce G, Coviello A: Efecto de la inhibición del transporte de Cl⁻ sobre la corriente de cortocircuito en piel de sapo. Resumen presentado en el VII Congreso Argentino de Biología, 1978.
- Bentley PJ, Main AR: Zonal differences in permeability of the skin of some anuran amphibia. *Am J Physiol* 223: 361, 1972.
- Whittembury G, Fishman J: Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: the effect of K, ouabain and ethacrynic acid. *Pflugers Arch* 307: 138, 1969.
- Orce GG, Castillo G: Effects of SQ 14225 on hydrosaline transport in toad skin, a model of the distal nephron. Resumen presentado en la V Reunión de la Sociedad Interamericana de Hipertensión, 1983.
- Ryder KW, Jay SJ, Jackson SA, Hoke SR: Characterization of a spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Clin Chem* 27: 530, 1981.
- Coviello A, Orce G, Causarano J: Effect of a competitive antagonist (8-Leu-angiotensin II) of angiotensin II on sodium and water transport in toad skin. *Acta Physiol Lat Am* 24: 409, 1974.
- Dicker SE: The skin and bladder of amphibians as models for the mammalian nephron. *Hormones* 1: 352, 1970.
- Proto MC, Coviello A, Khosla MC, Bumpus FM: Effects of frog-skin angiotensin II in amphibians. *Hypertension (Suppl V)* 5: 101, 1983.
- Halvorsen KA, Fasciolo JC, Calvo R, Puebla M, Binia A, Alonso F, Fernández O: Comparación de la actividad presora y vasoconstrictora de las angiotensinas I y II. *Rev Soc Arg Biol* 34: 193, 1958.
- Mendelsohn FAO: Angiotensin II: evidence for its role as an intrarenal hormone. *Kidney Int* 22: 578, 1982.
- Abe Y, Kishimoto T, Yamamoto K: Intrarenal role of renin-angiotensin system in the regulation of renal hemodynamics. *Japan J Pharmacol* 29: 325, 1979.