



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Efecto de la hipertensión renovascular en la función y expresión de los subtipos
de receptores adrenérgicos α_1 vasculares en la rata.

Tesis que presenta

Inés López Islas

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Farmacología

Director de la Tesis:

Dr. José Antonio Terrón Sierra

México, Distrito Federal.

Febrero, 2012

AGRADECIMIENTOS AL CONACYT

Se agradece a CONACYT por haberme becado durante la realización del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Farmacología, ya que su apoyo fue de gran ayuda para continuar y finalizar este proyecto, gracias por continuar apoyando la investigación.

DEDICATORIA

- Agradezco a Dios, por permitirme terminar este proyecto, por seguir viviendo y continuar realizando lo que me gusta.

- Dedico esta tesis a mis padres, hermanos y sobre todo a mi esposo Juan, por su apoyo y paciencia durante este largo tiempo.

- Gracias a los doctores: Pedro López, Maximiliano Ibarra, Carlos Hoyo, Benjamín Floran, Erick, Erlihc, Rafael Villalobos, Víctor Pérez, José Antonio Terrón; a mis amigas Brenda e Itzel; compañeros del CINVESTAV y FES Iztacala, UNAM: Hilda, Martha, Teresa, Julio, Mario, Juan, Verónica y Beatriz, por su colaboración y enseñanza.

INDICE GENERAL

	Páginas
I. Índice general	1
II. Índice de figuras.....	4
III. Índice de tablas.....	5
IV. Índice de gráficas.....	6
V. Lista de abreviaturas.....	7
VI. Resumen.....	9
VII. Abstract.....	10
I. Antecedentes generales.....	11
1. Hipertensión arterial: definición, epidemiología y causas.....	11
2. Control de la presión arterial.....	11
2.1. El sistema renina angiotensina en el control cardiovascular.....	13
2.1.1. Sistema renina angiotensina	13
2.1.2. Papel de los tipos de angiotensina en el sistema renina angiotensina.....	15
2.2. El sistema adrenérgico y su papel en el sistema cardiovascu- lar.....	17
2.2.1. El sistema adrenérgico y subtipos de receptores adre- nérgicos α_1	17
2.2.2. Papel de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en la función cardiovascular.....	20
2.2.3. Papel de los receptores adrenérgicos α_{1D} en la hipertensión arterial.....	21
3. El sistema renina angiotensina y el sistema nervioso simpático.....	22
3.1. Modulación de respuestas vasculares adrenérgicas por la an- giotensina II.....	22
3.2. Interacción de la angiotensina II con los subtipos de recepto-	

res adrenérgicos α_1 y su posible papel en la hipertensión arterial.....	23
4. Eicosanoides en la hipertensión arterial.....	26
4.1. Metabolismo y síntesis de los eicosanoides.....	26
4.2. Eicosanoides y la función renal.....	29
4.3. Papel de los eicosanoides en la hipertensión arterial.....	30
4.4. Alteraciones en la producción y función de prostaglandinas en la hipertensión arterial.....	31
5. Hipertensión renovascular.....	34
II. Justificación.....	38
III. Hipótesis.....	39
IV. Objetivos.....	40
a. Objetivo general.....	40
b. Objetivos específicos.....	40
V. Materiales y métodos.....	41
V.1. Animales.....	41
V.2. Cirugía (coartación de la aorta).....	41
V.3. Medición de la presión arterial.....	42
V.4. Experimentos agudos de presión arterial.....	42
V.5. Protocolos experimentales relativos a cada objetivo específico.....	43
V.6. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	55
V.7. Fármacos utilizados.....	56
VI. Resultados.....	57
1. Presión arterial, FC y peso de los animales.....	57

2. Estudios funcionales dosis-respuesta.....	59
3. Determinación de proteínas y RNAm de los receptores adre- néricos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}	63
4. Determinación de PGE ₂ , PGI ₂ y TXB ₂ en orina por EIA.....	69
5. Niveles de All en plasma.....	70
6. Resultados de anatomopatología e histopatología.....	71
VII. Discusión.....	77
VIII. Conclusiones.....	87
IX. Perspectivas.....	88
X. Referencias.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Sistema renina angiotensina	15
2. Efectos funcionales de los péptidos de angiotensina mediado por sus receptores.....	17
3. Cascada del ácido araquidónico.....	27
4. Relación entre el estímulo vasoconstrictor por norepinefrina o AII, vasodilatador (PGI ₂) y vasoconstrictor por TXA ₂	33
5. Coartación de la aorta abdominal a nivel interrenal.	42
6. Rata anestesiada con traqueostomía, canulada en la arteria carótida izquierda y venas femorales, para el registro de la PAD.....	43
7. Determinación de prostanoïdes en orina.....	45
8. Análisis de la expresión de las proteínas de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 por el método de Western blot.....	48
9. Análisis de la expresión del RNA de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 por el método de RT-PCR.....	52
10. Imágenes de la anatomopatología del corazón, aorta y riñones de un animal con OS, CA7 y CA14.....	72
11. Microscopia 40X de la arteria aorta por arriba de la coartación teñida con Hematoxilina-Eosina, en el grupo con operación simulada, coartación de la aorta a los 7 días y a los 14 días.....	73
12. Cortes histológicos de aorta y corazón, teñidos con Hematoxilina-Eosina en los grupos con OS, CA7 y CA14.....	75
13. Cortes histológicos de riñón derecho e izquierdo, teñidos con Hematoxilina-Eosina, en los grupos con OS, CA7 y Ca14.	76

INDICE DE TABLAS

1. Características de los subtipos de receptores adrenérgicos α_119
2. Afinidad de agonistas y antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos α_120
3. Parámetros para las respuestas presoras a noradrenalina y A-61603.....61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Proporción de muertes atribuibles a los principales factores de riesgo en el mundo (2000). Modificada de Ezzati y cols., 2002.....	12
2. Valores basales de presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca antes y después de la administración de vehiculo, BMY-7378 y RS-100329 en animales tratados con noradrenalina.....	58
3. Valores basales de presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca antes y después de la administración de vehiculo, BMY-7378 y RS-100329 en animales tratados con A-61603.....	59
4. Efecto de BMY-7378 (BMY; 1 mg/kg, i.v.) y de RS-100329 (RS; 0.5mg/Kg, i.v.) sobre las respuestas presoras inducidas por A61603 o noradrenalina en ratas con OS, CA7 y CA14.....	62
5. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1A} , en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos: OS, CA7 y CA14.....	65
6. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1B} , en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos.....	66
7. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} , en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos.....	67
8. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas de los receptores adrenérgico α_{1A} y α_{1B} , en la arteria caudal de los tres grupos.....	68
9. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} , en la arteria caudal de los tres grupos.....	69
10. Concentración de PGE ₂ , TXB ₂ y 2,3dinorPGF _{α_1} en orina de animales con con operación simulada y coartación de la aorta.....	70
11. Niveles plasmáticos de All en los grupos con operación simulada y coartación de la aorta.....	71
12. Diámetro y espesor de la arteria aorta en ratas con operación simulada y	

coartación de la aorta.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
All	Angiotensina II.
Alll	Angiotensina III
ARA II	Antagonista de los receptores de angiotensina II.
BMY 7378	Antagonista de los receptores adrenérgicos α_{1D} .
Bo	Unión máxima.
CA7	Coartación de aorta durante 7 días.
CA14	Coartación de aorta durante 14 días
CDR	Curva dosis-respuesta
CEC	Cloroetilclonidina
CICUAL	Comité institucional de cuidado y uso de los animales de laboratorio.
COX	Ciclooxigenasa
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DR	Dosis respuesta.
ECA	Enzima convertidora de angiotensina.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EIA	Inmunoensayo enzimático.
E _{max}	Efecto máximo del agonista
FC	Frecuencia cardiaca.
HAS	Hipertensión arterial sistémica.
HETES	Ácido hidroxieicosatetraenoico.

HRV	Hipertensión renovascular.
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.
IRAP	Receptor aminopeptidasa regulado por insulina.
IV	Intravenoso.
lat/min	Latidos por minuto.
MCP	Proteínas quimiotácticas monocíticas.
NBS	Unión no específica.
ON	Óxido nítrico.
OS	Operación simulada
PAD	Presión arterial diastólica
PAI	Inhibidor activador de plaquetas.
PG	Prostaglandina
PGH ₂	Endoperóxido o Prostaglandina H ₂ .
PGI ₂	Prostaciclina.
SRA	Sistema renina angiotensina.
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas.
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa
TX	Tromboxano
UA	Unidades arbitrarias.

RESUMEN

La angiotensina II (All) modula la función y expresión de los receptores adrenérgicos α_1 , en las arterias: aorta, femoral, carótida, mesentérica, iliaca y caudal, donde median la contracción; estos receptores tienen un papel importante en el control de la presión arterial. Nosotros estudiamos los cambios en la función y expresión (proteínas y RNAm) de los receptores adrenérgicos (RA) α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} ; los niveles plasmáticos y urinarios de All y PGE_2 , TXB_2 y PGI_2 respectivamente, así como los cambios histológicos en aorta, riñones y corazón de animales anestesiados con coartación de la aorta inter-renal. Utilizamos ratas Wistar macho con operación simulada (OS), coartación de la aorta inter-renal a los 7 y 14 días (CA7 y CA14), para inducir respuestas presoras a agonistas en animales anestesiados tratados con antagonistas y solución salina, Western blot y reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa (de los RA α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , en la arteria aorta y caudal) e inmunoensayo (All plasmática). El antagonista de los RA α_{1D} , BMY 7378, bloqueó las respuestas inducidas por noradrenalina en el siguiente orden OS>CA7>>CA14; en contraste con el antagonista de los RA α_{1A} , RS-100329, que desvió a la derecha la curva dosis-respuesta a noradrenalina, junto con disminución significativa del efecto presor máximo, en el siguiente orden: OS>CA7=CA14. La potencia del agonista de los RA α_{1A} , A-61603, se incrementó significativamente en ratas con CA14 y las respuestas fueron inhibidas por el RS-100329, en este orden CA14>CA7>OS. En la aorta, la proteína de los RA α_{1D} se incrementó en CA7 y disminuyó en CA14; aumentó la proteína de los RA α_{1A} en la arteria caudal de CA7 y retornó a valores normales en CA14. El RNAm del RA α_{1D} y α_{1B} en la arteria caudal aumentó en CA7. La All plasmática se incrementó en CA7 y CA14 comparado con ratas con OS, las prostaglandinas no se modificaron. El corazón presentó hipertrofia en los animales coartados, el riñón izquierdo de CA7 mostró isquemia que revirtió en CA14, la aorta presentó hipertrofia e hiperplasia en CA7 y disminuyó ésta en CA14. Estos datos sugieren una relación temprana y directa entre la All y los RA α_{1D} en el desarrollo de la hipertensión; así como una asociación entre los cambios histológicos en corazón, riñones y aorta con el tiempo de la coartación, niveles de All e hipertensión.

ABSTRACT

Angiotensin II (ATII) modulates function and expression of alpha 1 adrenoceptors expressed in aorta, femoral, carotid, mesenteric, iliac and tail arteries where they mediate contraction; these receptors also play an important role in blood pressure control. We studied the changes in function and expression (protein and mRNA) α_{1A} , α_{1B} α_{1D} adrenoceptors, plasma ATII levels and PGE2, TXB2 and PGI2 urinals plasma and urinary levels of IIA and PGE2, TXB2 and PGI2 respectively; histological changes in aorta, kidneys and heart in anesthetized animals with inter-renal aortic coarctation. Male Wistar rats, either sham operated (SO), or with aortic coarctation for 7 (AC7) and 14 days (AC14) were used for agonist-induced pressor responses in vehicle (physiological saline)- and antagonist-treated anesthetized animals, immunoblot analysis and reverse transcription-polymerase chain reaction (of the α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} - adrenoceptors in aorta and caudal arteries), and immunoassay (plasma ATI and PGE2, TXB2, PGI2 urinals). The α_{1D} -adrenoceptor antagonist, BMY-7378 (BMY) blocked noradrenaline-induced responses in the order SO > AC7 >> AC14; in contrast, the α_{1A} -adrenoceptor antagonist RS-100329 (RS), produced a marginal shift to the right of the dose-response curve to noradrenaline, along with a strong decrease of the maximum pressor effect in the order SO > AC7 = AC14. The potency of the α_{1A} -adrenoceptor agonist A-61603 increased in rats with AC14, and responses were inhibited by RS in the order AC14 > AC7 > SO. In aorta, α_{1D} -adrenoceptor protein increased in AC7 and decreased in AC14; α_{1A} -adrenoceptor protein increased in the caudal artery of AC7 and returned to control values in AC14. α_{1B} and α_{1D} mRNA in the caudal artery increase in CA7. Plasma ATII increased in AC7 and AC14, compared with SO rats;. prostaglandins did not change. The heart showed hypertrophy in animals with aortic coarctation, the left kidney showed ischemia, this reversed in CA14, the aorta of CA7 showed hypertrophy and hyperplasia and decreased it in CA14. These results suggest an early and direct relationship between ATII and α_{1D} -adrenoceptors in the development of hypertension in this experimental model, and an association between the histological changes in heart, kidneys and aorta with coarctation time, All levels and hypertension.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1. Hipertensión arterial: definición, epidemiología y causas.

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es uno de los problemas de salud más importantes en los países industrializados (ver gráfica 1) y es una de las principales causas de muerte prematura. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, a nivel mundial, cerca de 1000,000,000 de personas tienen hipertensión, de los cuales dos tercios se encuentran en países en vías de desarrollo; se estima que para el 2025, 1.56 billones de adultos podrían cursar con hipertensión. En México, en 1993 se reportó una prevalencia del 25%, incrementándose a 30.5% en el 2000, en la población con edad entre los 20 y 69 años; mientras que en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006, fue del 31%.

La HAS tiene un impacto económico-social devastador, ya que se trata de una entidad no curable, con secuelas que en su mayoría son incapacitantes, con una alta mortalidad.

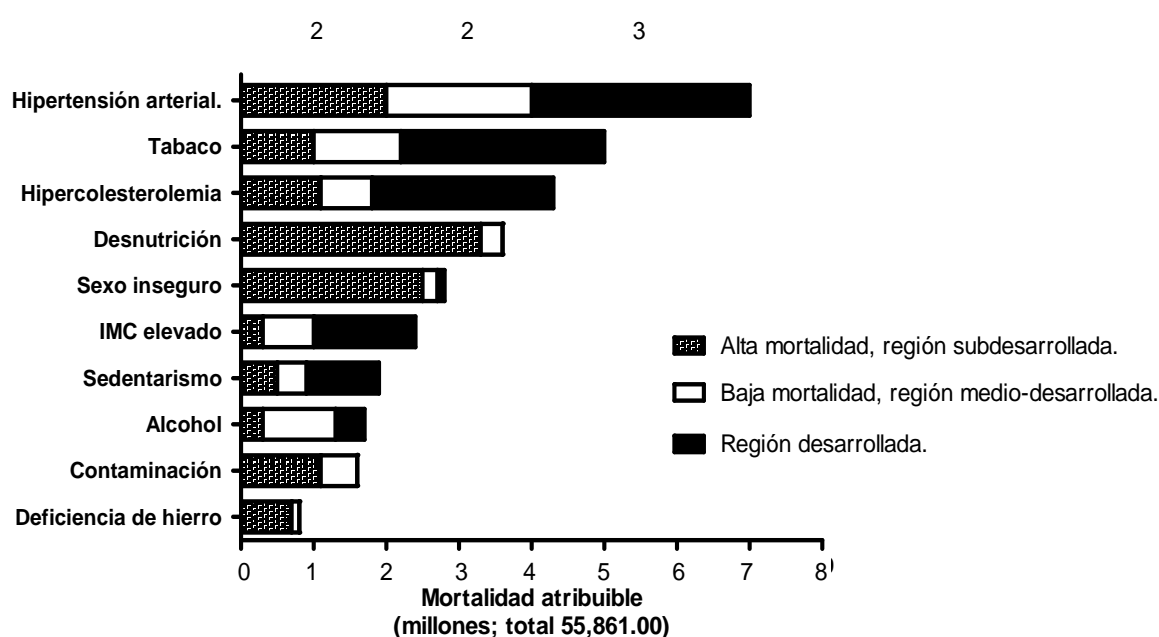
De acuerdo al séptimo informe del Joint National Committee sobre prevención, detección, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial (JNC VII), se ha definido hipertensión arterial cuando se determinan cifras de presión arterial sistólica > 140mmHg y presión arterial diastólica > 90mmHg en más de 2 ocasiones.

La HAS puede ser producida por múltiples causas pero en el 90% de los casos su etiología es desconocida, en el 10% restante puede ser secundaria a problemas renales, endocrinos, alteraciones neurológicas, coartación de la aorta, estrés agudo, toxemia del embarazo, rigidez de la aorta, y consumo de alcohol y/o drogas, entre otros (González, 2000; American Medical Association, 2003).

2. Control de la presión arterial

La presión arterial está determinada por el gasto cardíaco y las resistencias vasculares periféricas. Asimismo, el gasto cardíaco depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardíaca, y dicho volumen varía de acuerdo con la contractilidad cardíaca y el retorno venoso. La resistencia vascular periférica y la presión arterial son reguladas por factores nerviosos, humorales y locales. Otros factores que

intervienen indirectamente en la regulación de estas variables incluyen la reserva corporal de sodio y de líquido extracelular, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y diversas hormonas o autacoides locales como las prostaglandinas, las cininas, el factor natriurético auricular y el óxido nítrico (ON), entre otros. Todos estos factores actúan de manera coordinada para mantener la presión arterial dentro de los límites normales, de modo que cuando el equilibrio sostenido entre ellos se pierde por aumento de los factores contráctiles o una disminución de los relajantes, se desarrolla la HAS.



Gráfica 1. Proporción de muertes atribuibles a los principales factores de riesgo en el mundo (2000). Modificada de Ezzati y cols., 2002.

El sistema nervioso simpático mantiene el control de la presión arterial mediante la regulación del tono vascular. Este sistema responde de manera inmediata a cambios de la presión arterial vía mecanismos reflejos como el de los baro receptores aórticos y carotídeos. La estimulación del sistema nervioso simpático desencadena la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas adrenérgicas, la cual produce vasoconstricción y aumento de la frecuencia cardíaca. Los mecanismos que regulan la presión arterial en horas y días, llevan un control renal (sistema renal-líquidos corporales y el sistema renina angiotensina aldosterona).

2.1. El sistema renina angiotensina en el control cardiovascular.

2.1.1. Sistema renina angiotensina.

Con el tiempo se han logrado avances en el conocimiento del sistema renina angiotensina y su papel en la fisiopatogenia de la hipertensión arterial. En 1970 la mayor parte de los componentes del sistema renina angiotensina fueron descritos, así como su papel en el balance hídrico; es uno de los sistemas vasoconstrictores más potentes del organismo. La actividad del sistema renina angiotensina inicia con la liberación de renina por el aparato yuxtaglomerular, la cual interactúa en la circulación periférica con el angiotensinógeno (globulina sintetizada en el hígado) para formar la angiotensina I, que es muy inestable y se desdobra por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) producida por el endotelio, principalmente en el lecho pulmonar, en angiotensina II (AII), que tiene un efecto vasoconstrictor en la circulación, incluyendo la renal. El sitio principal de acción de la AII en el riñón es a nivel pre y postglomerular, en condiciones agudas es el resultado del efecto directo de la AII a través del receptor y en menor proporción de una respuesta miogénica ante la elevación de la presión arterial, así mismo puede actuar a nivel tubular, participando en los mecanismos de reabsorción y excreción de sodio.

La formación de AII se encuentra regulada por la renina, es así que la AII inhibe la expresión de la renina, mientras que los receptores de AII tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) modulan el efecto del sistema renina angiotensina. Dicho sistema se conecta con el sistema calcireinas cininas mediante la ECA, la cual inactiva a las cininas, que tienen el papel de incrementar la producción de prostaglandinas renales por estimulación de la fosfolipasa A2 (Brown y cols., 1976).

Con el surgimiento de medicamentos como el captopril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los antagonistas de los receptores de angiotensina II, se ha aumentado el conocimiento acerca del sistema renina angiotensina circulante y el local, es así que Kumar y cols., en el 2007 reportaron la generación intracelular de AII, siendo considerado un sistema intracrino, paracrino y endócrino, donde intervienen otros elementos no descritos previamente, como son la angiotensina III (heptapeptido 2-8) que se forma por acción de la aminopeptidasa A sobre la AII, la angiotensina IV (hexapeptido 3-8),

producto del efecto de la aminopeptidasa M sobre la AII, la angiotensina 1-7 (heptapéptido) formada por tres vías: acción de la ECA2 (enzima convertidora de angiotensina 2) sobre la AII, por efecto de la endopeptidasa neutral sobre la angiotensina I, o como producto de la angiotensina 1-9 por acción de la ECA o la endopeptidasa neutral; también se han descrito receptores para angiotensina 1-7 (receptor Mas), angiotensina IV, así como para prorenina y renina (Fyhrquist, Saijonmaa, 2008), (Figura 1).

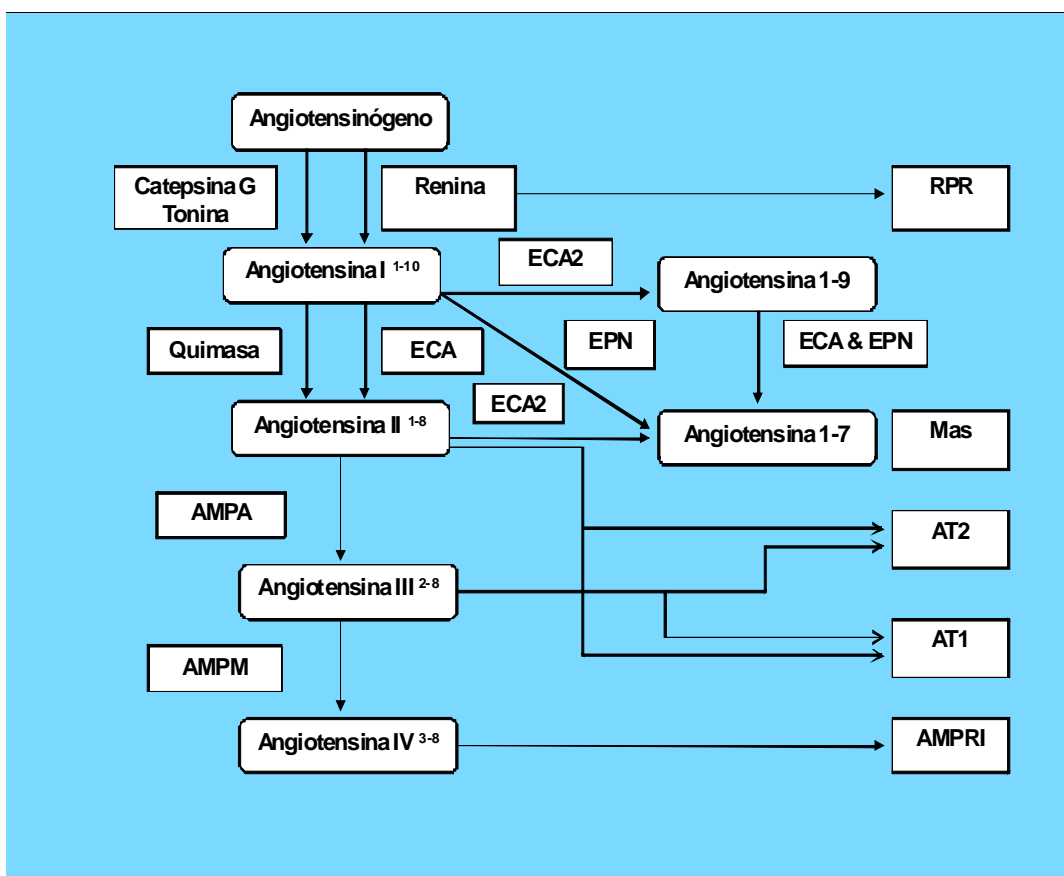


Figura 1. Sistema renina angiotensina. RPR, receptor prorenina/renina; Mas, oncogen mas, receptor para angiotensina 1-7; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AMPRI, aminopeptidasa regulada por insulina; AMPA, aminopeptidasa A; AMPM, aminopeptidasa M; ECA, enzima convertidora de angiotensina; ECA2, enzima convertidora de angiotensina 2; EPN, endopeptidasa neutral. Modificado de Fyhrquist y Saijonmaa, 2008.

2.1.2. Papel de los tipos de angiotensina en el sistema renina angiotensina.

Los tipos de angiotensina que forman parte del sistema renina angiotensina son: angiotensina 1-7, angiotensina 1-9, AII, angiotensina III y angiotensina IV, descritas cada una de ellas a continuación.

Angiotensina 1-7 (heptapeptido).

La angiotensina 1-7 es generada por acción de la ECA2 sobre la AII, así como por efecto de otras peptidasas sobre la AI y la angiotensina 1-9; inicialmente se describió su acción en la liberación de vasopresina (Schiavone, Khosla y cols. 1988), posteriormente se reportaron acciones contrarias a las de la AII, como son la vasodilatación y efectos antitróficos y amplificación de la vasodilatación secundaria a la bradicinina; su receptor es llamado Mas, acoplado a proteína G, (Ferrario, 2006; Santos, Castro, Gava y cols., 2006) y la angiotensina 1-7 también interactúa con el receptor AT1, y algunas de sus acciones pueden ser bloqueadas con losartán, otras pueden ser inhibidas con antagonistas del receptor AT2 (Santos, Andrade y cols., 2000).

Angiotensina 1-9.

La angiotensina 1-9, se forma por acción de la ECA2 sobre la angiotensina I, se localiza en corazón, vasos sanguíneos y sistema nervioso, donde modula una vía para la formación de angiotensina 1-7. Se desconocen otras funciones.

Angiotensina II (octapéptido).

Es el principal regulador del estado hemodinámico, balance de sodio y líquidos, remodelamiento cardiovascular y crecimiento celular (Carey y Siragy, 2000). Se forma por acción de la ECA sobre la angiotensina I, sus efectos son determinados por su unión y activación de los receptores AT1 y AT2; los receptores AT1 median vasoconstricción, sed, liberación de vasopresina y aldosterona, fibrosis, crecimiento y migración celular, generación de radicales libres, apoptosis celular, modulación pro-inflamatoria (Ruiz y cols., 2006) incremento en la secreción de insulina (Ramracheya, Muller y cols., 2006), incremento de los triglicéridos plasmáticos (Ran, Hirano, Adachi, 2004), reducción de la gluconeogénesis y salida de glucosa hepática (Assimacopoulos, Blackmore, 1982); por activación de los receptores AT2, tiene efectos contrarios a los de AT1, como son vasodilatación,

liberación de óxido nítrico, inhibición del crecimiento y proliferación, así como efectos neurotróficos en el sistema nervioso central (Culman, Baulmann y cols., 2001; Fyhrquist y cols., 2008). La mayoría de los efectos deletéreos de la AII sobre las células del sistema cardiovascular son mediados a través de la estimulación de los receptores AT1, es así que el bloqueo selectivo y competitivo de dicho receptor es el principal determinante del mecanismo de acción de los antagonistas de los receptores AT1.

Angiotensina III (2-8 heptapeptido).

La angiotensina III (AIII) fue descrita desde 1970, es producida por acción de la aminopeptidasa A sobre la AII, sus acciones son similares a las de la AII, vía receptores AT1 y AT2, una de las más importantes es la liberación de vasopresina vía activación del receptor AT1 (Zini, Chauvel y cols. 1996), siendo así que la infusión de AII y AIII en perros conscientes producen un efecto equipotente en la misma concentración plasmática, en la presión sanguínea, secreción de aldosterona, excreción de sodio y actividad de la renina plasmática, con un efecto inhibitorio por candesartan, sin embargo la tasa de depuración metabólica de la AIII es 5 veces mayor que la de AII, por lo que la AII sigue teniendo un papel principal en el SRA. (Gammelgaard, Chauvel y cols. 2006).

Angiotensina IV (3-8 hexapéptido).

Angiotensina IV (AIV), es producto del efecto de la aminopeptidasa M sobre la AIII, sus acciones son mediadas por los receptores aminopeptidasa regulados por insulina (IRAP) y su unión al receptor AT4. Interviene en la vasodilatación renal, hipertrofia y activación del NF- κ B llevando a un incremento en la expresión del inhibidor del activador de plaquetas 1 (PAI-1), proteínas quimiotácticas monocíticas (MCP-1), interleucina 6 y factor de necrosis tumoral α (Chai, Peck y cols. 2004), así como en el crecimiento de células endoteliales y células de músculo liso vascular (Fyhrquist, Saijonmaa, 2008). Otros estudios la han asociado con daño cardiovascular (Ruiz-Ortega, Esteban y cols., 2007).

Es así que todos los tipos de angiotensina, algunas más que otras, desempeñan un papel importante en el sistema renina angiotensina, y por tanto en la fisiopatogenia de la hipertensión arterial. (Figura 2).

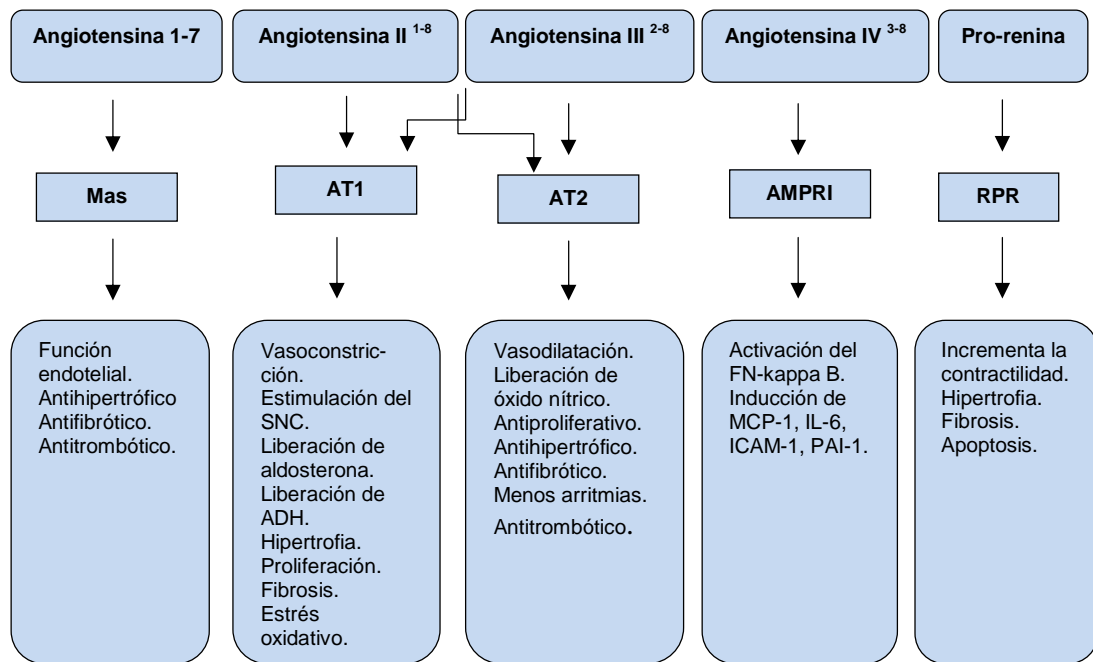


Figura 2. Efectos funcionales de los péptidos de angiotensina mediado por sus receptores; Mas, oncogen mas, receptor para angiotensina 1-7; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AMPRI, aminopeptidasa regulada por insulina. Modificado de Fyhrquist y Saijonmaa, 2008.

2.2. El sistema adrenérgico y su papel en el sistema cardiovascular.

2.2.1. El sistema adrenérgico y subtipos de receptores adrenérgicos

α_1 .

La actividad del sistema nervioso simpático es modulado por los receptores adrenérgicos, los cuales son miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G, median la actividad de la noradrenalina, adrenalina y catecolaminas endógenas; las cuales actúan como neurotransmisores tanto en el sistema nervioso periférico como en el central. En 1948, Ahlquist reportó dos tipos de receptores adrenérgicos, α y β , posteriormente con el uso de antagonistas y agonistas selectivos, se demostró la existencia de subtipos de receptores adrenérgicos β , que regulan la respuesta en el músculo cardíaco (β_1) y en el bronquial (β_2), (Furchgott, 1967; Lands y cols, 1967). En 1977, Berthelsen y Pettinger demostraron la existencia de los receptores α_1 y α_2 . McGrath, fue el primero en

sugerir la división de los receptores adrenérgicos α_1 en α_{1A} y α_{1B} , de acuerdo a su afinidad al 5-metil urapidil, WB-4101 (Morrow y Creese, 1986) y al antagonista irreversible cloroetilclonidina (Han y cols, 1987), teniendo mayor afinidad el receptor adrenérgico α_{1A} por el 5-metil urapidil y WB-4101, mientras que el receptor adrenérgico α_{1B} a cloroetilclonidina; mediante la clonación molecular y el surgimiento de nuevas drogas selectivas se reportaron tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 : α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (Alexander y Peters, 1999), quienes inicialmente fueron denominados como α_{1C} , α_{1B} y α_{1A}/α_{1D} ó α_{1A} , respectivamente; sus características farmacológicas se muestra en la tabla 1 y la afinidad de agonistas y antagonistas de cada uno de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , en la tabla 2. Los receptores adrenérgicos α_1 están acoplados a la proteína Gq/11, estimulan la actividad de la fosfolipasa C y esta enzima promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol, produciendo trifosfato de inositol y diacilglicerol, moléculas que actúan como segundos mensajeros para mediar la liberación de calcio de los reservorios no mitocondriales y activación de la proteína cinasa C respectivamente (Zhong y Minneman, 1999, García-Sáinz y cols, 2000), siendo diferente la eficacia de activación de la fosfolipasa C por los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 ; mayor para el α_{1A} , intermedio para el α_{1B} y menor para el α_{1D} ; el α_{1A} y el α_{1B} se pueden acoplar también a la proteína G α 14 y sólo el α_{1B} a la proteína G α 16 (Wu y cols, 1992). Los receptores adrenérgicos α_1 también activan la afluencia del calcio, liberación del ácido araquidónico, activación de la fosfolipasa D y por la proteína cinasa mitógena activada (MAPK) (Zhong y Minneman, 1999; Guimaraes y Moura, 2001). Estudios *in vitro*, han reportado en mamíferos, que la contracción del músculo liso vascular es secundario a la activación de los receptores adrenérgicos α_1 ; en el perro se han localizado los receptores adrenérgicos α_1 en las arterias: aorta, femoral, mesentérica, renal y esplénica (Shi y cols., 1989, Daniel y cols., 1999); en la rata en la arteria: aorta, carótida, mesentérica, renal y caudal, (Tabla 1 y 2) (Han y cols., 1990; Villalobos-Molina y cols., 1996), y en el humano en arterias: aorta, carótida, femoral, iliaca, mamaria, celiaca, hepática, mesentérica, renal, pulmonar, coronaria derecha e izquierda (Rudner y cols., 1999). De forma más específica, el receptor adrenérgico α_{1A} se encuentra en

vasos deferentes, uretra, glándulas submaxilares, mesentérica, caudal e iliaca; el receptor α_{1B} , en: bazo, hígado, porta y mesentérica; y el receptor adrenérgico α_{1D} , en aorta, carótida, iliaca, femoral, renal y mentérica superior (Piascik y cols., 2001).

Subtipo	Nombre previo	Antagonistas	Señalización: PLC, PLA2, PLD, canales de potasio, calcio, MAPKs	Aminoácidos	Localización en télidos de rata	Localización celular	Agonista
α_{1-A}	α_{1C}	5-Metilurapidil, KMD-3213, RS-100329, niguldipino, WB4101.	++++	465 en rata y 466 en humanos.	Vasos deferentes, uretra, glándula submaxilar, mesentérica, caudal, iliaca.	Intracelular y superficie celular.	A61603
α_{1-B}	-	Cloroetilclonidi- na	++	515 en ratas y 519 en humanos.	Bazo, hígado, aorta, mesentérica.	Superficie celular.	Noradrena- lina
α_{1D}	$\alpha_{1A/D}, \alpha_{1A}$	BMY-7378	+	560 en ratas y 572 en humanos.	Arterias: aorta, carótida, iliaca, femoral, renal, mesentérica superior.	Intracelular	Noradrena- lina

Tabla 1. Características de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 . Modificado de Piascik y cols, 2001.

FARMACOS	SUBTIPO α_{1A} (pKi)	SUBTIPO α_{1B} (pKi)	SUBTIPO α_{1D} (pKi)
BMY 7378	6.28 \pm 0.10	6.2 \pm 0.03	8.2 \pm 0.06
5-MU	8.66 \pm 0.1	6.87 \pm 0.1	7.46 \pm 0.2
TAMSULOSIN	10 \pm 0.1	8.97 \pm 0.2	9.69 \pm 0.3
NOREPINEFRINA	4.41 \pm 0.10	5.50 \pm 0.15	6.63 \pm 0.06
FENILEFRINA	4.14 \pm 0.22	5.21 \pm 0.08	5.79 \pm 0.06
A61603	7.5 \pm 0.01	5.8 \pm 0.14	5.9 \pm 0.01
RS 100329	9.6 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1	7.9 \pm 0.01

Tabla 2. Afinidad de agonistas y antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 .

2.2.2. Papel de los subtipos del receptor adrenérgico α_1 en la función cardiovascular.

Una vez que se demostró la existencia de los tres subtipos de receptor adrenérgico α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}), muchos investigadores han enfocado sus proyectos a la búsqueda de dichos subtipos en ciertos vasos sanguíneos y a determinar su papel en patologías cardiovasculares incluyendo la hipertensión. Estudios *in vivo* han demostrado la participación de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en la regulación de la función vascular periférica (McGrath y cols., 1982), pero no se ha establecido completamente el papel de cada uno de ellos.

Los receptores adrenérgicos α_{1B} se han asociado con la regulación del crecimiento del músculo liso vascular y los α_{1A} con la limitación de dicho crecimiento (Siwik y cols., 1996; Chen y cols., 1995). Evidencias cada vez más numerosas han demostrado que los receptores adrenérgicos α_{1D} tienen un papel predominante en la contracción de las arterias: aorta, carótida, mesentérica, iliaca, femoral y renal (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Villalobos-Molina y col., 1997). Así mismo, la

expresión funcional de los receptores adrenérgicos α_{1D} en la vasculatura sistémica *in vivo* tienen un papel importante en el control de la presión arterial (Ibarra y col., 1997; Zhou y Vargas, 1996), teniendo actividad constitutiva en arterias; tal actividad no parece ser una característica de los receptores adrenérgicos α_{1A} (Gisbert y col., 2000; Ziani y col., 2002). Resulta interesante que la actividad constitutiva de los receptores adrenérgicos α_{1D} está aumentada en tejidos vasculares provenientes de animales hipertensos (Gisbert y col., 2002); por lo que este subtipo está funcionalmente relacionado con la génesis y mantenimiento de la hipertensión arterial, ya que se ha demostrado que su expresión funcional aumenta con la edad (Ibarra y col., 1997), así como la expresión del RNA mensajero y sus proteínas son mayores en animales espontáneamente hipertensos (SHR) aún antes del desarrollo del proceso hipertensivo (Godínez-Hernández y col., 2006; Villalobos-Molina, 1999).

2.2.3. Papel de los receptores adrenérgicos α_{1D} en la hipertensión arterial.

Los receptores adrenérgicos α_1 son los principales efectores del sistema nervioso simpático para regular el flujo sanguíneo, la presión arterial y el crecimiento celular (Chalothorn D, Mccune D, y cols., 2003; García-Sáinz y cols., 1999), se encuentran distribuidos en la vasculatura periférica, el subtipo más estudiado es el α_{1D} formado por 560 aminoácidos en la rata y 572 en humanos; se le ha localizado en las arterias aorta, carótida, iliaca, femoral, renal y mesentérica superior. Son constitutivamente activos (García-Sáinz y cols, 1999; Gisbert y cols., 2000), su actividad constitutiva es capaz de mediar la contracción del músculo liso vascular. Esta actividad, se manifiesta tras un estímulo adrenérgico, cuando éste desaparece, evita cambios bruscos en el calibre de los vasos de conductancia y por lo tanto el flujo sanguíneo a través de ellos. Se ha determinado un aumento funcional de estos receptores adrenérgico en los vasos de resistencia de SHR, la consecuencia de esto, es un incremento significativo en el tiempo necesario para recuperar el tono basal, posterior a un estímulo adrenérgico, lo que mantiene el tono de las arterias de resistencia patológicamente elevado, y podría causar o mantener la hipertensión. Son localizados en el compartimento intracelular

(McCune y cols., 1999), se ha demostrado que junto con los receptores adrenérgicos α_{1B} forman heterodímeros, pero no con los α_{1A} , su unión con los α_{1B} controla su expresión y función en la superficie y no depende de su acople a la proteína G. Se ha propuesto que dicha unión promueve su expresión en la superficie y un incremento en su unión al calcio intracelular liberado, pero frecuentemente no son identificados farmacológicamente en tejidos nativos cuando se coexpresan con los receptores adrenérgicos α_{1B} , ya que forman una sola entidad funcional con un perfil farmacológico nuevo (Hague, y cols., 2003, 2005). Ratones sin el gen para el receptor adrenérgico α_{1D} presentan disminución en la presión arterial y en la respuesta presora a norepinefrina (Tanoue y cols., 2002), por lo que estos receptores adrenérgicos median la contracción también en arterias (aorta, carótida y mesentérica) de ratas adultas SHR (Villalobos-Molina y cols., 1996). En ratas SHR a quienes se les administra BMY 7378 (antagonista de los receptores adrenérgicos α_{1D}) el efecto presor a fenilefrina es desplazado más que en ratas control; lo que sugiere su participación en la patogénesis y el mantenimiento de la hipertensión (Villalobos-Molina y cols., 1999).

3. El sistema renina angiotensina y el sistema nervioso simpático.

3.1 Modulación de respuestas vasculares adrenérgicas por la angiotensina II.

Diversos grupos de investigación han estudiado la interacción entre el sistema renina-angiotensina y el sistema simpático adrenérgico, y su implicación en la patogénesis de la hipertensión arterial. En el sistema cardiovascular los receptores adrenérgicos α_1 regulan la contractilidad del músculo liso vascular y el músculo cardíaco, razón por la que se les ha asociado con la hipertensión arterial y el desarrollo de hipertrofia cardíaca y arritmias secundarias a isquemia. Existe evidencia de que la AII tiene interacciones de tipo sinérgico con otras sustancias vasoactivas endógenas, lo cual podría explicar, al menos en parte, su importante participación en la fisiopatología de la hipertensión arterial. En este sentido, estudios in vitro (Laher et al., 1990) e in vivo (Clough et al., 1983; Reams y Bauer, 1987) han demostrado que la AII es capaz de amplificar las respuestas vasoconstrictoras producidas por la noradrenalina, y que la inhibición

farmacológica de la ECA con captopril reduce las respuestas presoras inducidas por agonistas adrenérgicos α en ratas descerebradas y desmeduladas (De Jonge et al., 1982, 1983; Grant y McGrath, 1988; Tabrizchi y Triggle, 1994). En concordancia con estas observaciones, se reportó que la infusión de dosis subpresoras de AII amplificó las respuestas presoras inducidas por el agonista adrenérgico α_1 , fenilefrina, en ratas anestesiadas intactas y simpatectomizadas, y que éste efecto de la AII fue bloqueado selectivamente por un antagonista de los receptores AT_1 (Marano y Argiolas, 1994). Es así, que la AII facilita la neurotransmisión simpática en diversos sitios, como la médula adrenal, el sistema nervioso central, ganglio simpático y terminales nerviosas noradrenérgicas presinápticas, además la estimulación del sistema nervioso simpático produce secreción de renina y por lo tanto producción de AII (DiBona, 1989). Con base en estas observaciones es posible que el octapéptido produzca un efecto amplificador de las respuestas vasoconstrictoras sistémicas adrenérgicas α_1 . Esta acción amplificadora de la AII podría deberse a una interacción del péptido con los receptores adrenérgicos α y/o con sus vías de señalización (Henrion et al., 1992) o a una acción indirecta que incluya la formación de productos secundarios. Con respecto de esta última posibilidad, se ha demostrado que la activación del receptor AT_1 a nivel renal genera prostaglandinas vasodilatadoras (E_2 e I_2) que contrarrestan los efectos vasoconstrictores predominantes de la AII (Attallah y col., 1982). Asimismo, la estimulación del receptor AT_2 se ha asociado con la activación de un mecanismo vasodilatador muy importante que incluye la generación de bradicinina, ON y GMP cíclico (Carey y col., 2000a,b; Siragy y Carey, 1996). El ON contribuye a la regulación del flujo sanguíneo regional y es sintetizado en el endotelio para mantener la resistencia y el tono vascular (Zaninger y col., 1996).

3.2. Interacción de la angiotensina II con los subtipos del receptor adrenérgico α_1 y su posible papel en la hipertensión arterial.

Existe evidencia de que la AII es capaz de inducir la transcripción y expresión de receptores adrenérgicos α_1 en células de músculo liso vascular. Desde 1962 se reportó que las arterias de pacientes y animales hipertensos tienen mayor masa

muscular que los normotensos (Furuyami, 1962), lo que pudiera proporcionarle a dichos vasos un incremento en su resistencia y una mayor fuerza de contracción, como fue observado en arterias mesentéricas de ratas SHR por Mulvany y cols, en 1978; en ratas con hipertensión de Goldblatt también se ha referido un incremento en la masa del músculo liso en la aorta, secundario a hipertrofia y no hiperplasia de células de músculo liso, con un incremento en el DNA, comparado con ratas normotensas (Owens y Schwartz, 1983), otros estudios reportaron que la hipertrofia de la capa media de la aorta es controlada por incremento de la presión arterial, pero otros factores juegan un papel importante en el control en el número de células de músculo liso vascular, en relación a ello, Owens y cols., en 1985 demostraron que el tratamiento con antihipertensivos como hidralazina, reserpina y clorotiazida previenen la hipertrofia, pero no el incremento en el número de células de músculo liso en la aorta torácica de ratas SHR adultas, además que el incremento en el poliploidismo de las células de músculo liso y la hipertrofia medial no se presentan en ratas SHR prehipertensas, pero ocurre después de que la presión arterial se ha incrementado, por lo que la hipertrofia medial de la aorta es una respuesta de adaptación al estrés de la pared o al incremento de la presión arterial. Los mismos autores, dos años después describieron que el efecto del captopril (inhibidor de la ECA) en la hipertrofia medial y el número de células de músculo liso es secundario a una disminución en la presión arterial dependiente del efecto de la AII, la cual interviene en el control del crecimiento vascular (Owens y cols., 1987). A pesar de que las ratas SHR no son un modelo de hipertensión dependiente de renina, Tripodo y cols., en 1987, refirieron una mayor actividad de la renina vascular en este tipo de ratas que en controles, por lo que el incremento en los niveles de AII en la pared vascular puede tener un papel importante en el crecimiento vascular, directamente sobre el músculo liso vascular o de forma indirecta incrementando la actividad simpática (Antonaccio y Kerwin, 1981).

Es en 1995, cuando Hu y cols, demostraron un incremento en el número de receptores adrenérgicos α_1 en células de músculo liso vascular pretratadas con fenoxibenzamina (antagonista irreversible de los receptores adrenérgicos α_1) y

posteriormente tratadas con All durante 24hrs; además la All incrementó el efecto de las catecolaminas como la fenilefrina en el crecimiento de células de músculo liso vascular de aorta de rata. La estimulación de los receptores adrenérgicos α_{1D} con noradrenalina produce hipertrofia de células de músculo liso en la aorta aislada de rata (Chen y col., 1995), así como de la pared vascular *in vivo* (Erami y col., 2002). Dosis altas de captopril inhiben la hipersensibilidad de vasos de resistencia a fenilefrina (Chen y cols., 1995). Diversos estudios han demostrado que la All induce un incremento en la síntesis de proteínas de glándulas adrenales, de músculo cardíaco, y la hipertrofia de células de músculo liso de aorta (Gill, 1977; Owens y cols., 1986); por lo que las catecolaminas y los nervios simpáticos pueden tener un papel importante en el control del crecimiento de las células del músculo liso vascular tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que la All puede activar el sistema nervioso central, facilitar la neurotransmisión adrenérgica periférica, inhibir la recaptura de noradrenalina y potenciar la respuesta postunión de las células de músculo liso vascular a la estimulación de los receptores adrenérgicos α_1 . Estudios recientes reportaron que el octapéptido (All) puede inducir la expresión de receptores adrenérgicos α_{1D} en células de músculo liso vascular, y que este efecto se ve revertido al inhibir la síntesis de All con captopril (Godínez-Hernández y col., 2006). Adicionalmente, se reportó que la All no tuvo efecto sobre los niveles de RNAm de los receptores adrenérgicos α_{1B} y α_{1D} , mientras que disminuyó la expresión del RNAm del receptor adrenérgico α_{1A} en miocitos cardíacos de ratas neonatas (Li y col., 1997). Este efecto de la All fue dependiente del tiempo y de la concentración del péptido, fue mediado por el receptor AT_1 , y se relacionó con una disminución de la estabilidad del RNAm (Li y col., 1997). La expresión del gen y la proteína del receptor de angiotensina AT_1 vascular son regulados por los niveles de noradrenalina libre, y la regulación a la baja del gen y la proteína del receptor de angiotensina AT_1 inducida por la noradrenalina, es mediada por activación de los receptores adrenérgicos α_1 (Young D y cols., 1997). Clements y Faber en 1997, reportaron que el contenido del RNAm para el receptor adrenérgico α_{1D} en células de músculo liso de aorta presentó disminución dependiente de la concentración de angiotensina en un en

periodo de 3 horas, pero en un tiempo de 24 horas se retornaba a los niveles control, así mismo se presentó una disminución en el RNAm del receptor adrenérgico α_{1B} , pero continuó bajo a las 24hrs, dicha disminución así como la hipertrofia presentada fue bloqueada por losartán, antagonista del receptor de angiotensina AT1; sugiriendo que la AII y la presión intravascular interactúan para modificar el crecimiento celular y la expresión de los receptores adrenérgicos α_{1B} en el músculo liso vascular.

A pesar de la evidencia, que inicialmente fue controvertida, aún se requiere de mayor estudio, para establecer el papel de cada uno de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 y su interacción con la AII, como factores importantes en la fisiopatogenia y mantenimiento de la hipertensión arterial, no sólo en una fase aguda, como lo refieren la mayor parte de las publicaciones, si no también en una fase crónica.

4.Eicosanoides en la hipertensión arterial.

4.1. Metabolismo y síntesis de los eicosanoides.

Se ha reportado que un desequilibrio entre los eicosanoides vasoconstrictores y dilatadores, pueden tener un papel importante en la fisiopatogenia de la hipertensión, incluyendo la de origen renovascular, por lo que en este apartado se tratará sobre éstos.

Se denomina eicosanoides a las prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y productos de la lipooxigenasa y epooxigenasa; son derivados oxigenados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga(20-carbonos), siendo el principal el ácido araquidónico (C20:4,W). Dichos ácidos pueden ser sintetizados a partir de ácidos grasos esenciales de la dieta en gatos y perros. Los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran incorporados en la membrana fosfolípida de todos los tejidos; en el plasma y el agua intracelular las concentraciones de ácido araquidónico son bajas. Un estímulo específico en un órgano lleva a un incremento transitorio en el ácido araquidónico citosólico por activación de la fosfolipasa A2 o de otras fosfolipasas, que incluye receptores ligados a la AII, a

norepinefrina y en la disrupción mecánica de las células. Una vez liberado el araquidonato puede ser oxigenado por uno de los siguientes tres sistemas enzimáticos; la ciclooxigenasa formando un endoperóxido, PGH_2 , mientras que la lipooxigenasa forma ácidos hidroxieicosatetraenoico y leucotrienos, y la epooxigenasa citocromo p-450 forma epóxidos. (Figura 3).

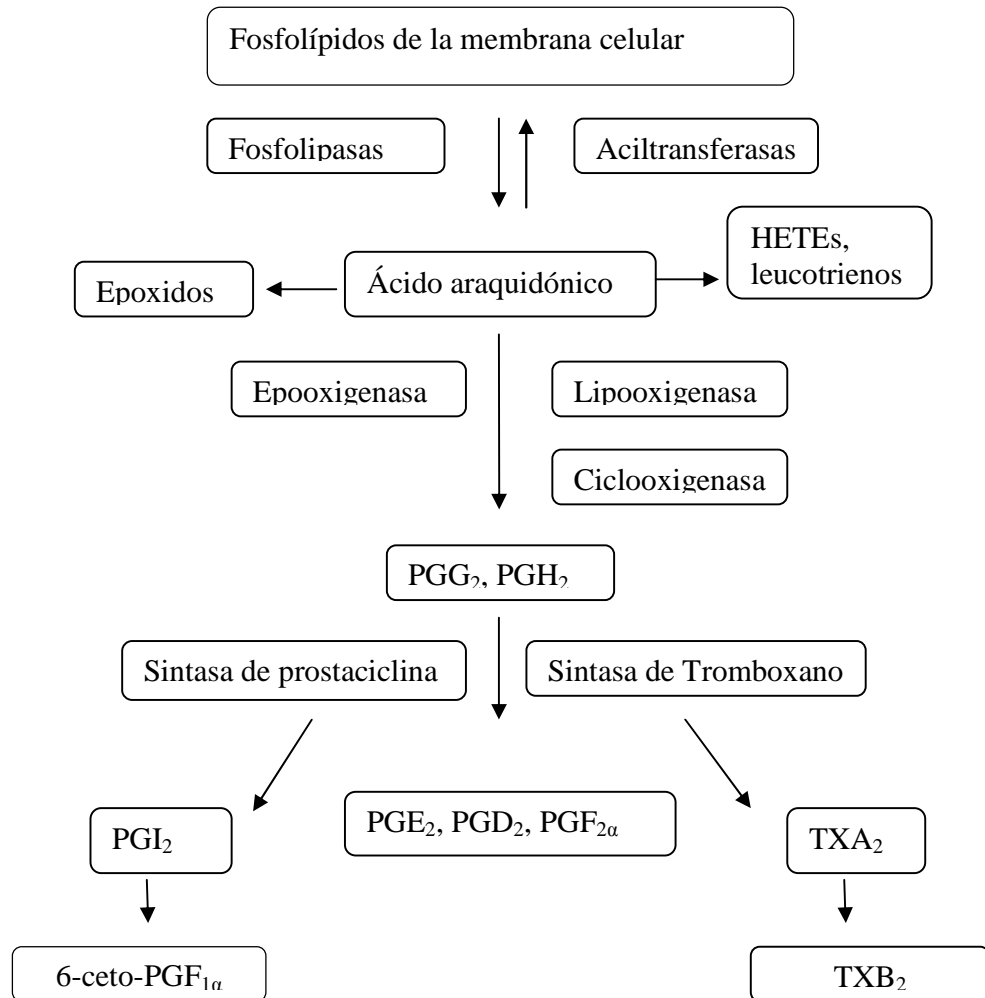


Figura 3. Cascada del ácido araquidónico, PG: prostaglandina, TX: tromboxano, HETES: ácido hidroxieicosatetraenoico.

La ciclooxigenasa está localizada cerca del retículo endoplásmico rugoso. La prostaglandina H_2 es metabolizada por enzimas específicas de tejido a prostaciclina (PGI_2), TXA_2 (tromboxano A_2), PE_2 , PD_2 , y $\text{PGF}_{2\alpha}$. En el endotelio

predomina la PGI_2 , el aumento de peróxidos lipídicos pueden inhibir la síntesis de PGI_2 , las plaquetas pueden metabolizar prostaciclina. La protaglandina H_2 puede ser metabolizada a PGE_2 , PGD_2 o $\text{PGF}_{2\alpha}$ por isomerasas específicas. La sintasa del TX es una hemoproteína p-450 citosólica, mientras que la sintasa de prostaciclina está localizada cerca de la membrana plasmática y la membrana nuclear. La lipooxigenasa y la epooxigenasa microsomal están presentes en algunas células, incluyendo el riñón. Las prostaglandinas y el TXA_2 son difíciles de cuantificarlas en la sangre, ya que presentan hidrólisis espontánea, es así que el TXA_2 y TXB_2 tienen una vida media de 30 segundos, la PGI_2 y 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ tienen una vida media de 3 minutos (Marcus AJ, Weksler BB y cols., 1980; Sacerdoti D, Escalante B, y cols., 1989; Wilson T y cols., 1990). Para cada prostaglandina y tromboxano se han identificado sus metabolitos urinarios que estiman la síntesis corporal total del compuesto aparente, por lo que actualmente se puede medir la tasa de excreción de los metabolitos de la PGI_2 y el TXA_2 en orina: 2,3-dinor 6ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ y TXB_2 (FitzGerald y cols., 1981).

Los eicosanoides se pueden clasificar de acuerdo a sus acciones farmacológicas en:

- Los que afectan la hemostasia mediada por plaquetas.
- Las que modifican el flujo sanguíneo o la función del músculo liso.
- Los que alteran la liberación o acción de otros sistemas efectores, y los que afectan la integridad celular (efecto citoprotector).
- Los eicosanoides pueden tener efectos biológicos opuestos, como en el caso del TXA_2 que es un potente vasoconstrictor y agregante plaquetario, mientras que la PGI_2 es un vasodilatador que además previene la agregación plaquetaria.

La activación del receptor de tromboxano plaquetario causa activación de la fosfolipasa C, incrementa el trifosfato de inositol intracelular, el calcio intracelular y una inhibición secundaria de adenilatoclasa. La prostaciclina incrementa la actividad del adenilatoclasa y el adenosin 3':5'-monofosfatocíclico (AMPc) el cual lleva a una disminución en la concentración de calcio intracelular (Halushka

PV, Mais DE, y cols., 1989).

4.2. Eicosanoides y función renal.

La corteza y la médula renal contienen todos los componentes de los sistemas eicosanoides: precursores de ácidos grasos poliinsaturados, enzimas de degradación y sintéticas, y receptores, la arteriola aferente produce PGI_2 , PGE_2 y TXA_2 , y las células intersticiales y conductos colectores PGE_2 (Morrison y cols., 1969). La infusión de ácido araquidónico en la arteria renal de muchas especies produce vasodilatación renal, que es abolida con la administración de indometacina. Cuando un riñón está bajo estrés vasoconstrictor, la síntesis de prostaglandinas es incrementada para ayudar a mantener el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular; cuando la síntesis de prostaglandinas se bloquea el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular pueden disminuir importantemente.

La posibilidad de que los eicosanoides puedan actuar como vasoconstrictores renales, fue sugerido por primera vez por Morrison y cols., en 1969, la obstrucción de un uréter del riñón de un conejo y modificó la producción de TXA_2 , en contraste con la contraparte no obstruida, estudios posteriores reportaron que el incremento en la síntesis de TXA_2 se correlacionaba con una infiltración del daño renal con células mononucleares. Sin embargo, un riñón normal puede producir TXA_2 , y este puede contribuir a la resistencia vascular renal; mientras que la vasodilatación renal secundaria al uso de furosemida y otros diuréticos de asa es prostaglandina-dependiente, sobre todo de PGI_2 . La furosemida intravenoso incrementa la disponibilidad del ácido araquidónico para la ciclooxygenasa por estimulación de la fosfolipasa (Okegawa y cols., 1983), valorado por el incremento en la excreción de los productos por la hidrólisis, 6-ceto- $\text{PGF}\alpha$ y disminución en la resistencia vascular renal, sin embargo, la furosemida oral o dosis bajas intravenosas causan natriuresis, pero no incrementan la excreción de eicosanoides o el flujo sanguíneo renal.

La AII estimula la síntesis de eicosanoides renales, los eicosanoides renales

pueden afectar la liberación de renina, los baroreceptores y la mácula densa también, el tercer mecanismo es la estimulación β -adrenérgica, que parece ser un mecanismo independiente de la síntesis de prostaglandinas (Barchowsky y cols., 1984). No hay información en relación al TXA_2 en la liberación de la renina, pero puede incrementar el calcio intracelular y la inhibición de la liberación de renina por calcio (Fray y col., 1983).

Se ha reportado que altos niveles de eicosanoides disminuyen la excreción de agua y sodio, se ha aceptado que los antiinflamatorios no esteroideos provocan modesta retención de sodio y que la presión de natriuresis es menos dependiente del incremento de la síntesis de PGE_2 medular renal. Las prostaglandinas renales parecen tener un pequeño efecto en el balance de sodio a la ingesta diaria en la dieta y en ausencia de vasoconstrictores, ya que en presencia de vasoconstrictores por estrés la síntesis de prostaglandinas o la producción combinada de eicosanoides pueden afectar la excreción de sodio.

4.3. Papel de los eicosanoides en la hipertensión arterial.

En la hipertensión arterial, por el incremento en la resistencia vascular periférica, se ha pensado en un desequilibrio entre los eicosanoides vasoconstrictores y vasodilatadores. Estudios de contracción vascular han reportado un incremento de la PGI_2 en animales hipertensos (Pace y cols., 1978) dicha prostaglandina disminuye o regresa a valores normales en vasos protegidos de hipertensión arterial por un clip, sugiriendo que el incremento en su síntesis no es específica de la reacción a la hipertensión. Martineau y colaboradores en 1984, demostraron que la dieta alta en sal produce un incremento en la síntesis corporal total de PGI_2 en ratas resistentes a hipertensión inducida por sal; en ratas sensibles a sal falta mostrar este incremento compensatorio, por lo que se ha sugerido que la causa más frecuente del incremento en la síntesis corporal total de PGI_2 y TXA_2 es por la activación plaquetaria secundaria a un daño en vasos de gran tamaño.

La vasoconstricción funcional característica de la hipertensión ocurre en el riñón, igual o mayor que en otros vasos; algunos estudios en humanos (Hollenberg y

cols., 1981) y en SHR sugieren que la vasoconstricción renal precede a la hipertensión; un posible mecanismo es un incremento en la reabsorción del sodio tubular causado por una presión capilar peritubular reducida, consecuencia de una alta fracción de filtración (Romero y cols., 1988; Arendshortst y cols., 1979). Es así que se esperaría encontrar una deficiencia en el tono vasodilatador o un incremento excesivo en la síntesis de eicosanoides vasoconstrictores en riñones de animales hipertensos. Shibouta y cols., en 1981, encontraron que las rebanadas de corteza renal de SHR jóvenes en el estadio de prehipertensión produjeron más TXA_2 que aquellas ratas Wistar Kyoto controles, 6 años después Kawaguchi, confirmó esto y encontraron menor incremento en la síntesis de PGI_2 , la tasa en la síntesis de eicosanoide vasoconstrictor (TXA_2) y vasodilatador (PGI_2) fue incrementada. Wilson y cols., en 1990, encontraron en un estudio en humanos ancianos (50-70 años de edad), con presiones arteriales de 130/80mmHg excretaban más TXB_2 después de recibir furosemide que personas jóvenes (20-30 años de edad) que mantenían presiones arteriales de 110/68mmHg, por lo que probablemente el incremento en la producción del TXA_2 renal contribuye al incremento en la resistencia vascular renal que fue observada con la edad.

4.4. Alteraciones en la producción y función de prostaglandinas en la hipertensión arterial.

Diversos estudios han demostrado que la síntesis de prostaglandinas puede estar alterada en la hipertensión arterial. Por ejemplo, se ha reportado que, de manera paralela a un incremento en el número de receptores a AI_1 , se observa una menor producción basal de prostaglandinas vasodilatadoras, así como una menor producción de PGI_2 inducida por angiotensina-(1-7), en células de músculo liso de SHR (Jaiswal y col., 1993). Así mismo, se ha reportado que el bloqueo farmacológico de receptores a prostaglandinas vasoconstrictoras, como el TXA_2 y los endoperóxidos (TxA_2/PGH_2), produce un descenso significativo de la presión arterial en ratas con hipertensión secundaria a coartación de la aorta, y este efecto se correlacionó con una elevada actividad de renina plasmática sugiriendo así que dichos prostanoides contribuyen al aumento de presión arterial en formas de

hipertensión dependientes de angiotensina (Lin y col., 1991; Mistry y Nasjletti, 1988). Este mecanismo presor mediado por prostanoïdes vasoconstrictores parece estar en contraposición con un mecanismo vasodilatador también mediado por prostaglandinas (posiblemente del tipo I₂ y E₂) (Lin y col., 1991). Los receptores a TxA₂ y PGH₂ manifiestan una elevada expresión en riñón, vasos sanguíneos y el endotelio vascular, entre otros (Welch y cols., 1996). Estos receptores han sido implicados en varios modelos experimentales de hipertensión, en los que median respuestas a prostaglandinas vasoconstrictoras producidas en los riñones y vasos sanguíneos de ratas con varias formas de hipertensión (Luft y col., 1989; Wilcox y col., 1996). En vista de que la AII constituye un estímulo fisiológico para la producción de TxA₂ y PGH₂ (Luft y col., 1989; Wilcox y Welch, 1990), es posible que, como ya se mencionó, el aumento de presión arterial en formas de hipertensión dependientes de angiotensina se explique, al menos en parte, por la producción de TxA₂ y PGH₂ y su efecto sobre el músculo liso vascular (Lin y col., 1991; Mistry y Nasjletti, 1988). De hecho, existe evidencia de una sobreproducción de prostaglandinas vasoconstrictoras en varios modelos de hipertensión como el Goldblatt (2-riñones, un clip; Wilcox y col., 1996), la SHR (Purkerson y col., 1986) y la rata infundida con angiotensina (Luft y col., 1989). Por otro lado, durante la hipertensión parece existir una actividad vasodilatadora anormal de agentes que estimulan la vía del AMP cíclico (Chatziantoniou y Arendshorst, 1992), como las prostaglandinas I₂ y E₂ (Chatziantoniou y col., 1993), lo cuál puede deberse a un defecto en el acoplamiento de sus receptores a la subunidad G_s (Ruan y col., 1999). Es probable, que los mecanismos que sufren un desequilibrio durante la hipertensión, especialmente la que depende de angiotensina, incluyan a los receptores a prostaglandinas vasoconstrictoras (TxA₂ y PGH₂) y vasodilatadoras (I₂ y E₂). Adicionalmente, es posible que el efecto modulador de la AII sobre las respuestas vasculares adrenérgicas involucre la participación de prostaglandinas vasoconstrictoras y vasodilatadoras (Figura 4). El estudio de la interacción potencial entre la AII, las prostaglandinas y el sistema adrenérgico vascular adquiere mayor relevancia en modelos de hipertensión arterial, particularmente los que dependen de angiotensina.

Como ya se sabe el AMPc es un 2do. mensajero de secretagogos de renina, como la norepinefrina, en las células granulares del aparato yuxtaglomerular y que el incremento en la concentración intracelular de AMPc induce la secreción de renina (Kurtz 1999). La PGE₂ actúa a través de 4 subtipos de receptores, los EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄, y PGI₂ que actúa sobre el receptor IP; la estimulación del EP₂ y EP₄ e IP incrementa la concentración de AMPc, sugiriendo que estos receptores podrían mediar la señal estimulante para la secreción de renina. En sentido opuesto, la estimulación del EP₁ y EP₃ conduce a un incremento en la concentración de Ca_i intracelular y una disminución en la en la concentración intracelular del AMPc respectivamente (Ushikubi y cols., 1995; Narumiva y cols., 1999), lo que sugiere que la PGE₂ y PGI₂ son mediadores de la secreción de renina actuando directamente sobre las células granulares, mientras que sus acciones *in vivo* en la regulación de la secreción de la renina no se conocen.

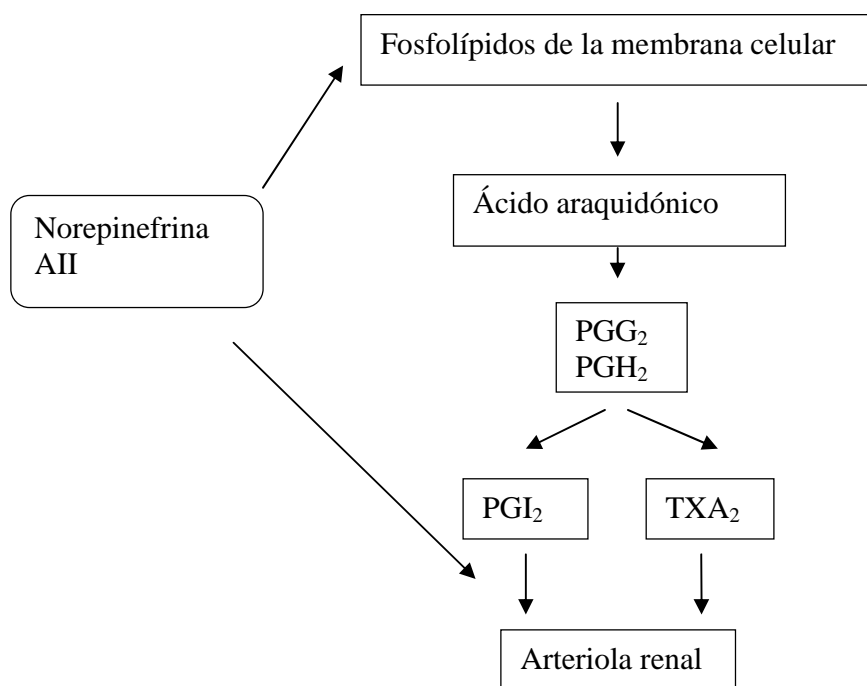


Figura 4. Relación entre el estímulo vasoconstrictor por norepinefrina o AII, vasodilatador (PGI₂) y vasoconstrictor (TXA₂).

Boulanger y cols en 1993, hacen referencia a la posibilidad de un aumento en la expresión de la COX-1 (ciclooxigenasa-1) como responsable del incremento en la síntesis de prostaglandinas y PGH₂ (endoperoxido), ya que se ha demostrado que la interleucina 2 incrementa la expresión de la COX-1 y las contracciones dependientes del endotelio al ácido araquidónico, además de que Ge y cols. en 1995, demostraron incremento en la expresión de la COX-1 en aortas de SHR. A nivel renal los cambios en la síntesis de proteínas han sido asociadas con el desarrollo de la hipertensión (Xiang y cols., 1992) y un incremento en la capacidad de respuesta vascular a AII en ratas hipertensas (Vazquez y cols., 1999), es así que estos mismos autores sugirieron en el 2000, que durante el desarrollo de la hipertensión se incrementa la expresión del RNAm de la COX-1, posteriormente la actividad de la COX-1 y el metabolismo del ácido araquidónico está aumentado, llevando a un incremento en la producción de prostaglandinas vasoconstrictoras que median la capacidad al ácido araquidónico u otros agonistas vasculares el aumento en las resistencias vasculares periféricas.

5. Hipertensión renovascular.

La hipertensión renovascular es la forma de hipertensión secundaria más frecuente, con una prevalencia del 2 al 20%, producida por una o más condiciones que interfieren con la circulación arterial hacia el parénquima renal, generando isquemia; la disminución del flujo plasmático renal por enfermedad arterial oclusiva (ejemplo: coartación de aorta, estenosis de la arteria renal), genera la activación del sistema renina angiotensina-aldosterona, agregándose posteriormente disfunción endotelial, vasoconstricción y retención salina. Para que se presenten los cambios hemodinámicos se debe tener una estenosis (disminución del calibre del vaso) entre el 80-85%, por lo que la presión de perfusión renal se reduce, la pérdida de presión de distensión o estiramiento de la arteriola aferente produce un gran aumento de la secreción de renina, con la finalidad de desencadenar mecanismos intrarenales para restaurar el flujo sanguíneo. La renina liberada por las células granulares del aparato yuxtglomerular que revisten la pared de las arteriolas aferente es controlada por

tres mecanismos: cambios en el tono vascular, cambios en la entrega tubular de sodio a la mácula densa y nervios simpáticos renales, estos sistemas pueden interactuar fisiológicamente; algunas hormonas o autacoides también pueden tener influencia en la liberación de renina (Garovic y cols., 2005). Estudios en modelos experimentales y humanos indican que existen múltiples mecanismos que contribuyen a la elevación de la presión arterial a largo plazo en presencia de una estenosis de la arteria renal, como la activación del sistema renina angiotensina, del sistema nervioso simpático, liberación de endotelina y alteraciones en la producción de óxido nítrico. Los mecanismos difieren dependiendo de si uno o ambos riñones están afectados por la lesión vascular; el modelo experimental de hipertensión renovascular fue desarrollado por Goldblatt y publicado en 1934, el modelo lleva su nombre y consiste en la colocación de un clip alrededor de una arteria renal, disminuyendo el flujo sanguíneo del riñón afectado; la estenosis unilateral de la arteria renal (>50% en ratas y 75% en perros), ha sido denominado modelo de dos riñones un clip, cuando el riñón contralateral es removido se le conoce como modelo de hipertensión un riñón un clip. Martínez y cols., en 1991, describieron la fisiopatología del modelo experimental dos riñones un clip, que se caracteriza por presentar tres fases: temprana, intermedia y tardía. Los niveles de renina varían de acuerdo a las fases, dichas variaciones pueden estar parcialmente relacionadas a los balances de volumen y de sodio; en ratas el pico de renina se produjo entre las semanas 1 y 4, retornando a valores normales en la fase tardía, así mismo la presión arterial también aumentó y fue máxima en la fase tardía (36 semanas). En relación a esta secuencia, la actividad de la renina plasmática en humanos con hipertensión renovascular no es clara, por lo que se ha sugerido que el papel del sistema renina angiotensina aldosterona en el mantenimiento de la hipertensión arterial disminuye con el tiempo. Dentro de las primeras horas de la colocación del clip, se produce un aumento de la presión arterial, la renina plasmática y los niveles de $Ang II$, durante la primera semana, las ratas muestran un balance negativo de sodio, hay una reducción importante de la excreción de sodio en el riñón con clip y un aumento en el riñón contralateral a pesar de los niveles de filtración similares. El

aumento de la presión arterial en esta fase es independiente a la ingesta de sal. Después de 4 a 12 semanas, la hipertensión entra en una fase intermedia, donde puede existir un retorno a niveles normales de la renina plasmática y de la angiotensina. Algunos reportes han mostrado sólo un mínimo efecto de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en la presión arterial, sin embargo, la presión arterial se normalizó cuando las ratas fueron tratadas con losartán durante 3 días. La mayoría de los estudios muestran que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o los antagonistas de los receptores de angiotensina disminuyen la presión arterial en esta fase, mientras que en la fase tardía, se reporta un nivel plasmático normal de renina y angiotensina con balance de sodio normal, algunas ratas desarrollan hipertensión maligna asociada con depleción crónica de sodio y niveles elevados de renina plasmática; en estas ratas crónicas la reducción aguda de la angiotensina con tratamiento, presentó un efecto moderado, mientras que cuando se administró losartán por 72hrs, la presión arterial se redujo significativamente, pero no se llegó a normalizar por completo. Todos estos estudios sugieren que el sistema renina angiotensina mantiene la presión arterial en todas las fases del modelo de hipertensión dos riñones un clip, pero existen factores adicionales que contribuyen a la hipertensión en la fase tardía, dichos mecanismos probablemente estén en relación con la actividad simpática, hormonas, cambios estructurales, funcionales en los vasos sanguíneos y el riñón. Los cambios en la actividad simpática renal, pueden contribuir a la liberación de renina como respuesta a una caída de la presión de perfusión en la estenosis de la arteria renal. Hay diferencias en cuanto al origen de dicha actividad simpática, estudios en animales sugieren que los niveles elevados de AII inducen la actividad adrenérgica, otros que los nervios aferentes renales estimulan una respuesta simpática independiente de la AII, por lo que se ha postulado que el aumento de la AII es el evento primario en la hipertensión renovascular y que posteriormente se estimula la actividad simpática (independiente de la AII), la cual puede mantener los niveles elevados de presión arterial (Martínez y cols, 1991, Chair-Vice, 2009).

Existen reportes contradictorios con relación al rol del ON en la regulación de la presión arterial en la hipertensión renovascular, sin embargo están limitados por los altos niveles de renina que se liberan en respuesta a la disminución de la presión de perfusión renal, que pueden ocultar la liberación del ON; algunos estudios han mostrado que la inhibición aguda o crónica de la óxido nítrico sintasa exacerba el aumento de la presión arterial asociada al modelo de hipertensión dos riñones un clip, se ha sugerido que el aumento del ON en la fase tardía se encuentra regulada por la angiotensina, sugiriendo que es estimulado por la hipertensión renovascular, otros reportes refieren que el ON se encuentra reducido en la hipertensión renovascular, por lo que incrementa la hipertensión (Dubey RK, y cols., 1996). Es así que el papel del ON en la regulación de la liberación de renina es probablemente pobre en la hipertensión renovascular, pudiera presentarse pequeña pero significativa interacción del ON con la actividad de renina plasmática en el mantenimiento de la hipertensión a través del tiempo.

II. JUSTIFICACIÓN

Desde hace algunos años se ha reportado interacción entre el sistema renina angiotensina y el sistema adrenérgico en el desarrollo de la hipertensión arterial, ya que la All induce la expresión de receptores adrenérgicos en células del músculo liso vascular; sin embargo, aún no se conocen todos los mecanismos involucrados, la mayor parte de los estudios se han realizado en cultivos de células y experimentos de contracción vascular, en donde se refiere como grupo a los receptores adrenérgicos α_1 , pero la evidencia relacionada con la interacción de los subtipos adrenérgicos α_1 con All es pobre, la mayor parte han sido realizados en una fase aguda, por lo que evaluar su papel durante diferentes etapas (7 y 14 días) en el desarrollo de la hipertensión dependiente de All como es la coartación de aorta, nos proporcionaría información importante entre dicha interacción, tanto en estudios funcionales como de biología molecular, para conocer su relevancia en la fisiopatogenia y mantenimiento de la hipertensión arterial, así como su relación con otros sistemas involucrados en la hipertensión arterial, como la producción de eicosanoides.

III. HIPÓTESIS

Los niveles elevados de All en el modelo de hipertensión inducido por coartación de la aorta promueve la expresión y función de los receptores adrenérgicos α_1 vasculares, particularmente del subtipo α_{1D} .

IV. OBJETIVOS.

a. OBJETIVO GENERAL

Analizar la influencia de la hipertensión renovascular sobre las respuestas vasoconstrictoras adrenérgicas α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} en un modelo de hipertensión dependiente de angiotensina en la rata, y dilucidar los mecanismos involucrados.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un modelo de hipertensión renovascular mediante la coartación de la aorta a nivel interrenal.
2. Determinar la participación relativa de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} en las respuestas presoras adrenérgicas α_1 en ratas anestesiadas con operación simulada (OS) y en hipertensas con coartación de la aorta a los 7 (CA7) y 14 días (CA14).
3. Analizar el efecto de la hipertensión arterial dependiente de angiotensina sobre la expresión (RNA mensajero (RNAm) y proteína) de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} en la aorta y arteria caudal de ratas con OS, CA7 y CA14.
4. Caracterizar la posible participación de la PGE_2 , PGI_2 y TXA_2 en el efecto de la coartación de la aorta en ratas anestesiadas con OS, CA7 y CA14.
5. Determinar los niveles de All en ratas con OS, CA7 y CA14.
6. Conocer los posibles cambios histológicos inducidos por la coartación de la aorta a los 7 y 14 días, a nivel del corazón , riñones y arteria aorta.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300g de peso corporal) que tenían una presión arterial sistólica <140mmHg y presión arterial diastólica < 100 mmHg. Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales bajo condiciones estables de humedad y temperatura, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos y protocolos experimentales cumplieron con las Regulaciones Federales para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav-IPN.

V.2. Cirugía (coartación de la aorta)

Los animales fueron divididos en tres grupos, a uno de los grupos se les realizó una operación simulada, que consistió en la realización de una laparotomía con incisión en la línea media bajo anestesia con una mezcla de ketamina y xilazina (100 y 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) previa técnica de asepsia y antisepsia, sin realizar coartación de la aorta a nivel interrenal. Los otros dos grupos también fueron sometidos a la misma cirugía, pero se realizó coartación de la aorta a nivel interrenal, para lo que se utilizó seda simple 000 y un dispositivo romo (aguja calibre 21) que se colocó paralelamente a la aorta, para disminuir su calibre, dicho dispositivo se retiró una vez realizada la ligadura (ver figura 5). Uno de estos grupos fue estudiado a los 7 días posteriores a la cirugía y el otro a los 14 días (CA7 y CA14 respectivamente).

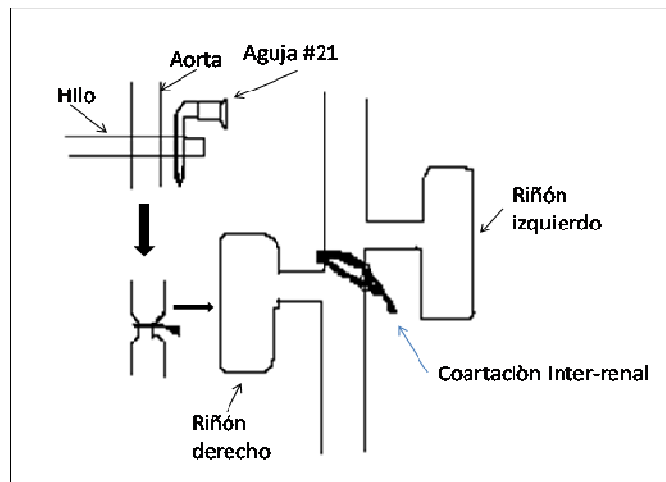


Figura 5. Coartación de la aorta inter-renal.

V.3. Medición de la presión arterial

Se midió la presión arterial de todos los animales en 2 ocasiones en diferentes días antes de la cirugía para corroborar valores normales de presión arterial, mediante un método pletismográfico no invasivo; para ello, los animales se colocaron en un CCPD de acrílico a una temperatura de 42°C; después de un período de estabilización, se colocó un sensor y un “manguito” en la cola de los animales, el cual estaba conectado a un equipo de medición no invasiva de la presión arterial (Panlab, Barcelona, España). En las ratas coartadas la disminución del flujo sanguíneo en la cola no permitió la medición de la presión arterial por pletismografía, por lo que fue determinada invasivamente bajo anestesia, con la colocación de una cánula de polietileno (PE-50) en la arteria carótida izquierda y se registró mediante un sensor conectado a la computadora, a los 7 y 14 días de la coartación. La presión arterial de las ratas con OS fue determinada tanto por el método invasivo como no invasivo.

V.4. Experimentos agudos de presión arterial (*in vivo*)

Después de 7 y 14 días de la cirugía, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p. para inducción, y 18-24 mg/kg/hora, i.v. para mantenimiento) y se colocó una cánula de polietileno en la tráquea con el fin de proporcionar respiración asistida mediante una bomba de presión positiva (Ugo

Basile; 60 ciclos/min; volumen de 20 ml/kg). Posteriormente se insertó una cánula de polietileno (PE-50) en la arteria carótida izquierda y otra en cada vena femoral (PE-10) para el registro de la presión arterial y la administración de fármacos y anestésico, respectivamente. Con el fin de abolir los reflejos cardiovasculares desencadenados por incremento de presión arterial producido por los agonistas adrenérgicos, ambos nervios vagos fueron seccionados. (Figura 6).



Figura 6. Rata anestesiada con traqueostomía, ventilación mecánica, canulada en la arteria carótida izquierda y venas femorales, para el registro de la PAD y administración de fármacos.

V.5. Protocolos experimentales relativos a cada objetivo específico.

Objetivo específico 2. Determinar la participación relativa de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} en las respuestas presoras α_1 adrenérgicas en ratas anestesiadas con OS, CA7 y CA14.

Protocolo Experimental. Después de un período de estabilización de 10-15 min, se administraron vehículo o los antagonistas adrenérgicos α_1 permitiendo un lapso

de 10-15 min entre cada uno. Después de un período adicional de 10-15 min, se construyó una curva dosis-respuesta (D-R) a noradrenalina (0.01-310 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) y A-61603 (agonista α_{1A} ; 0.001-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) en animales que habían sido tratados con vehículo (1 ml/kg, i.v.), BMY-7378 (antagonista selectivo α_{1D} ; 1 mg/kg, i.v.), cloretilclonidina (antagonista α_{1B} ; 10mg/Kg, i.v.) y RS-100329 (antagonista selectivo α_{1A} ; 0.5 mg/kg, i.v.). Se construyó una curva D-R en cada animal. En los experimentos con noradrenalina los animales se trataron sistemáticamente con propranolol y rauwolscina (1 mg/kg, i.v. cada uno) para prevenir la acción del agonista sobre los receptores adrenérgicos β y α_2 , respectivamente. La potencia de los agonistas fue estimada mediante el cálculo de la dosis efectiva 50 o DE_{50} para los efectos presores.

Objetivo específico 3. Caracterizar la participación de las prostaglandinas E_2 , I_2 y TXA_2 , en el efecto de la coartación aórtica en ratas hipertensas a los 7 y 14 días.

Protocolo Experimental.

Para la medición urinaria de los metabolitos de las prostaglandinas E_2 , TXA_2 e I_2 (PGE_2 , TXB_2 y 2,3 dinor 6 ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ respectivamente), recolectamos la orina de 24 h de 6 ratas de cada grupo (OS, CA7 y CA14) utilizando cajas metabólicas, una vez obtenida la orina utilizamos para la determinación de las prostaglandinas y el tromboxano, un kit comercial de inmunoensayo enzimático (EIA, Cayman Chemical Company, Ann Arbor) específico para cada prostanoide, la dilución de la orina utilizada fue de 1:40. Se preparó la curva estándar en buffer EIA, posteriormente, las soluciones del kit y las diluciones de orina, fueron colocadas en los pozos de la placa, en la siguiente secuencia: 100 μl de buffer EIA en los pozos llamados unión no específica (NBS), 50 μl de buffer EIA a los pozos de unión máxima (Bo), posteriormente se agregó 50 μl de las diferentes concentraciones del estándar de PGE_2 o TXB_2 o 2,3 dinor 6 ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ en los pozos destinados para este fin; en los pozos restantes se agregó 50 μl de la muestra a estudiar por pozo (orina) y por duplicado. Posteriormente se puso 50 μl de la PGs acoplada a la acetilcolinesterasa para PGE_2 ó TXB_2 ó 2,3 dinor 6 ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ a cada pozo (excepto los pozos llamados de

actividad total y los blancos), se administró a cada pozo 50µl del anticuerpo monoclonal para la PGE₂ o TXB₂ o 2,3 dinor 6 ceto prostaglandina F_{1α} (excepto en los pozos llamados blanco, de actividad total y NSB. La placa fue cubierta, se incubó durante 18h a 4 °C, al final, se lavó cinco veces cada uno de los pozos con buffer de lavado, después se agregó 200µl/pozo de reactivo de Ellman y 5µl/pozo del trazador en los pozos llamados de actividad total. La placa se cubrió con un plástico y se agitó durante 60 a 90 minutos, posteriormente se retiró el plástico y se realizó la lectura de cada pozo con un lector de ELISA entre 405 y 420 nm, cuando los pozos B₀ fueron ≥ 0,7 UA. (Figura 7).

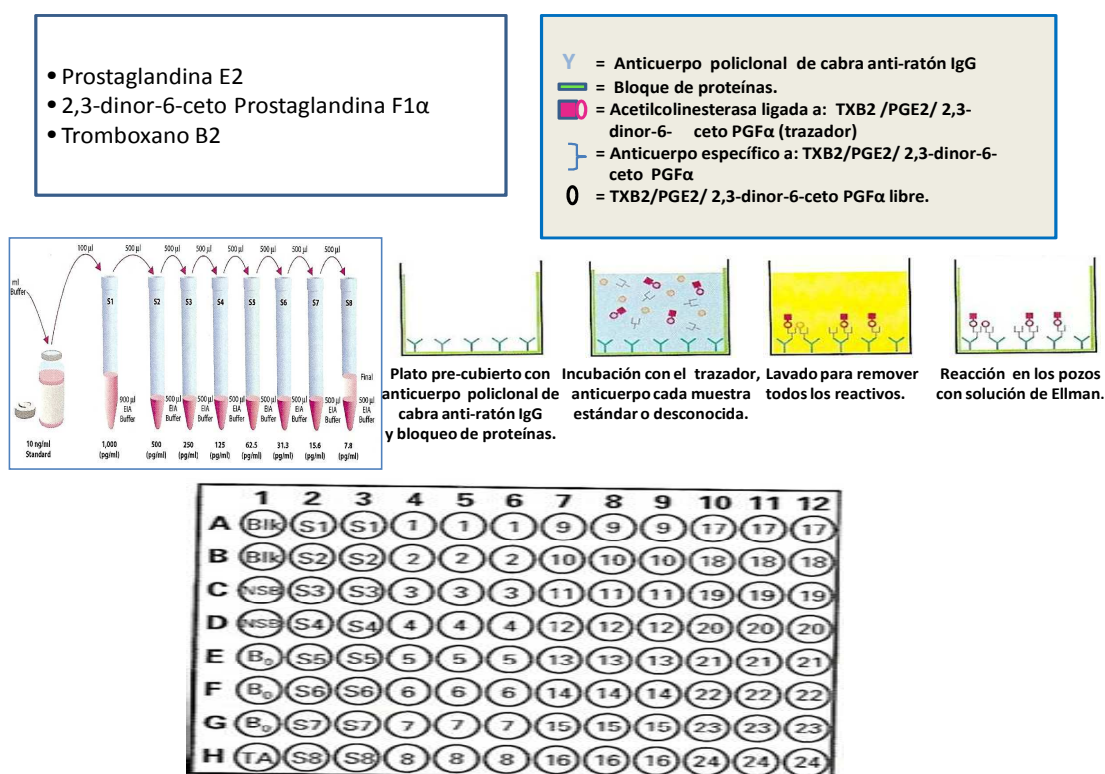


Figura 7. Determinación de prostanoïdes en orina.

Objetivo específico 4. Analizar el efecto de la hipertensión arterial dependiente de angiotensina sobre la expresión (RNAm y proteína) de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} en la aorta y arteria caudal de la rata.

Protocolo experimental.

Experimentos de Western blot

Animales de los tres grupos: OS, CA7 y CA14, fueron sacrificados, las arterias caudal y aorta se disecaron y extrajeron, inmediatamente se homogenizaron con un Polytron en solución RIPA (RIPA, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA: C10H16N2O8) 500µm, inhibidores de proteasas (mini complete, número 11836153001, Roche Applied Science) SDS 10%), el volumen utilizado fue de 700µl para ambos vasos, pero en el caso de la arteria caudal por su tamaño pequeño se hizo un pool constituido por las arterias de 3 ratas. Se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, del sobrenadante se recuperaron 3 alícuotas de 100µl, una de ellas se utilizó para la determinación de proteínas por el método de Lowry. A cada 100µl del sobrenadante se le agregó 10µl de buffer de carga (Buffer Laemly 450 µl, 50µl de β mercaptoetanol) y 10µl de urea al 10%, se desnaturalizaron las proteínas (100°C durante 10 minutos), posteriormente se colocaron en hielo y cantidades iguales de proteína (100 µg) se cargaron sobre un gel de electroforesis de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio al 10% (H₂O, acrilamida al 30%, Tris (hidroximetil), SDS 10%, persulfato de amonio 10%, TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina), en el primer pozo se colocó 3µl del marcador de peso molecular (Rainbow; Amersham), las proteínas fueron separadas por electroforesis a 88 Volts durante 2 horas, después se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinildieno por 50min a 18 Volts utilizando transferencia semiseca (BioRad). Se bloquearon las membranas por 1 hora a temperatura ambiente en una solución de leche baja en grasa al 5% en TBS-Tween (TBST), sobre un agitador; transcurrido el tiempo, se desechó la leche y se le agregó el anticuerpo policlonal de conejo contra los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1D} (~72 kDa, dilución 1:3000), α_{1B} (~60 kDa, dilución 1:3000) (Villalobos-Molina y cols., 2008; Garcia-Sainz y cols., 2001), o anticuerpo policlonal de conejo contra β-actina (~43 kDa; dilución 1:1000) (anticuerpo policlonal IgG contra β-actina sc-1615, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), en solución TBS-Tween (TBST) con leche al 5%, sobre un agitador durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se desechó la leche y se realizaron 3 lavados con solución

TBST sobre un agitador durante 10 min a temperatura ambiente, a su término se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano anti-conejo 1:10,000 sobre un agitador, por dos horas a temperatura ambiente, y fueron lavadas en 3 ocasiones con TBST. Las membranas fueron incubadas con sustrato de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) de acuerdo con el protocolo del fabricante y expuestas a un film para su revelado inmediato (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). El film fue escaneado con un scanner ScanJet 3200C y grabado en una computadora, donde la intensidad de las bandas se midió con el programa Quantity One 1D Image Analysis Software (BioRad) y se normalizó con la intensidad de la β -actina (proteína control), (Figura 8).

Método de Lowry para cuantificación de proteínas.

Se tomaron 5 μ l de una alícuota del sobrenadante del tejido homogenizado y centrifugado, se colocaron en un tubo eppendorf con 495 μ l de agua ultra pura, se agitaron, y se tomaron 200 μ l para cada tubo (se realizó por duplicado), al mismo tiempo se realizó una curva standard de 0 a 50 μ g con albúmina, a todas las muestras incluyendo las de albúmina se les agregó 1ml de solución C, que está constituida por una combinación de la solución A (carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0.4%, tartrato de sodio y potasio 0.02%) y solución B (sulfato de cobre penta-hidratado 0.5%), en una proporción de 50ml de solución A y 1ml de solución B, se agitaron e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, después se les adicionó 100 μ l de solución Folin (agua ultra pura + reactivo de Folin 1:1), se incubó a temperatura ambiente durante 30min, transcurrido el tiempo se transfirieron las muestras en cubetas para su lectura en un espectrofotómetro a 750nm (con lámpara de luz visible), con los resultados se construyó una gráfica de correlación con la finalidad de obtener la cantidad de proteínas que contiene cada μ l de la muestra.

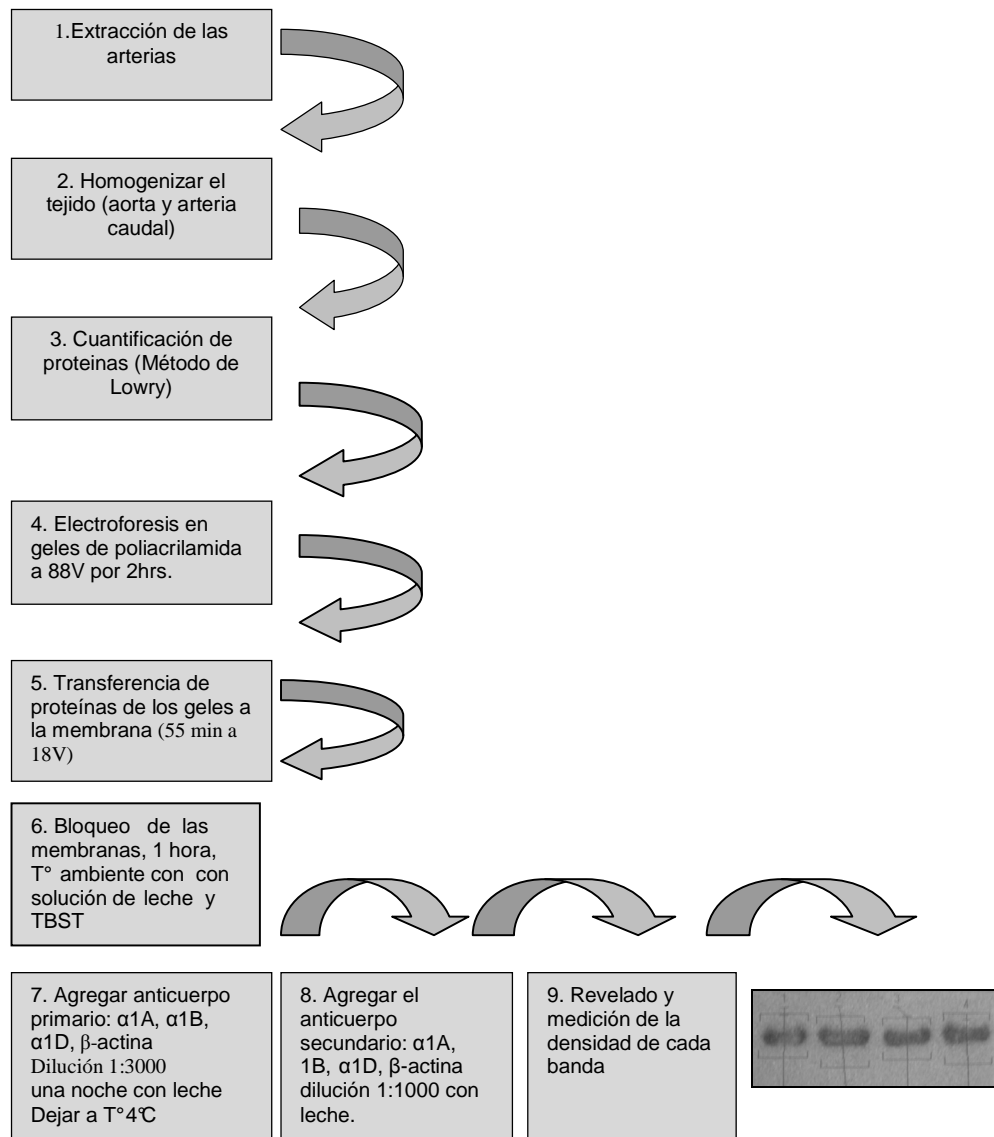


Figura 8. Análisis de la expresión de las proteínas de los subtipos de receptores adrenérgicos α 1 por el método de Western blot.

Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa – transcriptasa reversa (RT-PCR)

El RNA total se extrajo de las arterias aorta y caudal de ratas de los tres grupos (OS, CA7 y CA14), para ello, el tejido se homogenizó con un polytron en 1ml de trizol (Invitrogen) por cada 100mg de tejido para su separación se incubaron las muestras por 5 min a 15 a 30°C para permitir la completa disociación de los

complejos de nucleoproteínas, se agregaron 0.2ml de cloroformo por 1 ml de trizol, los tubos se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a 15-30°C durante 3 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12000 Xg por 15 min a 2-8°C, separándose la muestra en tres fases, de las cuales la superior (fase acuosa) se extrajo y se colocó en otro tubo, donde se administró 2µl de glucógeno (concentrado de 5 mg/ml), el RNA fue precipitado con la administración de alcohol isopropílico (0.5ml de alcohol por cada 1ml de trizol), se agitaron manualmente y se incubaron a 15-30°C por 10 min, se centrifugaron a 12000 Xg durante 10 min a 2-8°C (el RNA precipitado formó un botón en el fondo del tubo). Para lavar el RNA, se removió el sobrenadante y se lavó con 1ml de etanol al 75% en agua DEPC por cada ml de trizol usado, se mezclaron las muestras con el vórtex y se centrifugaron a 7500 Xg durante 5 min a 2-8°C, se retiró el etanol y se dejó secar el RNA a temperatura ambiente en un lugar estéril (25min). Para la resuspensión del RNA se agregó agua libre de RNAasas (agua DEPC), se utilizaron 50µl para arteria aorta y 30µl para la arteria caudal. Se verificó la pureza del RNA (5µl de la muestra con RNA + 495µl de agua DEPC) mediante su cuantificación con un espectrofotómetro a 260 y 280 nm, siendo adecuado un cociente $\geq 1.6 \leq 2$. La integridad del RNA se valoró mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 3µl de bromuro de etidio, donde se cargaron 5µl de muestra en cada carril del gel, se corrió a 100 Volts por una hora en una caja de electroforesis, se verificó la presencia de dos bandas de RNA correspondientes a las subunidades 28s y 18s en un transiluminador). Para obtener el cDNA se tomaron 2µg del RNA total y se colocó en un tubo estéril para PCR, agregándole 1µl de oligo (dT) (0.5 µg/µl), se completó un volumen de 12µl con agua DEPC, se incubó en un termociclador (Gene Cyler; BioRad, Hercules, CA, USA) a 70°C por 10 min, a 4°C por 5 minutos agregándole 7µl de una mezcla de: 2µl de buffer PCR 10X, 1µl MgCl₂ 50mM, 1µl oligo (dT), 1µl dNTP mix 10mM, 2µl DTT 0.1 M, 1µl de agua DEPC por muestra, se incubó a 42°C por una hora (a los 6 minutos se agregó la enzima retrotranscriptora: Super Script II RT, (Invitrogen Life Technologies), se incubó a 70°C por 15 min y a 4°C. Para la amplificación del cDNA (2 µl) se utilizaron "primers" específicos; para el cDNA del receptor adrenérgico α_{1A} , el "primer"

sentido fue 5'-GTA GCC AAG AGA GAA AGC CG-3' (extendiéndose de las bases 628 a la 647), y el "primer" antisentido fue 5'-CAA CCC ACC ACG ATG CCC AG-3' (extendiéndose de las bases 820 a la 839), Scofield y col., en 1995. Para la amplificación del cDNA del receptor adrenérgico α_{1B} , el 'primer' sentido fue 5'-GCT CCT TCT ACA TCC CGC TCG-3' (extendiéndose de las bases 629 a la 649) y el "primer" antisentido fue 5'-AGG GGA GCC AAC ATA AGA TGA-3' (extendiéndose de 908 a 928), y para la amplificación del cDNA del receptor adrenérgico α_{1D} , el 'primer' sentido fue 5'-CGT GTG CTC CTT CTA CCT ACC-3' (extendiéndose de las bases 759 a la 779) y el "primer" antisentido fue 5'-GCA CAG GAC GAA GAC ACC CAC-3' (complemento de nucleótidos 1042-1062), el cDNA de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue el control de cada muestra y se utilizó para normalizar los productos de amplificación (Chen y col., 1998), el "primer" sentido fue 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (extendiéndose de las bases 562 a la 581), y el "primer" antisentido fue 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (complemento de nucleótidos 1013-1032), la secuencia de los primers fue la reportada por Scofield y col., en 1995. La PCR se realizó con un kit de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), se mezcló 2 μ l de cDNA, 1 μ l del primer sentido, 1 μ l del primer antisentido, 5 μ l de buffer PCR 10X, 1.5 μ l de MgCl₂ 25mM, 1 μ l de dNTP mix 10mM, 0.5 μ l polimerasa de DNA y 38 μ l de agua destilada, se incubaron en un termociclador 1 min a 94°C, reconocido a 58°C (receptor α_{1B} y α_{1D}) o a 50°C (receptor α_{1A}) durante 1 min, su extensión fue a 72°C por 1 min, durante 35 ciclos, posteriormente se incubó a 72°C por 10min y a 4°C por 5 minutos, una vez listas las muestras se corrió un gel de agarosa al 2% con 4 μ l de bromuro de etidio por electroforesis, donde se cargaron 5 μ l de cada muestra por carril, en uno se colocó 3 μ l de escalera de DNA, la corrida fue por 1 hora a 100 Volts; finalizado el tiempo, el gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta, identificándose las bandas correspondientes al receptor α_{1A} de 212 pares de bases de longitud, α_{1B} de 300 pares de bases de longitud, α_{1D} de 304 pares de bases de longitud y GAPDH de 452 pares de bases de longitud, se digitalizaron las bandas y se midió su intensidad por densitometría con el programa Quantity One 1D Image Análisis Software (BioRad). (Figura 9).

Objetivo específico 5. Determinar los niveles de All en ratas con OS, CA7 y CA14.

Protocolo experimental.

Determinación de la concentración plasmática de All mediante inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA).

Para medir las concentraciones plasmáticas de All, recolectamos 3 ml de sangre de la vena cava por punción con jeringas heparinizadas y se colocaron en tubos con EDTA que estaban en hielo para mantener una temperatura de 4°C, se les agregó un cóctel de inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la All. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 g durante 20 minutos a 4 ° C para obtener el plasma. Para la extracción de All, 2 ml de plasma fueron pasados a través de las columnas de extracción con un prelavado con 1 ml de metanol, seguido de 1 ml de agua, posteriormente se lavaron estos con 1 ml de agua, se recuperaron los péptidos de angiotensina con 0,5 ml de metanol, y por evaporación se secaron con una corriente de nitrógeno, más tarde, se agregaron 0,5 ml de buffer EIA, se mezclaron y centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos a 4 ° C. Los niveles plasmáticos de All se midieron utilizando un kit comercial para su determinación (SPIBIO, Francia). Se destapó la placa con 96 pozos incluida en el kit, y se lavó cinco veces con buffer de lavado (300µl/pozo), después de eliminar el buffer de los pozos invirtiendo la placa y sacudiéndola, se inició el llenado de los pozos de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se realizó una curva estándar de All, se agregaron 100µl de buffer EIA a los pozos denominados unión no específica (NSB), en los siguientes pozos se colocó el estándar de la All (100µl/pozo) por duplicado, después se agregaron las muestras (100µl/pozo) por duplicado a los pozos correspondientes. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, después se puso 50µl de glutaraldehído a cada pozo, con excepción de los pozos en blanco y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, más tarde se dispensó 50µl de borano-trimetilamina a cada pozo (con excepción de los pozos en blanco) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, al final lavamos cinco veces con el buffer de lavado (300µl/pozo), se retiró

el líquido de los pozos mediante la inversión de la placa, se agregó 100µl de IgG anti-A11 acoplado a acetilcolinesterasa a cada pozo, excepto los pozos blanco, la placa fue cubierta con una película de plástico y se incubaron toda la noche a 4 ° C. Después, los pozos se lavaron cinco veces con el buffer de lavado (300µl/pozo) se retiró el líquido de los pozos invirtiendo la placa y sacudiéndola, se agregó 300µl de buffer de lavado en cada pozo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, más tarde otra vez los pozos fueron lavados cinco veces con el buffer de lavado (300µl/pozo), se vació la placa, y se pusieron 200µl de reactivo de Ellman a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente la placa y se agitó, evitando su exposición a la luz, cubriéndola con una lámina de aluminio, finalmente se realizó la lectura de los pozos con un lector de ELISA entre 405 y 414 nm.

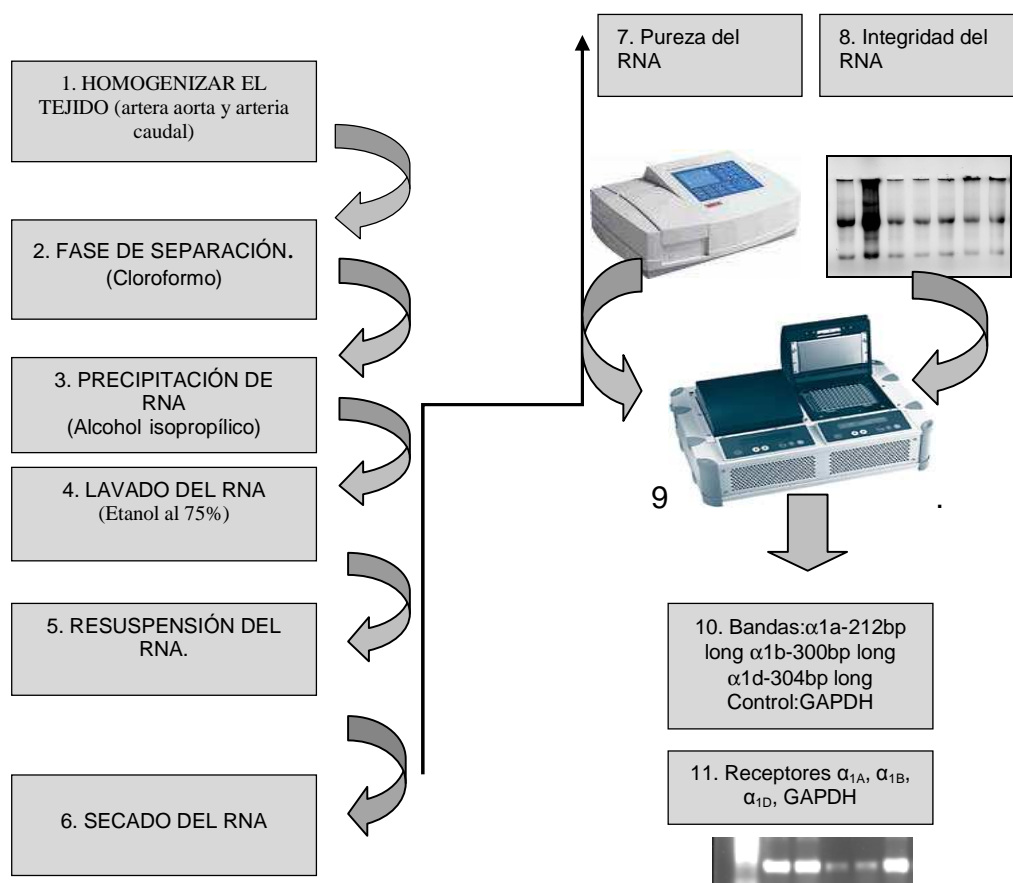


Figura 9. Análisis de la expresión del RNA de los subtipos de receptores adrenérgicos α 1 por el método de RT-PCR.

Objetivo específico 5. Conocer los cambios histológicos en la aorta, corazón y riñones de ratas con OS, CA7 y CA14.

Protocolo experimental.

Para la extracción de los tejidos (aorta, corazón y riñones) se sacrificaron 3 ratas de cada grupo (OS, CA7 y CA14) utilizando una dosis letal de pentobarbital, inmediatamente se realizó una incisión de tórax a abdomen, se disecaron y extrajeron los tejidos en un solo bloque, se lavaron con solución de PBS 0.1M para eliminar los restos de sangre, posteriormente se inyectó formol al 10% en corazón y riñones, se introdujeron en frascos que contenían formol al 10% y se dejaron durante 8 días para su fijación. Pasado el tiempo, se realizó una comparación anatomopatológica de todos los tejidos, se procedió a separarlos y realizar cortes de cada uno de los tejidos, se dejaron 24hrs más en un frasco que contenía formol al 10%, transcurrido el tiempo se eliminó el fijador y se deshidrató la muestra, para lo que se utilizó alcohol etílico inicialmente al 50 %, luego una solución de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% hasta llegar progresivamente hasta el alcohol al 100% para eliminar el agua de los tejidos, una vez deshidratado el tejido, se colocaron los tejidos en un recipiente con xilol para su aclaramiento. Posteriormente para realizar los cortes se realizó la inclusión de los tejidos en parafina líquida, colocando las muestras del tejido en un recipiente y se le agregó parafina a 60° C, la deshidratación, el aclaramiento y la inclusión de los tejidos se realizaron mediante un procesador automático (procesador automático de tejido Leica TP 1020) el tiempo de dicho procedimiento fue de 2 horas, manteniendo la temperatura a 60° C, después se colocó la pieza y un poco de parafina fundida en un molde de metal forma rectangular y se dejó solidificar colocando los moldes sobre una plancha fría a 0°C, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido (taco), De cada bloque se realizaron cortes con un espesor de 4µ utilizando un microtomo (microtomo Leica RM2125, microsystems). Los cortes se colocaron sobre portaobjetos, la parafina se eliminó con xilol, y la muestra se rehidrató pasándola por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución 100% de agua, ya hidratado se realizó la tinción con hematoxilina y eosina, una vez teñido se deshidrató nuevamente el

tejido para montarse sobre el portaobjetos. Una vez montados los tejidos en los portaobjetos se revisaron con un microscopio de luz (microscopio Nikon eclipse 80) a 10X, 20X y 40X.

V.6. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los valores de presión arterial (mm Hg) fueron obtenidos directamente del registro de los experimentos mediante el programa Acknowledge 3.8.1. y un software creado por el Dr. Carlos Hoyo, CINVESTAV. En todos los casos se determinaron los valores basales de presión arterial bajo las diferentes condiciones. Todos los datos se tabularon y se graficaron utilizando los programas de Excel y Prism GraphPad 5, respectivamente. Las comparaciones de las curvas D-R a los agonistas bajo las diferentes condiciones se realizaron mediante un análisis de varianza de dos vías para medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni para determinar diferencias. Asimismo, los valores de la dosis efectiva 50 (DE_{50}) y del efecto máximo (E_{max}) de los agonistas bajo condiciones control y en presencia de los antagonistas en los diferentes grupos de animales se obtuvo mediante un análisis de regresión no lineal empleando el programa Prism GraphPad 5. Los valores basales de presión arterial antes y después de los tratamientos farmacológicos fueron comparados mediante un ANOVA de una vía seguida de la prueba de Bonferroni. Finalmente, los niveles de expresión del RNA mensajero y la proteína de los receptores en los diferentes grupos se compararon mediante un análisis de varianza seguida de prueba de Bonferroni; esta misma prueba se utilizó para comparar el diámetro y grosor de la arteria aorta, los niveles plasmáticos de All y PGE2, PGI2 y TXB2 en orina. En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el nivel de significancia fue $p \leq 0.05$ (dos colas).

V.7. Fármacos utilizados.

Los fármacos utilizados en el presente estudio fueron los siguientes: bitartrato de noradrenalina, clorhidrato de A-61603, clorhidrato de propranolol, clorhidrato de rauwolscina, clorhidrato de BMY-7378, clorhidrato de RS-100329 y clorhidrato de cloroetilclonidina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.). Los compuestos fueron disueltos en solución salina al 0.9% y se prepararon soluciones nuevas para cada experimento. Este vehículo no tuvo ningún efecto sobre la presión arterial basal y la frecuencia cardíaca. El ácido ascórbico (1%) se utilizó para evitar la oxidación de la noradrenalina.

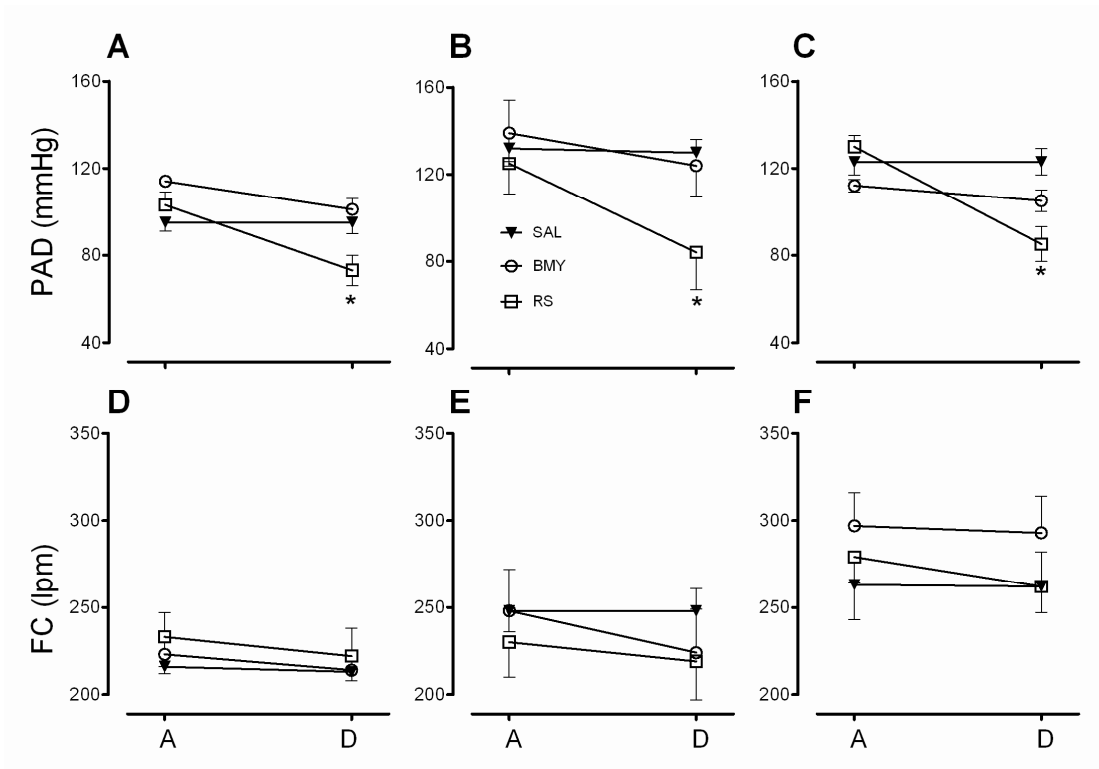
VI. RESULTADOS

1. Presión arterial diastólica, frecuencia cardíaca y peso de los animales de experimentación.

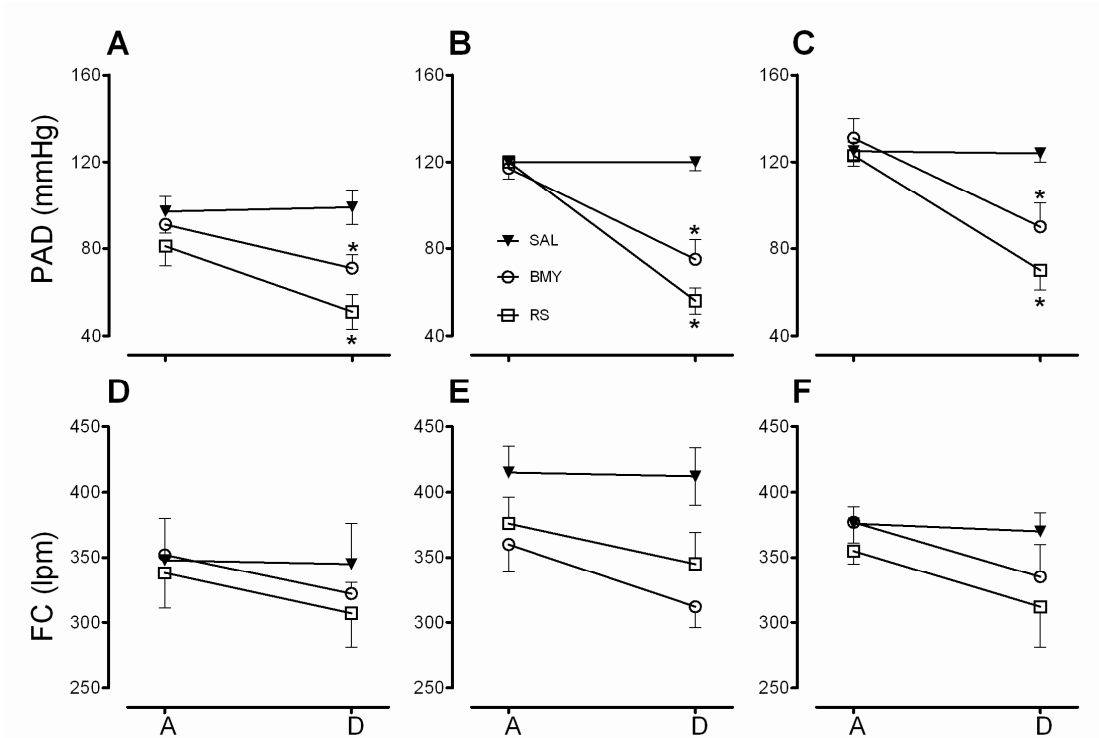
Los valores basales de la presión arterial diastólica y la frecuencia cardíaca en ratas con OS (101 ± 2 mm Hg y 366 ± 9 lpm), CA7 ($132 \pm 4^*$ mm Hg y 372 ± 17 lpm; * $P < 0.05$ vs OS) y CA14 ($136 \pm 2^*$ mm Hg y $415 \pm 11^{**}$ lpm; * $P < 0.05$ vs OS; ** $P < 0.05$ vs OS y CA7) indican que la coartación de la aorta por 7 días (CA7) y 14 días (CA14) fue suficiente para inducir un incremento significativo en la presión arterial comparado con los animales control (OS). Los valores de la presión arterial diastólica en animales con CA14 no fueron significativamente más altos que de las ratas con CA7.

No se observó una diferencia significativa en el peso de los animales en los tres grupos (OS: 275 ± 2.72 g, CA7: 277 ± 5.2 g y CA14: 290 ± 15.3 g).

El efecto de los tratamientos farmacológicos en la presión arterial diastólica y la frecuencia cardíaca en animales con OS, CA7 y CA14 que recibieron noradrenalina y A-61603 se muestran en la gráfica 2 y 3, respectivamente. Los valores basales de la presión arterial diastólica y la frecuencia cardíaca fueron significativamente disminuidos por propranolol y rauwolscina en OS y CA14; estos fármacos disminuyeron significativamente la frecuencia cardíaca pero no la presión arterial diastólica en CA7. La administración subsecuente de solución salina o BMY-7378 falló para modificar la presión arterial diastólica y la frecuencia cardíaca en los tres grupos de animales; en contraste, el tratamiento con RS-100329 produjo una fuerte y significativa disminución en la presión arterial diastólica sin cambios en la frecuencia cardíaca (Gráfica 2). El tratamiento con propranolol y rauwolscina fue omitido para animales que recibieron A-61603 debido a que es un agonista selectivo para el receptor adrenérgico α_{1A} (Knepper y cols., 1995). La administración de BMY-7378 produjo una disminución significativa de la presión arterial diastólica con una disminución modesta, pero no significativa de la frecuencia cardíaca en los tres grupos de ratas (Gráfica 3); de forma similar, el RS-100329 produjo un efecto hipotensor, el cual fue mayor que el inducido por el BMY-7378, además de una disminución modesta, pero no significativa de la frecuencia cardíaca (Gráfica 3).



Gráfica 2. Valores basales de presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) antes (A) y después (D) de la administración i.v. de solución salina (SAL, 1 ml/kg), BMY-7378 (BMY, 1 mg/kg) o RS-100329 (RS, 0.5 mg/kg) en ratas con operación simulada (A,D), o coartación de la aorta por 7 (B,E) y 14 días (C,F) que recibieron noradrenalina. * P < 0.05, A vs D. n= 6-9 ratas por grupo por cada fármaco administrado: vehículo, BMY-7378 y RS-100329.



Gráfica 3. Valores basales de presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) antes (A) y después (D) de la administración i.v. de solución salina 0.9% (SAL, 1 ml/kg), BMY-7378 (BMY, 1 mg/kg) o RS-100329 (RS, 0.5 mg/kg) en ratas con operación simulada (A,D),o coartación de la aorta por 7 (B,E) y 14 días (C,F) que recibieron A-61603. * $P < 0.05$, A vs D. $n = 6-9$ ratas por grupo por cada fármaco administrado: vehículo, BMY-7378 y RS-100329.

VIII. Estudios funcionales dosis-respuesta.

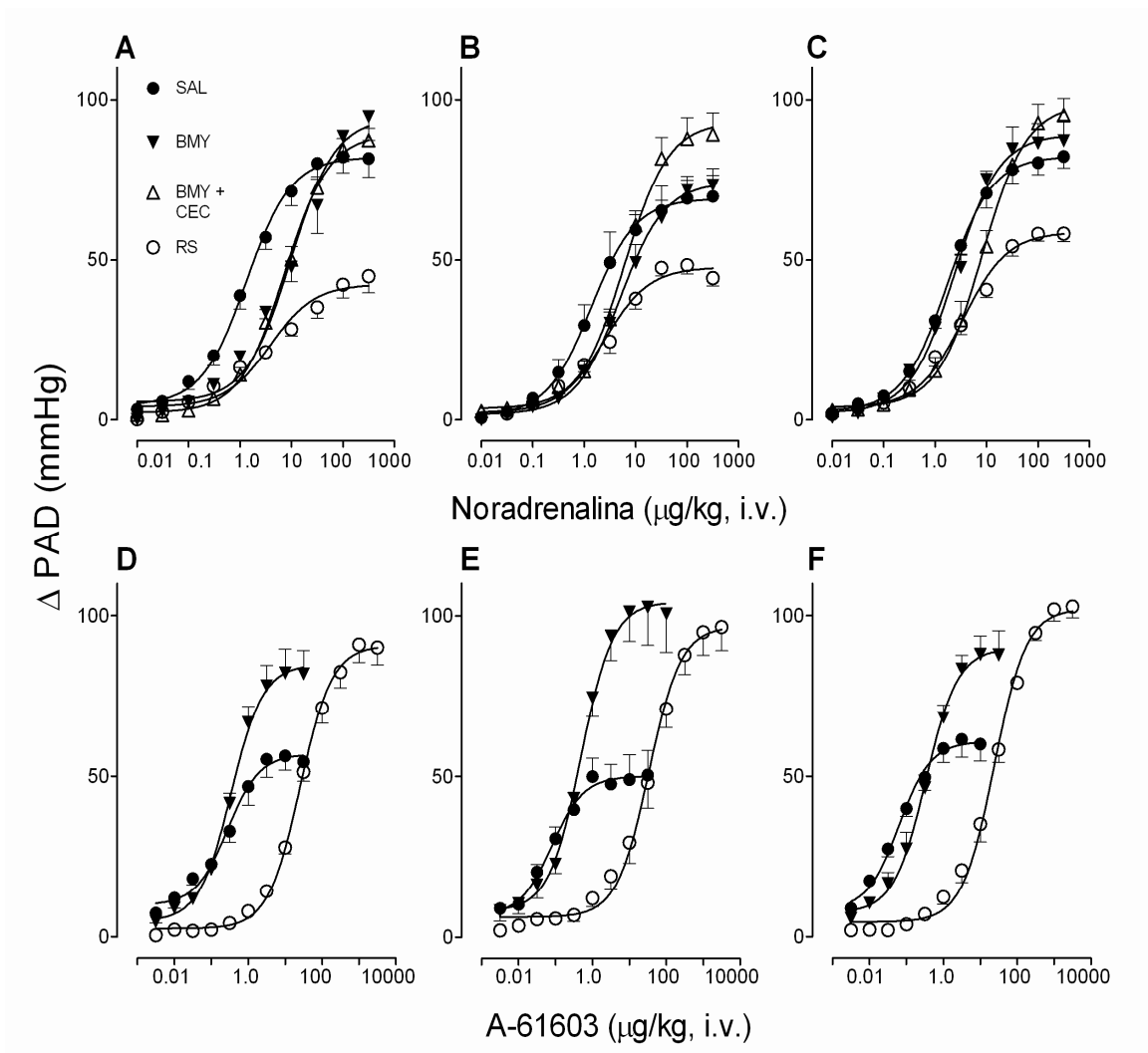
Los efectos de los tratamientos farmacológicos en las respuestas presoras inducidas por noradrenalina en ratas con OS, CA7 y CA14 se muestran en la gráfica 4 y tabla 3. La potencia presora de la noradrenalina (DE_{50} ; tabla 3) no fue diferente en los tres grupos. Como se esperaba, el BMY-7378 produjo un importante desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta a noradrenalina en animales con OS (Gráfica 4); sin embargo el antagonista causó una modesta inhibición o ningún efecto en las respuestas inducidas por noradrenalina en ratas con CA7 y CA14 (Gráfica 4), respectivamente; este efecto del BMY-7378 fue reflejado como un incremento significativo en la DE_{50} para

noradrenalina en animales con OS, pero no en ratas con CA7 y CA14 (tabla 3). En el caso del RS-100329, el fármaco inhibió las respuestas inducidas por noradrenalina en las ratas de los tres grupos (Gráfica 4) con un efecto mayor en animales con OS; el efecto del RS-100329 fue observado como un cambio marginal a la derecha de la curva dosis-respuesta a noradrenalina, además de una disminución importante del efectos presor máximo (Gráfica 4, tabla 3). El BMY 7378 + CEC (cloroetilclonidina) bloquearon la respuesta presora en el grupo con OS, se pierde en CA7 y es moderado en CA14. El efecto de la solución salina, BMY-7378 y RS-100329 sobre las respuestas presoras inducidas por A-61603 se muestran en la gráfica 4 y tabla 3. En contraste con la noradrenalina, la potencia presora del A-61603 se incrementó significativamente en ratas coartadas (tabla 3). La curva dosis-respuesta para este agonista, fue fuertemente desviada a la derecha por el RS-100329 en los tres grupos de animales con un mayor efecto sobre las ratas con CA7 (Gráfica 4; la relación dosis fue de 316) y CA14 (Gráfica 4; la relación dosis fue de 321) comparado con los animales con OS (Gráfica 4: la relación dosis fue de 52), ver tabla 3; interesantemente, el antagonista produjo un incremento significativo del efecto presor máximo para A-61603 tanto en los animales control como en los coartados (Gráfica 4 y tabla 3). El tratamiento con BMY-7378 no inhibió las respuestas inducidas por A-61603, pero de forma similar a RS-100329, este incrementó marcada y significativamente la respuesta máxima al agonista en los tres grupos de ratas (Gráfica 4 y tabla 3).

	n	DE ₅₀	E _{max} (mmHg)
Noradrenalina^a			
<i>Operación simulada</i>			
Salina	6	1.4±0.3	84.1±6.5
BMY	6	11.5±3.0*	95.0±7.9
RS	5	6.7±2.4	44.8±6.5*
BMY+CEC	6	7.5±1.9*	88.2±4.3*
<i>Coartación aórtica</i>			
<i>7 días</i>			
Salina	5	2.3±0.9	69.9±5.6
BMY	5	5.4±1.0	73.3±4.2
RS	6	3.2±1.0	47.2±2.1*
BMY+CEC	6	5.8±1*	89.9±2.4*
<i>Coartación aórtica</i>			
<i>14 días</i>			
Salina	8	1.7±0.2	81.7±3.4
BMY	5	2.5±0.6	89.3±6.8
RS	9	4.1±0.9	58.8±2.9*
BMY+CEC	6	8±2*	96.8±5.5*
A-61603			
<i>Operación simulada</i>			
Salina	6	0.5±0.1	59.8±5.4
BMY	6	0.3±0.04	84.9±7.6*
RS	6	25.9±3.0*	90.9±5.6*
<i>Coartación aórtica</i>			
<i>7 días</i>			
Salina	5	0.13±0.05 [#]	51.0±7.2
BMY	6	0.48±0.06	104.8±10*
RS	6	41.1±12*	97.5±7.5*
<i>Coartación de la aorta</i>			
<i>14 días</i>			
Salina	8	0.08±0.02 [#]	62.3±4.4
BMY	5	0.39±0.1	91.2±7.1*
RS	6	25.7±6*	102.4±9.5*

Tabla 3. Parámetros para las respuestas presoras a noradrenalina y A-61603.

Dosis efectiva de noradrenalina y A-61603 que producen el 50% (DE₅₀) de la respuesta máxima (E_{max}) en ratas con operación simulada y coartación de la aorta por 7 y 14 días pretratadas con solución salina (1 ml/kg), BMY (1 mg/kg), RS (0.5 mg/kg) o CEC (10mg/Kg, sólo se utilizó con los grupos que recibieron noradrenalina) i.v. . ^a Pretratadas con propranolol y rauwolscina (1 mg/kg cada) antes de los tratamientos. **P* < 0.05 vs salina; &*P* < 0.01 vs BMY; [#]*P* < 0.01 vs salina en ratas con operación simulada. (n= 5-9 ratas por grupo por cada fármaco administrado: vehiculo, BMY-7378, RS-100329 y BMY+CEC).



Gráfica 4. Efecto de BMY-7378 (BMY; 1 mg/kg, i.v.), BMY + CEC (10mg/Kg, i.v.) y de RS-100329 (RS; 0.5 mg/kg, i.v.) sobre las respuestas presoras inducidas por la noradrenalina (A,B y C) o A-61603 (D,E y F) en ratas con operación simulada (A) y con coartación de la aorta a los 7 días (B) y a los 14 días (C). Los símbolos representan la media y las barras verticales el error estándar de la media de 6 experimentos.

3. Determinación de las proteínas y RNAm de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} .

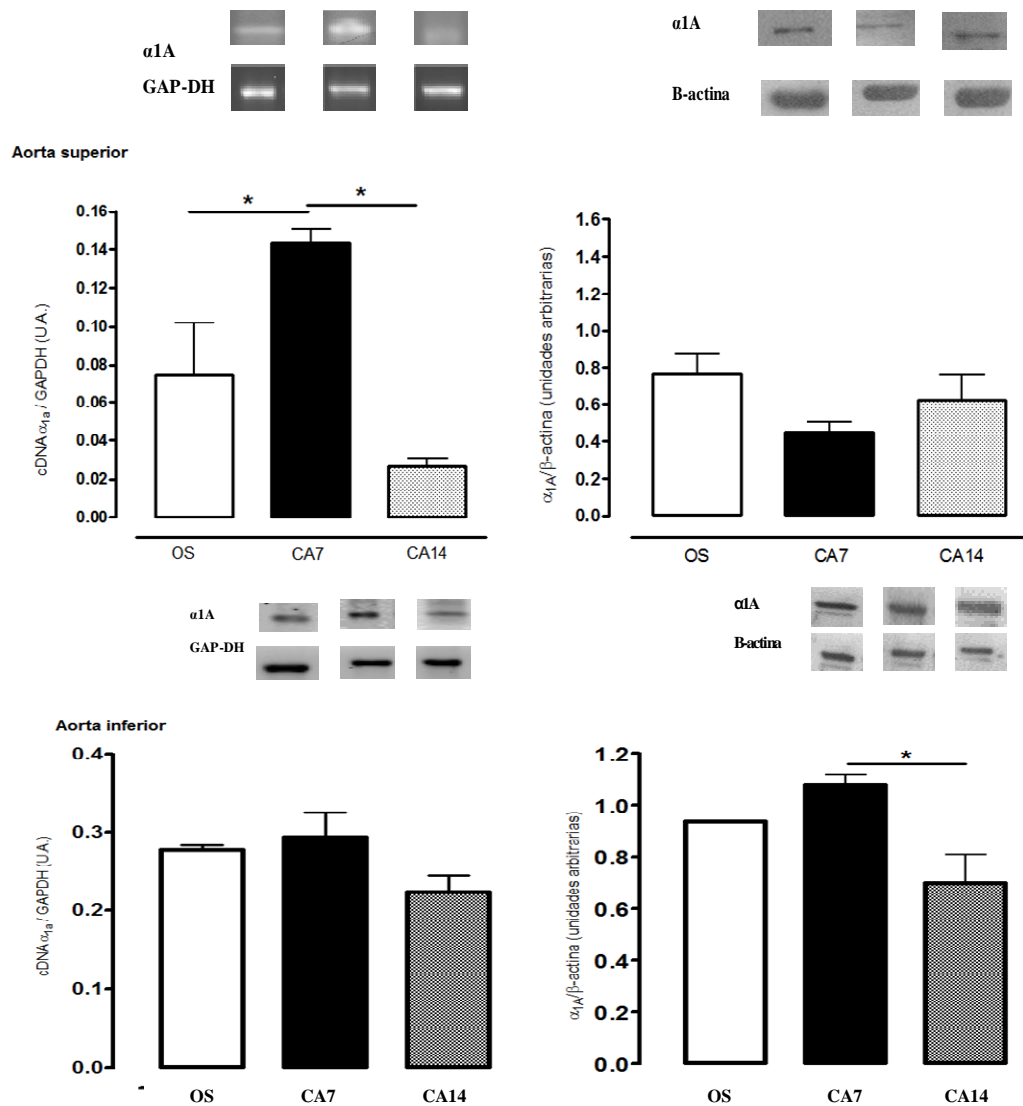
Se determinó la expresión de proteínas y RNAm de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos (OS, CA7 y CA14), utilizando la técnica de Western blot y RT-PCR respectivamente. En el grupo con CA7 se observó por arriba de la coartación un incremento significativo ($p < 0.05$) del RNAm del receptor α_{1A} , pero una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grupo con CA14, por arriba de la coartación, sin embargo, no hubo diferencias en la expresión de la proteína de dicho receptor en los tres grupos; por debajo de la coartación no se presentaron cambios en la expresión del RNAm y se mostró disminución ($p < 0.05$) de la expresión de proteína en el grupo con CA14 en relación al con CA7 pero sin diferencia al grupo con OS. (Gráfica 5).

En relación al receptor adrenérgico α_{1B} , se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del RNAm y la expresión de proteína tanto por arriba como por abajo de la coartación de la aorta en el grupo con CA14 comparado con el grupo con CA7, así como un incremento significativo de la proteína de dicho receptor en el grupo con CA7 comparado con los otros 2 grupos por arriba y por abajo de la coartación, pero sin diferencias en el RNAm comparado con el grupo de OS. (Gráfica 6).

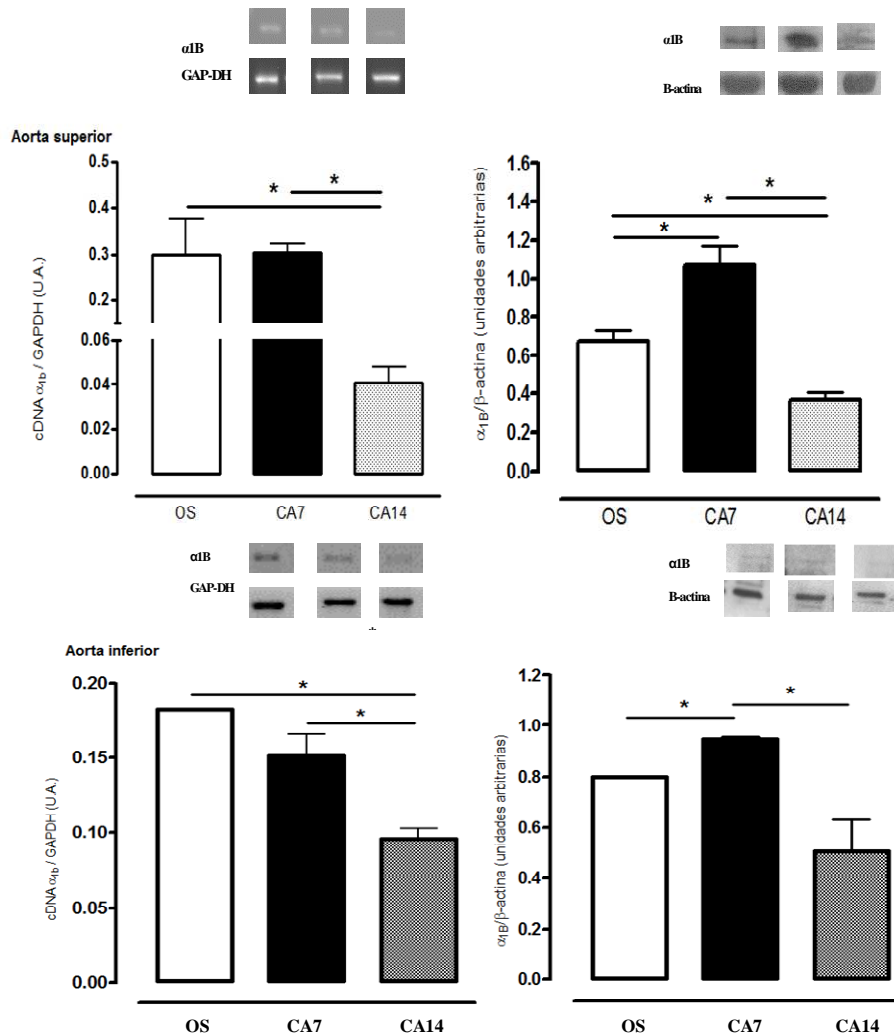
La amplificación del RNAm del receptor adrenérgico α_{1D} del grupo con OS y CA7 no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto por arriba como por abajo de la coartación de la aorta, pero si una disminución en el grupo con CA14 comparado con los otros dos grupos por arriba de la coartación, en este sitio se mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) de la proteína de dicho receptor en el grupo con CA7 comparado con el grupo con OS y CA14, este último grupo disminuyó significativamente pero no fue mayor que en el grupo con OS, mientras que las proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} por abajo de la coartación disminuyeron en el grupo con CA7 en relación al de OS y fue mayor el descenso en el grupo con CA14. (Gráfica 7).

La amplificación del RNAm y la expresión de la proteína de los subtipos de receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} se determinaron en la arteria caudal en los

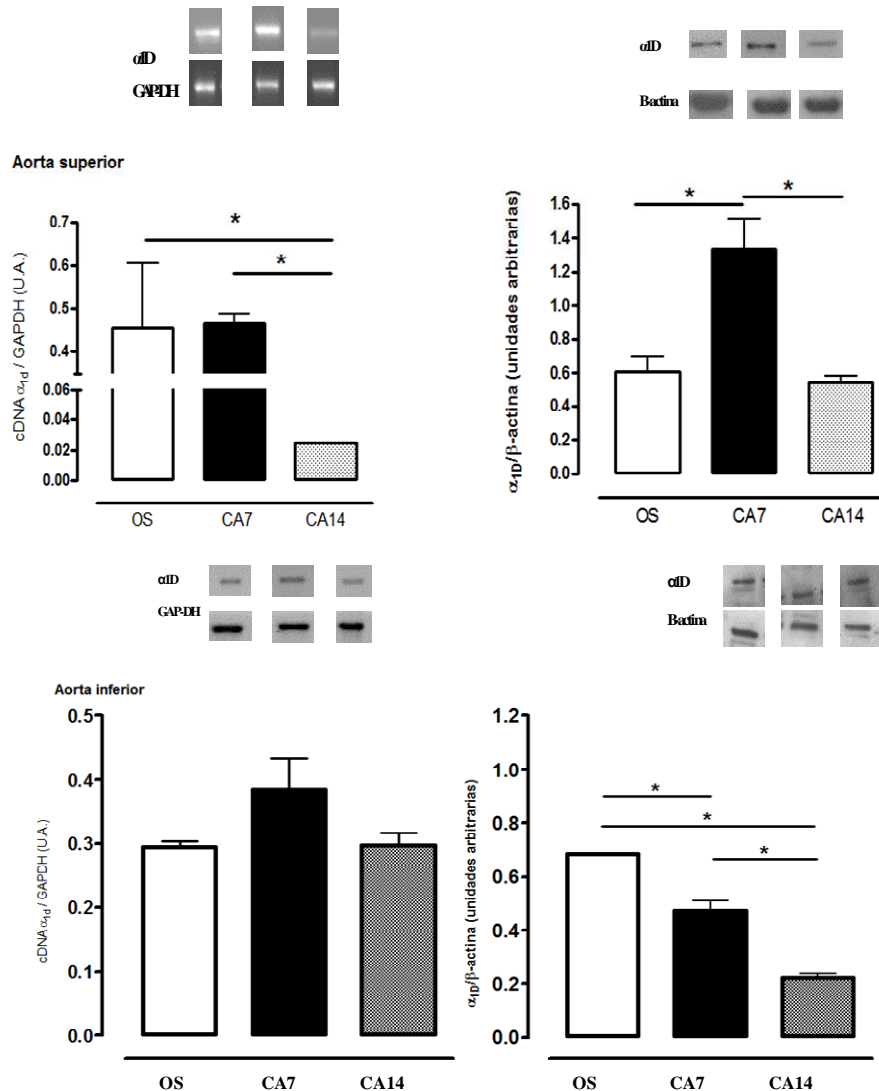
tres grupos (OS, CA7 y CA14), observándose un incremento significativo del RNAm del receptor adrenérgico α_{1B} y α_{1D} en el grupo con CA7 en relación a los otros dos grupos, así como disminución significativa de los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en el grupo con CA14, sin embargo, la expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} no se observó en ningún grupo, el α_{1A} disminuyó significativamente en el grupo con CA14 en relación con el CA7 pero no con el de OS; las proteínas del receptor adrenérgico α_{1B} disminuyó significativamente en el grupo con CA7 pero se incrementó significativamente en el grupo con CA14 sin ser diferente al grupo con OS. (Gráfica 8 y 9).



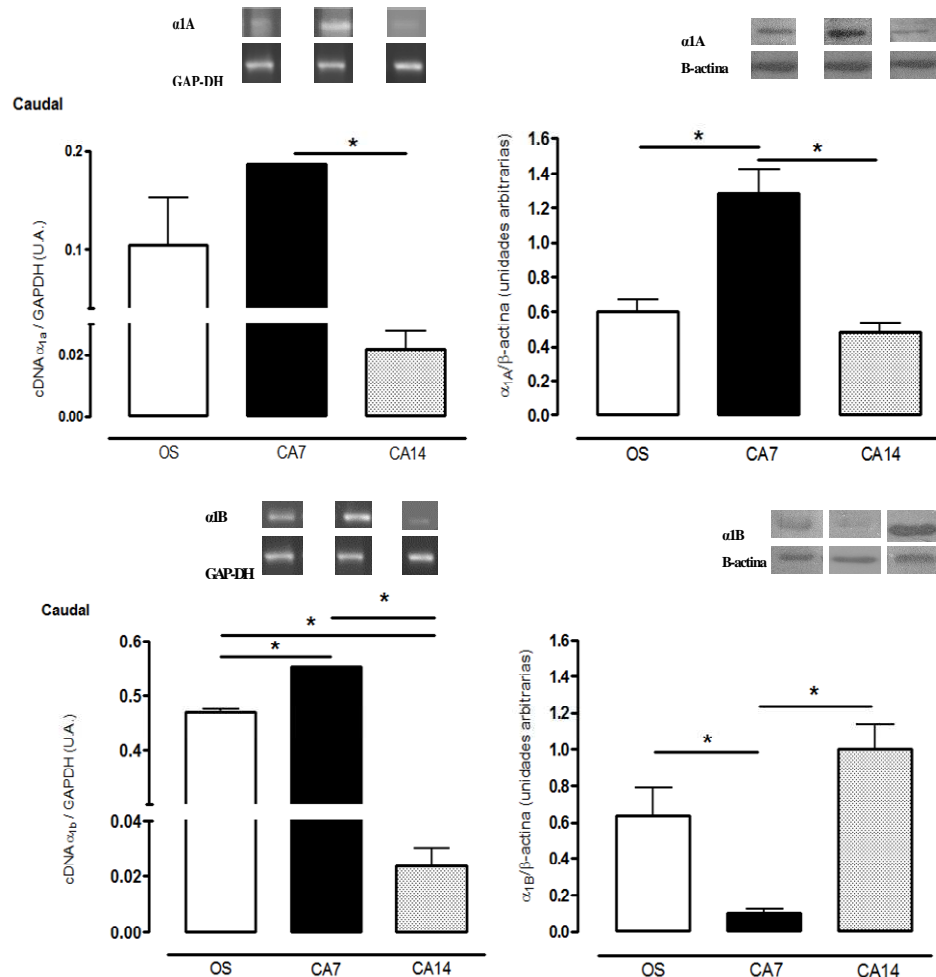
Gráfica 5. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1A} , en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos: OS, CA7 y CA14. Los datos fueron normalizados con el gen control GAPDH y la expresión de la proteína control β -actina respectivamente. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior de cada gráfica se muestran las bandas de un experimento. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía, Bonferroni.



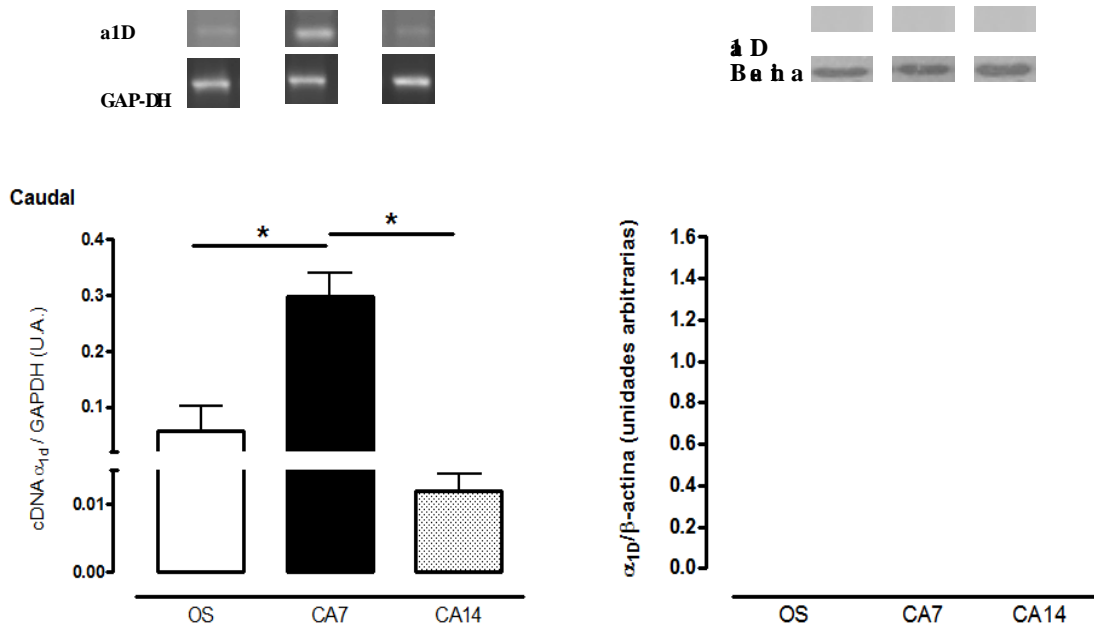
Gráfica 6. Amplificación del RNA y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1B} , en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos: OS, CA7 y CA14. Los datos fueron normalizados con el gen control GAPDH y la expresión de la proteína control β -actina respectivamente. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior de cada gráfica se muestran las bandas de un experimento. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía, Bonferroni.



Gráfica 7. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} , en la arteria aorta por arriba y por abajo de la coartación en los tres grupos: OS, CA7 y CA14. Los datos fueron normalizados con el gen control GAPDH y la expresión de la proteína control β -actina respectivamente. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior de cada gráfica se muestran las bandas de un experimento. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía, Bonferroni.



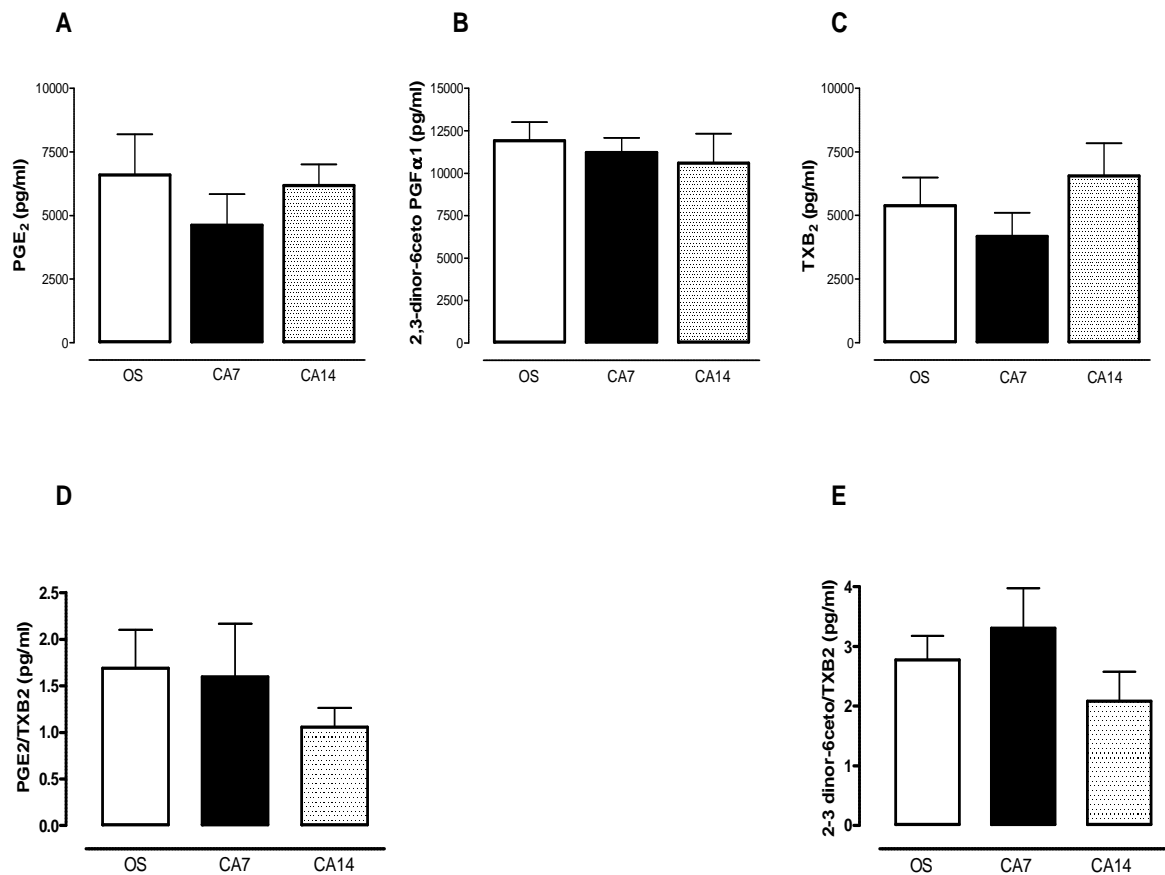
Gráfica 8. Amplificación del RNAm y expresión de las proteínas de los receptores adrenérgico α_{1A} y α_{1B} , en la arteria caudal de los tres grupos: OS, CA7 y CA14. Los datos fueron normalizados con el gen control GAPDH y la expresión de la proteína control β -actina respectivamente. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 6 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior de cada gráfica se muestran las bandas de un experimento. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía, Bonferroni.



Gráfica 9. Amplificación del RNA y expresión de las proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} , en la arteria caudal de los tres grupos: OS, CA7 y CA14. Los datos fueron normalizados con el gen control GAPDH y la expresión de la proteína control β -actina respectivamente. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 6 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior de cada gráfica se muestran las bandas de un experimento. * $p < 0.05$; ANOVA de una vía, Bonferroni.

4. Determinación de PGE_2 , PGI_2 y TXB_2 por EIA.

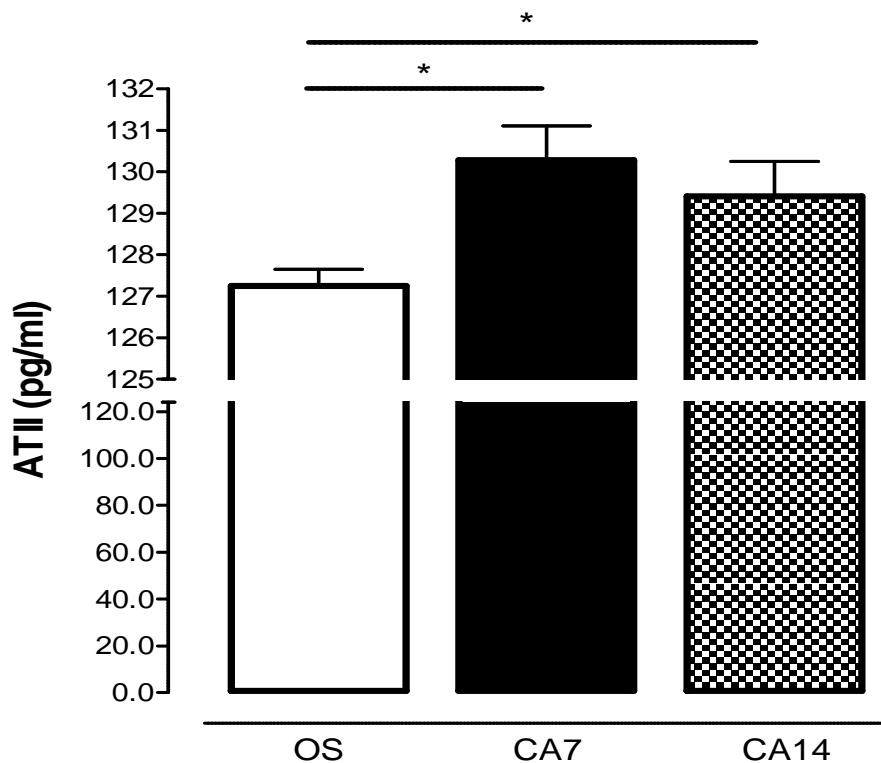
Se realizó la determinación de PGE_2 , TXB_2 y 2,3-dinor-6-ceto $\text{PGF}_{\alpha 1}$ en orina mediante la técnica de inmunoensayo enzimático en los tres grupos (OS, CA7 y CA14), no se observó una diferencia significativa entre los tres grupos, cabe mencionar que al calcular el cociente $\text{PGE}_2 / \text{TXB}_2$ y $2,3\text{dinorPGF}_{\alpha 1} / \text{TXB}_2$ tampoco se observaron diferencias significativas, como se muestra en la gráfica 10.



Gráfica 10. PGE₂, TXB₂ y 2,3dinorPGF_{α1} en orina de animales con OS, CA7 y 14 días, cociente PGE₂/TXB₂ y 2,3dinor-6-ceto PGF_{α1}/TXB₂, mediante inmunoensayo enzimático. Cada barra representa el promedio y la barra pequeña el error estándar de 6 animales. * p≤0.05 diferencia significativa.

5. Niveles de All en plasma.

Se cuantificaron los niveles de All en el plasma de animales con OS, CA7 y CA14, mostrando un incremento significativo en el grupo con CA7 y CA14 comparado con el grupo con OS (OS 127.25 ± 0.40 pg/ml, CA7 130.28 ± 0.83 pg/ml, CA14 129.41 ± 0.84 pg/ml, p<0.05); sin embargo no se observó diferencia significativa (p>0.05) entre los grupos con coartación. (Gráfica 11).



Gráfica 11. Niveles plasmáticos de All en los grupos con: OS, C7 y CA14, por inmunoensayo enzimático. Cada barra es el promedio y la barra pequeña corresponde al error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$.

6. Resultados de anatomopatología e histopatología.

El estudio anatomopatológico mostró en las ratas con OS: corazón, riñón derecho e izquierdo y aorta de características normales; en el grupo con CA7: corazón normal, riñón izquierdo con disminución en su tamaño (hipotrofia) y friable a la palpación, con fibrosis importante alrededor del sitio de la coartación. En el grupo con CA14: el riñón izquierdo se observó con disminución en su tamaño y de consistencia dura; la arteria aorta con abundante fibrosis alrededor del sitio de la coartación, (Figura 10).

Descripción histopatológica de la arteria aorta.

Se realizaron cortes de la arteria aorta a nivel suprarenal e infrarenal, el diámetro de la arteria aorta en las ratas del grupo con OS fue de $1646 \pm 50 \mu\text{m}$, en el de CA7 de $1880 \pm 72 \mu\text{m}$ y de $2053 \pm 128 \mu\text{m}$ en el grupo con CA14, siendo

significativa la diferencia en el grupo con CA14 en relación al de OS (* $p < 0.05$); en relación al espesor de la aorta por arriba de la ligadura, se fue incrementando conforme pasó el tiempo de la coartación, siendo significativa la diferencia de los dos grupos con la coartación en relación al grupo con OS (* $P < 0.05$), pero la diferencia no fue significativa entre los grupos con la coartación (OS $203 \pm 5.3 \mu\text{m}$, CA7 $373 \pm 41.7 \mu\text{m}$ y CA14 $466 \pm 83.26 \mu\text{m}$), $p > 0.05$. (Gráfica 12 y figura 11).

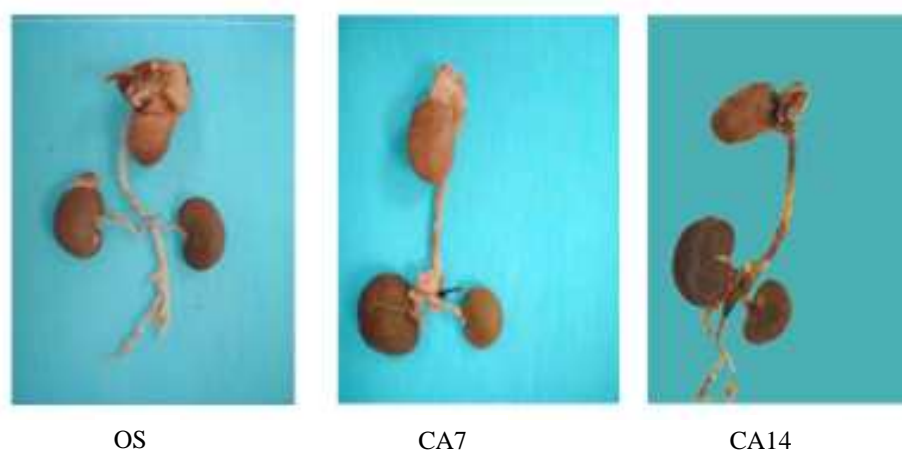
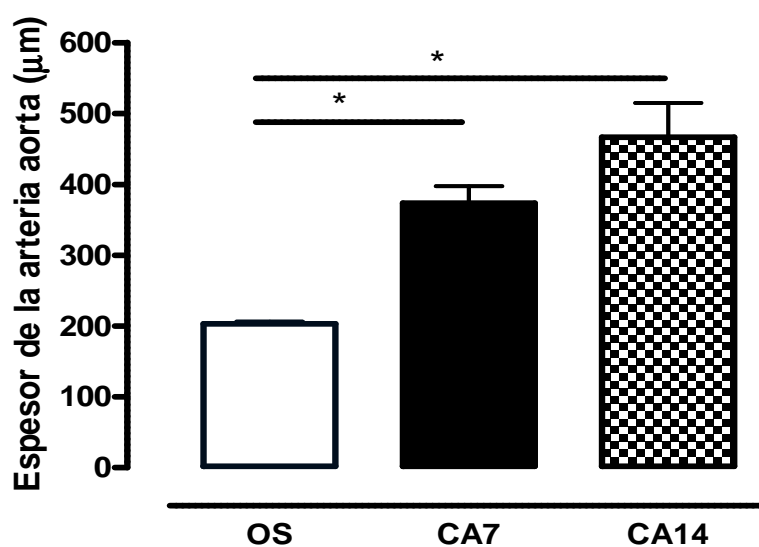


Figura 10. Imágenes de la anatomopatología del corazón, aorta y riñones de un animal con OS, CA7 y CA14.



Gráfica 12. Espesor de la arteria aorta en ratas con OS, CA7 y CA14.

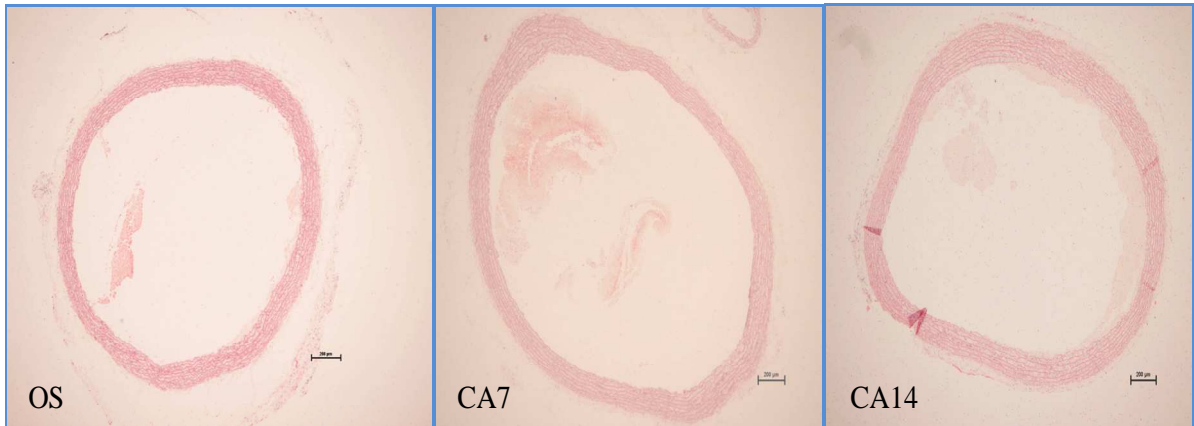


Figura 11. Microscopia 40x de la arteria aorta por arriba de la coartación, teñida con Hematoxilina-Eosina.

En los cortes transversales de aorta de la parte superior (Figura 12) de ratas con OS (Figura 12A), se observó de la parte interna del vaso hacia la periferia: células endoteliales de características normales, túnica media con fibras musculares en disposición longitudinal con un grosor de 5 capas celulares, túnica adventicia con tejido adiposo maduro y escaso, así como tejido inflamatorio disperso.

En la arteria aorta por arriba de la coartación, en ratas con CA7, se observó la túnica media con hiperplasia (un grosor de 12 capas, aumento en el número de núcleos) y algunas células musculares con hipertrofia (núcleos con aumento de tamaño y una relación núcleo:citoplasma de 3:1). La túnica adventicia con abundantes células inflamatorias, linfocitos y cambios de degeneración hialina (Figura 12B). En el grupo CA14, arteria aorta presentó aumento en el grosor de la túnica media (hiperplasia) fueron 7 capas de células musculares, además de hipertrofia (aumento del tamaño celular y una relación núcleo citoplasma de 3:1). (Figura 12C).

Por abajo de la coartación, en el grupo CA7, se observaron células endoteliales escasas y dispersas, así como invaginaciones, túnica media con disminución en el grosor (hipotrofia), fibras musculares dispersas que no conservan su distribución longitudinal y algunas células necróticas (pérdida del núcleo); la túnica adventicia con necrosis fibrinoide y abundantes elementos inflamatorios. Mientras que en el

grupo CA14, la arteria aorta mostró algunas células endoteliales conservadas, otras con hipertrofia y formación de invaginaciones, túnica media con hipertrofia (células musculares con nucleomegalia, pérdida de la relación núcleo-citoplasma 5:1), pero no presentó hiperplasia, ya que el número de capas no se modificó (5 capas); túnica adventicia con depósito de material hialino y elementos inflamatorios.

Descripción histopatológica del corazón

Se realizaron cortes de transversales del corazón de los animales de los tres grupos. Observándose en el grupo con OS, fibras de músculo estriado con cardiomiocitos conservados, hemorragia difusa intermuscular (ver figura 12D).

En animales con CA7, se mostraron algunas zonas con fibras de músculo estriado cardíaco con discreta hipertrofia (aumento del tamaño del núcleo y pérdida de la relación núcleo citoplasma 3:1), focos de reparación probablemente secundario a proceso inflamatorio localizado (la coartación), (ver figura 12E). En el grupo con CA14, se observó hipertrofia en todas las fibras musculares (aumento del tamaño del núcleo y pérdida de la relación núcleo citoplasma 4:1) sin proceso inflamatorio agregado. (Figura 12F).

Descripción histopatológica de los riñones en los tres grupos.

En el grupo de ratas con OS, el riñón derecho e izquierdo presentaron glomérulos y túbulos de características normales (ver figura 13, Ay B).

En los animales con CA7, el riñón derecho presentó congestión vascular, necrosis tubular aguda (citoplasma de aspecto deshilachado y núcleos fuera del citoplasma). El riñón izquierdo mostró atrofia de los túbulos (se observaron compactados), y algunas zonas con necrosis tubular aguda. Abundantes detritos celulares, necrosis coagulativa y en el tejido adiposo perirrenal se observó un proceso reparativo, caracterizado por: angiogénesis, abundantes fibroblastos y células inflamatorias (ver figura 13, C y D).

Por otra parte, en el grupo con CA14, el riñón derecho presentó congestión vascular generalizada, cambios proliferativos de las células mesangiales (hiperplasia). El riñón izquierdo mostró hiperplasia de las células mesangiales, con

disminución del espacio de Bowman, necrosis tubular aguda, tejido adiposo perirrenal con inflamación crónica (ver figura 13, E y F).

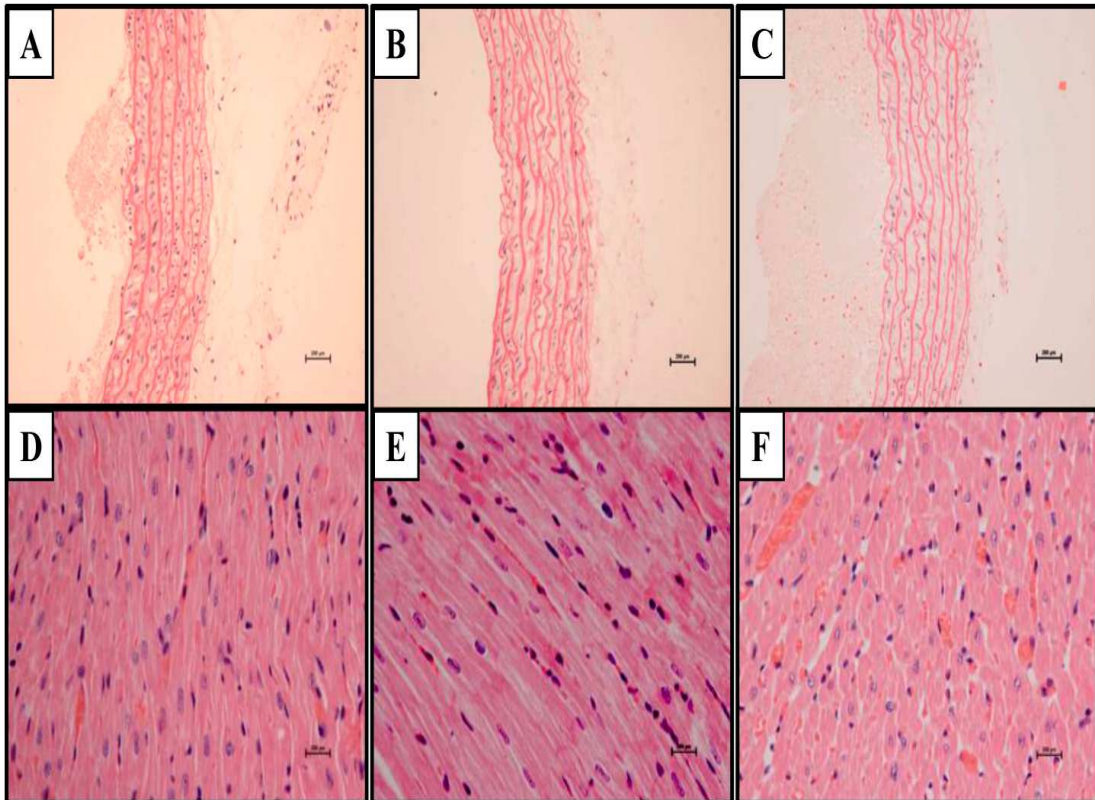


Figura 12. Cortes histológicos de aorta (parte superior) y corazón (parte inferior) (ambos a 20X) de ratas con operación simulada (OS; A,D) o coartación aórtica por 7 (CA7; B,E) o 14 días (CA14; C,F). El número de capas de músculo liso en la tunica media fue incrementado en la aorta de CA7 (B) y estos cambios fueron parcialmente revertidos en la aorta de CA14 (C). Cambios de hipertrofia moderada o global fueron evidentes en células cardiacas de ratas con CA7 y CA14, respectivamente. Barras=20 μ m.

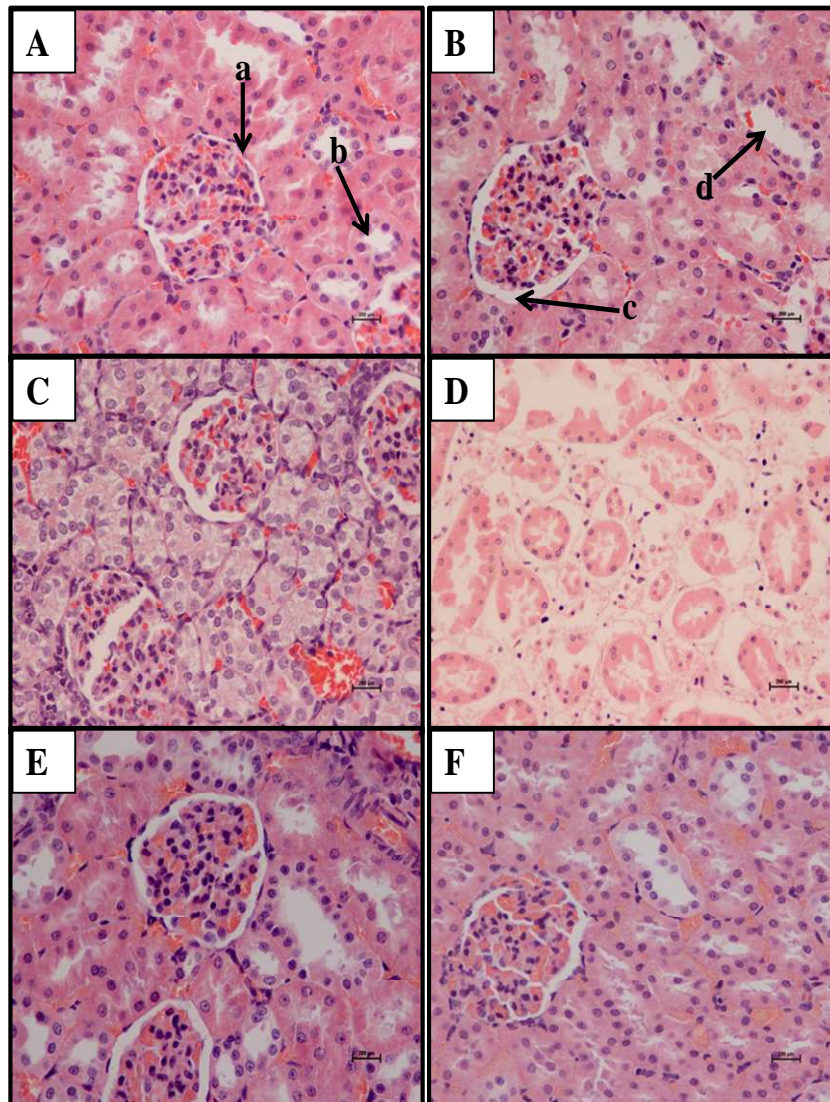


Figura 13. Cortes histológicos de riñón derecho (A, C y E) y riñón izquierdo (B, D y F) de ratas con operación simulada (OS; A y B) o coartación aórtica a los 7 (CA7; C y D) y 14 días (CA14; E y F). Los cambios de necrosis en el riñón izquierdo de CA7 (D) fueron revertidos en el mismo órgano de animales con CA14 (F). a, epitelio capsular; b, túbulo contorneado distal; c, espacio de Bowman; d, túbulo colector. Barras=200 μ m.

VII. DISCUSIÓN

Generalidades.

En este trabajo estudiamos el efecto de hipertensión secundaria a coartación inter-renal de la aorta sobre la función y expresión de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , así como en los niveles plasmáticos de All. Los resultados demostraron que la coartación de la aorta inter-renal desarrolló hipertensión e incremento de los niveles de All, sin ser significativa la diferencia con el tiempo de la coartación en los grupos coartados; sin embargo, causó una disminución tiempo-dependiente en la función de los receptores α_{1D} con un incremento en la función de los receptores adrenérgicos α_{1A} , en la vasculatura sistémica de ratas anestesiadas. En relación a la expresión de la proteína de los subtipos de receptores adrenérgicos, la coartación inter-renal de la aorta, produjo un incremento significativo de la proteína del receptor adrenérgico α_{1B} y α_{1D} en la aorta superior, del receptor adrenérgico α_{1A} en la arteria caudal, en una fase temprana (7 días) con disminución significativa de todos éstos en una fase tardía (14 días), pero con aumento del receptor adrenérgico α_{1B} en arteria caudal. Estos resultados sugieren que el tiempo de la coartación determina los cambios en la función y expresión de los subtipos de receptores adrenérgicos, y es posible que en 7 días no se vea la diferencia en los valores de hipertensión y niveles de All entre 7 y 14 días, porque el desarrollo de la hipertensión es muy lento. Los resultados mostraron una posible relación entre la All y los receptores adrenérgicos α_{1D} en el desarrollo de la hipertensión en una fase temprana (7 días), pero no en una fase tardía (14 días), en el modelo de coartación inter-renal de la aorta.

Papel de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en la respuesta presora inducida por agonistas.

El estado funcional de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en el presente estudio fue evaluado mediante el análisis de las respuestas presoras sistémicas inducido por noradrenalina y A-61603 en presencia y ausencia de antagonistas para los receptores adrenérgicos α_{1A} (RS-100329), α_{1B} (cloroetilclonidina) y α_{1D} (BMY-7378). De acuerdo con datos previos reportados en la literatura (Zhou y

cols., 1996) el desplazamiento a la derecha de la curva dosis-respuesta a noradrenalina por BMY-7378 (1mg/Kg, i.v.) en ratas con OS sugiere una importante participación de los receptores adrenérgicos α_{1D} . De forma similar, la capacidad del RS-100329 para desplazar la curva dosis-respuesta a noradrenalina a la derecha y la disminución del efecto presor máximo sugiere la participación del receptor adrenérgico α_{1A} . Este patrón de bloqueo ha sido reportado previamente para el RS-100329 contra respuestas vasoconstrictoras inducidas por fenilefrina y A-61603 en lecho vascular mesentérico de ratón (Martínez-Salas y cols., 2007), y para el 5-metilurapidil contra las respuestas vasoconstrictoras inducidas por noradrenalina en arterias femorales de ratón (Zacharla y cols., 2004). En apoyo de la participación de los receptores adrenérgicos α_{1A} en la regulación de la vasoconstricción sistémica, el A-61603 incrementó de manera dosis-dependiente la presión arterial en los tres grupos de animales y estas respuestas fueron antagonizadas competitivamente por el RS-100329, con un incremento significativo en el efecto presor máximo para el agonista con respecto al grupo con OS, sin embargo, dicho incremento podría deberse a que la presión arterial diastólica cuando se inició la curva está muy baja por efecto de los antagonistas RS y BMY. Aunque el tratamiento con BMY-7378 falló para bloquear las respuestas presoras inducidas por el A-61603, el antagonista también llevó a un incremento significativo del efecto presor máximo a A-61603 (ver Figura 3). Ambos antagonistas causaron una disminución significativa en los valores basales de la presión arterial (Figura 1 y 2), el aparente incremento en la respuesta presora máxima a A-61603 en animales tratados con antagonista, probablemente sea el reflejo de la caída de la presión basal provocada por los antagonistas, incluso, esta fue la diferencia entre el incremento máximo inducido por el agonista y los valores basales de la presión arterial diastólica que fueron medidos en estos experimentos. (Figura 3). Una probable explicación de los resultados contrastantes en cuanto al efecto de los fármacos antagonistas sobre las respuestas presoras inducidas por noradrenalina y A-61603, podría ser porque la noradrenalina tiene una afinidad 20 veces mayor para los receptores adrenérgicos α_{1D} comparado con los receptores adrenérgicos α_{1A} (Horie y cols., 1995), mientras

que el A-61603 es un agonista altamente selectivo para los receptores α_{1A} (Knepper y cols., 1995). Además, cabe destacar, el papel modulador de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 endoteliales que pueden oponerse al incremento de la presión arterial inducido por el agonista a través de la liberación de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (Méndez y cols., 2006). Sin embargo, se requiere de mayor investigación que explore con detalle estos mecanismos.

Efecto de la hipertension inducida por la coartación aórtica en la función y expresión de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_B y α_{1D} : papel de la All.

Una gran evidencia sugiere que los receptores adrenérgicos α_1 son modificados en la hipertensión; principalmente el receptor adrenérgico α_{1D} , su función y expresión se ha observado incrementada en vasos de ratas SHR (Villalobos-Molina y cols., 1996,1999, 2008; Tanoue y cols., 2002; Villalobos-Molina y cols., 1999; Godinez-Hernández y cols., 2006; Gisbert y cols., 2002; Oliver y cols., 2009; Ye JM y cols., 1998). Diversos estudios sugieren que el cambio en los receptores adrenérgicos α_{1D} vasculares en animales hipertensos puede estar asociado con la All. Como se ha demostrado previamente, este octapeptido incrementó su transcripción y expresión en células de músculo liso vascular (Hu y cols., 1995). Además, el pretratamiento con captopril por una semana disminuyó la expresión del receptor adrenérgico α_{1D} en la aorta de ratas SHR jóvenes hipertensas (Godinez-Hernández y cols., 2006), mientras que cantidades altas del receptor adrenérgico α_{1D} fueron encontradas en la aorta de ratones sin el receptor aril hidrocarburo, los cuales muestran característicamente incremento en los niveles de All, hipertrofia e hipertensión (Villalobos-Molina y cols., 2008). Estos hallazgos, sugieren una relación directa entre los niveles circulantes de All y los receptores adrenérgicos α_1 en hipertensión, específicamente el receptor adrenérgico α_{1D} . Hallazgos similares se encontraron en ratas hipertensas 2K-1C (Welch y cols., 2007; Wilcox y cols., 1996), y en animales con coartación aórtica inter-renal parcial (el presente estudio) con niveles plasmáticos altos de All, lo que refleja la activación del SRA. Si la All es la responsable de un incremento los receptores

adrenérgicos α_{1D} vasculares en la hipertensión, se podría esperar que la coartación de la aorta podría inducir un incremento en la función y expresión de estos receptores a lo largo del tiempo después de la coartación (CA7 y CA14). Sin embargo, aunque nosotros encontramos un incremento en la cantidad de proteínas del receptor adrenérgico α_{1D} en la aorta de ratas con CA7, lo que sin duda apoya la idea antes mencionada, dicho incremento no fue observado en la aorta de animales CA14, quienes también tenían un incremento en los niveles plasmáticos de AII y la hipertensión. Más aún, la disminución tiempo-dependiente de la expresión funcional de los receptores adrenérgicos α_{1D} sensibles a BMY fue observada en ratas anestesiadas con CA7 y CA14. De acuerdo a estas observaciones, entonces, el concepto que niveles altos de AII circulan pueden incrementar la expresión y función de los receptores adrenérgicos α_{1D} en la hipertensión, está sustentado en un estadio temprano (CA7) pero no en uno tardío (CA14) del modelo de hipertensión inducida por la coartación de la aorta interrenal utilizado en este estudio.

En cuanto a los posibles efectos de la AII sobre los receptores α_{1A} , datos previos demostraron que el tratamiento con captopril disminuyó el RNA mensajero (RNAm) en ratas SHR (Godinez-Hernández., 2006). Además, la AII produjo una regulación a la baja del RNAm y la proteína del receptor adrenérgico α_{1A} en cultivo de miocitos ventriculares de rata neonata; sin embargo, el RNAm de los receptores adrenérgicos α_{1D} no presentaron modificaciones (Li y cols., 1997). Por lo tanto, no son consistentes los efectos de la AII sobre los receptores adrenérgicos α_{1A} , que han sido reportados hasta ahora. La evidencia de un cambio potencial en el estado de los receptores adrenérgicos α_{1A} en la hipertensión no es consistente. Por ejemplo, una disminución significativa de la cantidad de RNAm (pero no de proteínas) del receptor adrenérgico α_{1A} fue observada en la aorta de ratas SHR comparado con controles Wistar Kyoto (WKY) (Godinez-Hernández y cols., 2006). Además, las contracciones mediadas por el receptor α_{1A} inducido por cloroetilclonidina en arteria caudal de ratas SHR y WKY no tuvieron diferencias entre sí (Ibarra y cols., 2000).

En contraste con datos anteriores en arterias aisladas, la CA7 y CA14 causaron una disminución dependiente de tiempo en la expresión funcional en los receptores adrenérgicos α_{1D} en vasos de resistencia sistémica, como fue observado por la pérdida de la actividad del antagonista BMY-7378 contra las respuestas presoras inducidas por noradrenalina en animales anestesiados (Fig.3). La falta de correlación entre los datos de aorta aislada y los vasos sistémicos *in vivo*, probablemente refleja una marcada diferencia entre las arterias conducción y distribución y pequeños vasos de resistencia, así como el efecto de la coartación aórtica en la función y expresión de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 vasculares. Desde el punto de vista de su patogenia, la tendencia hacia un mayor cantidad de proteína de los receptores adrenérgicos α_{1D} y α_{1B} en la arteria aorta superior y del α_{1A} en arteria caudal de animales con CA7, no descarta la posibilidad de que dicho incremento inicial de los receptores, podría constituir un paso en el desarrollo de la hipertensión, aunque, esto no se reflejó funcionalmente en animales anestesiados. Es importante destacar que, a pesar de la heterogeneidad reportada de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en diferentes áreas de la vasculatura, incluyendo por ejemplo los lechos vasculares de la arteria renal (Villalobos-Molina y cols., 1997; Salomonsson y cols., 2000), mesentérica (Piascik y cols., 1997; Arevalo-León y cols., 2003), y femoral (Zacharia y cols., 2004), el valor de los presentes experimentos en animales en el análisis de la potencial relación entre la AII y los receptores adrenérgicos α_{1D} vasculares en el modelo de coartación de la aorta utilizado, parece importante dado que los estudios mostraron un papel predominante en las respuestas presoras inducidas por agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 (Zhou y cols., 1996; Ibarra y cols., 1997; Tanoue y cols., 2002). Tanto la expresión de los receptores adrenérgicos α_{1D} en aorta (Godinez-Hernández y cols., 2006) y la función en la vasoconstricción sistémica llegó a estar acentuada en modelos animales de hipertensión (Villalobos-Molina y cols., 1999, 2008; Godinez-Hernández y cols., 2006).

Angiotensina II y cambios histológicos en riñón, corazón y aorta en el modelo de coartación de la aorta inter-renal.

En este trabajo, también estudiamos los cambios histológicos en riñón, corazón y aorta en el modelo de coartación inter-renal de la aorta. Los resultados mostraron que la coartación inter-renal de la aorta desarrolló hipertensión e incrementó los niveles circulantes de All, produciendo cambios contrastantes en la morfología de los riñones, corazón y aorta dependiendo del intervalo de tiempo posterior a la coartación (7 y 14 días). Estos cambios sugieren la participación de otros mecanismos a los 14 días después de la activación del SRA por la All secundaria a la coartación de la aorta. Sorprendentemente, tanto los niveles circulantes de All y los valores de presión arterial sistémica en animales con CA14 no fueron mayores que los medidos en animales con CA7, lo que podría deberse a que el desarrollo de la hipertensión es lento y ese tiempo no es suficiente para mostrar diferencias significativas, ó la participación de otros mecanismos que mantienen la hipertensión en ratas con CA14, mecanismos donde los prostanoïdes no están involucrados, ya que nosotros no observamos cambios significativos en los niveles de protanoïdes urinarios en los tres grupos. A pesar de que los metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo el tromboxano A₂ (TxA₂), endoperoxidos de prostaglandina (PGH₂) e isoprostanos pueden causar vasoconstricción de vasos renales y sistémicos, así como contribuir al desarrollo de hipertensión durante una infusión corta y prolongada de All (Luft et al., 1989; Wilcox and Welch, 1990; Wilcox et al., 1991) y durante la fase temprana de la hipertensión renovascular en ratas (Himmelstein and Klotman, 1989). Además de haberse reportado, una producción excesiva de prostaglandinas incluyendo el metabolito de PGI₂, 2,3-dinor-6-cetoprostaglandina F_{α1} y el metabolito del tromboxano A₂, TXB₂, en los vasos sanguíneos (Lin et al., 1991; Luft et al., 1989), glomérulos de riñones con un clip (Stahl et al., 1984) y en riñones contralaterales perfundidos (Himmelstein and Klotman, 1989) de ratas hipertensas 2K-1C; la excreción del TxB₂ también se observó incrementada en este modelo (Welch et al., 2007). La ausencia de cambios en los niveles urinarios de PGE₂, TXB₂ y 2,3-dinor-6-keto-prostaglandina F_{1α} en el presente estudio, fue contrastante con las observaciones realizadas en

ratas hipertensas 2K-1C, lo que implica diferencias importantes, que podrían existir entre los dos modelos experimentales, incluyendo el diámetro del clip colocado para la oclusión del flujo sanguíneo (0.2 mm en la arteria renal contra 0.8 mm en la aorta) y el periodo de tiempo en que fue realizada la medición después de la colocación del clip, fue de 2 -6 semanas en ratas 2K-1C (Himmelstein and Klotman, 1989; Stahl et al., 1984; Wilcox et al., 1996; Welch et al., 2007) y 1-2 semanas en los experimentos de coartación de la aorta en el presente estudio. Además la excepción realizada del estudio reportado por Welch y colaboradores (2007) mostrando un incremento en los niveles urinarios de TxB_2 en ratas de Goldblatt 2K-1C, muchos estudios han medido prostanoides localmente (en glomérulos y riñones completos).

Se han reportado alteraciones deletéreas estructurales y funcionales en riñones, vasos sanguíneos y corazón de modelos animales con HRV, como es el daño tubulointersticial incluyendo la expansión del volumen intersticial, atrofia tubular y fibrosis tubulointersticial precediendo la lesión glomerular en el riñón derecho (sin clip) junto con la expansión intersticial y daño tubular en el riñón izquierdo (con clip) de ratas hipertensas 2K-1C (Gröne and Helmchen, 1986; Jackson et al., 1990; Mai et al., 1993; Wenzel et al., 2003). Cambios similares junto con la glomeruloesclerosis y la retracción del penacho glomerular en el riñón no isquémico, y necrosis isquémica subtotal en el riñón isquémico había sido observado en ratas con coartación de la aorta inter-renal completa (De Bruno et al., 2001). Mecanismos no hemodinámicos han sido involucrados en la activación del receptor AT_1 y AII en relación a las alteraciones estructurales (De Bruno et al., 2001; Hilgers and Mann, 1996). Los presentes resultados mostraron daño tubular y modesto colapso glomerular en el riñón derecho y necrosis isquémica extensa en el riñón izquierdo de ratas con CA7, compatibles con los resultados anteriores, por lo que probablemente se deba a una acción trófica no hemodinámica de la AII en este modelo. Una diferencia notable fue una modesta retracción glomerular en el riñón no isquémico de ratas con CA7 con respecto a lo visto en el riñón no isquémico de ratas con ligadura completa de la aorta (De Bruno et al., 2001), una diferencia que puede atribuirse a un aumento menos drástico en la presión de

perfusión renal por una coartación de la aorta parcial, que fue utilizada en este estudio. Un mayor análisis experimental, se requiere para poder evaluar las posibles diferencias moleculares y morfológicas entre ambos modelos experimentales.

Los datos en aorta de ratas coartadas son consistentes con estudios previos que mostraron hipertrofia (Griffin et al., 1991; Mulvany, 1993; Korsgaard and Mulvany, 1988) e hiperplasia (Owens and Reidy, 1985; Su et al., 1998) de células de músculo liso en vasos sanguíneos de riñón de rata o ratón hipertensos por infusión de AII. Similar, a la respuesta de crecimiento predominantemente hiperplásico en la aorta torácica de ratas con coartación de la aorta inter-renal parcial (Owens and Reidy, 1985), el principal efecto en la aorta fue el incremento en el número de capas de células de músculo liso medial en animales coartados. Dado que la hipertrofia medial aórtica debido a la hipertrofia celular e hiperplasia, es la respuesta predominante en ratas SHR (Owens and Schwartz, 1982) y en ratas hipertensas Goldblatt (Owens and Schwartz, 1983), la respuesta de crecimiento de las células de músculo liso, con un vaso sanguíneo puede diferir marcadamente dependiendo del modelo de hipertensión. Una gran cantidad de estudios soportan el papel de la AII sobre las alteraciones vasculares y renales, mientras que la hipertrofia cardíaca ha sido más frecuentemente asociada con un incremento de la carga de presión en estos modelos animales (Geisterfer et al., 1988; Mulvany, 1993; Owens et al., 1981). Una carga mayor de presión desarrollada en el corazón de ratas con CA14 se sugiere por los valores altos de la frecuencia cardíaca en este grupo de animales comparado con aquellos animales con OS y CA7; esto es de hecho compatible con el desarrollo de hipertrofia general comparada con hipertrofia parcial en el corazón de ratas con CA14 y CA7, respectivamente.

Los hallazgos histológicos más relevantes, fueron los cambios estructurales en el riñón izquierdo (la atrofia y necrosis tubular) y en la aorta por arriba de la ligadura (hiperplasia del músculo liso vascular medial), pero no en corazón de ratas con CA7, los cuales fueron claramente revertidos en los tejidos de animales con CA14. Esto sugiere la participación de mecanismos locales y sistémicos opuestos a los

efectos de la coartación aórtica en estos tejidos. Esto posiblemente sea el inicio de evidencia experimental que sugiere: 1) productos de actividad de la ECA podrían tener un papel protector en los riñones de ratas con HRV; 2) componentes del RAS pueden revertir la proliferación de las células del músculo liso vascular, como en ratas hipertensas 2K-1C que estuvieron en tratamiento por 2 semanas con enalapril e hidralazina (vasodilatador), donde la tasa de filtración glomerular fue reducida significativamente en el riñón con clip más por el tratamiento con enalapril que por hidralazina a pesar de disminuir la presión arterial de forma similar con ambos fármacos, lo que sugiere que el efecto de la inhibición de la ECA sobre la tasa de filtrado glomerular fue resultado de un mecanismo específico interarenal independiente de la reducción de la presión arterial (Grone y Helmchen, 1986). Entonces, la presión arterial en nuestros experimentos en ratas con CA7 y CA14 no fue significativamente diferente, la reversión de la atrofia renal inducida por la coartación aórtica fue mayor independientemente de la perfusión renal y/o presión arterial sistémica.

De acuerdo con lo anterior, el tratamiento antihipertensivo con un inhibidor de la ECA es equiparable en la falla renal aguda en ratas hipertensas depletadas de sodio con constricción de la arteria renal bilateral (Helmchen et al., 1982).

Para apoyar más un mecanismo intrarenal dependiente de angiotensina de la nefrotoxicidad por inhibición de la ECA, la infusión intrarenal de enalapril disminuyó la tasa de filtración glomerular en el riñón estenótico sin cambios en la presión arterial en perros (Anderson y cols., 1979). Desde un punto de vista estructural, el tratamiento antihipertensivo de ratas hipertensas 2K-1C con omapatrilat (un inhibidor de la ECA y la endopeptidasa neutral), enalapril, o enalapril combinado con hidroclorotiazida aumenta el daño tubulointersticial (y disminución de la función) en el riñón con clip comparado con controles hipertensos no tratados (Wenzel et al., 2003). En conjunto, estas observaciones apoyan el papel de un mecanismo protector dependiente del SRA en los riñones de ratas hipertensas, la cual podría llegar a activarse durante los estadios tempranos del proceso como lo sugerido por nuestros resultados en los riñones izquierdos de ratas con CA14.

En cuanto a los efectos de la coartación aórtica de ratas con CA14, este es el primer informe que muestra la reversión de la hiperplasia de células de músculo liso aórtico medial en un modelo de HRV. Un estudio previo realizado en ratas con coartación aórtica inter-renal demostró una respuesta predominante de crecimiento hiperplásico en la aorta torácica (es decir, por encima de la coartación) 9 días después de la cirugía, pero no se realizó un análisis en una etapa posterior del proceso (Owens y Reidy, 1985). Finalmente, en el caso del corazón, hipertrofia moderada o global en ratas con CA7 y CA14, respectivamente, indica que la reversión no se produjo con la progresión de la HRV y que el incremento de la hipertrofia del segundo fue más asociada por un largo período de tiempo.

VIII. CONCLUSIONES.

- La hipertensión inducida por la coartación inter-renal de la aorta incrementa la AII, la función del receptor adrenérgico α_{1D} y la expresión de los receptores adrenérgicos α_{1B} y α_{1D} vasculares (aorta) y receptores adrenérgicos α_{1A} (arteria caudal) en una fase temprana (7 días), sin participación de los prostanoides.
- La hipertensión y el incremento de la AII en este modelo experimental se asocia con hipertrofia e hiperplasia en la aorta superior, necrosis en el riñón izquierdo e hipertrofia en el corazón en la fase temprana (7 días), con reversión de dichos cambios en aorta y riñón con el tiempo (14 días).
- Los resultados sugieren una relación directa y temprana de la AII y los receptores adrenérgicos α_{1D} en el desarrollo de la hipertensión en animales con coartación de la aorta inter-renal.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos, nos llevan a la búsqueda de otros mecanismos que intervienen en el mantenimiento de la hipertensión arterial renovascular sobre todo a más de 14 días de la coartación, lo que pudiera proporcionar mayor información para comprender aún más su fisiopatogenia y encontrar nuevas alternativas farmacológicas en el tratamiento de la hipertensión, ya que a pesar de contar con muchos fármacos para tal fin, el control de la hipertensión arterial sigue siendo un reto.

Entre los proyectos que derivan de este estudio está la determinación de catecolaminas, principalmente noradrenalina y serotonina tanto a nivel central como periférico, ya que se ha asociado al sistema serotoninérgico central en la hipertensión renovascular 2 riñones 2 clips. También sería importante medir la ECA2, angiotensina 1-7 y aminopeptidasas a nivel central como periférico, ya que tienen un papel importante en el SRA amplificado y probablemente son puntos clave en el mantenimiento de la hipertensión; en el caso de las prostaglandinas, su determinación a nivel renal y en plasma en 20 y 30 días posteriores a la coartación de la aorta, proporcionaría información importante en relación a su participación en la hipertensión renovascular.

Sería también interesante conocer en este modelo de hipertensión, la expresión de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en corazón, para conocer si el predominio de alguno de ellos está asociado a la hipertrofia presentada, ya que son pocos los estudios que se han dedicado a ello, y existe controversia en los resultados.

X. REFERENCIAS

- Ahlquist RF. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* , 1948;153:586–600.
- Alexander SPH and Peters JA (1999) Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement, 10th ed, Trends in Pharmacological Sciences, Cambridge, UK.
- American Medical Association. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*, 2003; 289 (19):2560-2572.
- Anderson WP, Korner PI, Johnston CI. Acute angiotensin II-mediated restoration of distal renal artery pressure in renal artery stenosis and its relationship to the development of sustained one-kidney hypertension in conscious dogs. *Hypertension* 1979; 1:292-298.
- Assimacopoulos JF, Blackmore PF, Exton JH. Studies of the interaction between glucagon and alpha-adrenergic agonist in the control of hepatic glucose output. *J Biol Chem* 1982; 257:3759-65.
- Attallah, A.A., Stalh, R.A., Bloch, D.L., Lee, J.B., (1982). Renal prostaglandin E₂ biosynthesis: dependence on Angiotensin II. *Am. J. Cardiol.*, 49, 1521-1523.
- Berthelsen S and Pettinger WA (1977) A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci* 21:595–606.
- Brown JJ, Lever AJ, Robertson JI, et al. Pathogenesis of essential hypertension. *Lancet*, 1976, 1 : 1217-9.
- Carey, R.M., Jin, X., Wang, Z., Siragy, H.M. (2000). Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT₂) angiotensin receptor. *Acta Physiol. Scand.*, 168, 65-71.
- Carey, R.M., Wang, Z., Siragy, H.M., (2000). Role of the Angiotensin Type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35, 155-163.
- Chai SY, Peck G, et al. The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2728-37.

-
- Chair-Vice. Current approaches to renovascular hypertension. *Med Clin North Am*, 2009; 93(3):717-725.
 - Chatziantoniou C, Arendshorst WJ., (1992). Impaired ability of prostaglandins to buffer renal vasoconstriction in genetically hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, 263, F573-F580.
 - Chatziantoniou C, Ruan X, Arendshorst WJ., (1993). Interactions of cAMP-mediated vasodilators with angiotensin II in rat kidney during hypertension. *Am. J. Physiol.*, 265, F845-F852.
 - Chen L, Xin X, Eckhart AD, Yang N, Faber, J.E. Regulation of vascular smooth muscle growth by alpha 1-adrenoreceptor subtypes in vitro and in situ. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 30980-30988.
 - Chen DG, Jin XQ, et al. Mechanisms responsible for sustained hypotension after captopril treatment. *J Hypertension*, 1995; 13:1113-1121.
 - Clements ML, Faber JE. Mechanical load opposes angiotensin-mediated decrease in vascular α 1-adrenoreceptors. *Hypertension*, 1997; 29:1165-1172.
 - Clough, D.P., Mulroy, S.C., Angel, D., Hatton, R., (1983). Interference by inhibitors of the renin-angiotensin system with neurogenic vasoconstriction. *Clin. Exp. Hypertens.*, 5, 1287-1299.
 - Culman J, Baulmann J, Blune A, et al. The renin-angiotensin system in the brain: an update. *J renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001; 2: 96-102.
 - Daniel EE, Brown RD, Wang YF, Low AM, Lu-Chao H and Kwan CY. Adrenoceptors in canine mesenteric artery are predominantly 1A-subtype: pharmacological and immuno chemical evidence. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:671-679.
 - De Bruno MP, Turoni CMJ, Marañón RO, Reynoso HA, Coviello A. Structural changes in the kidney induced by coarctation hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23:501-511.
 - De Jonge, A., Knape, J.Th.A., Wilffert, B., Kalkman, H.O., Meel, J.C., Thoolen, M.J., Timmermans, P.B., Van zwieten, P.A., (1982). Effect of converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade on the

-
- vasoconstriction mediated by α_1 and α_2 -adrenoceptor stimulation in pithed normotensive rats. *Arch. Pharmacol.*, 321, 309-313.
- DiBona GF. Sympathetic nervous system influences on the kidney: role in hipertensión. *Am J Hypertens*, 1989; 2: 119S-124S.
 - Dubey RK, Boegehold MA, Gillespie DG, Rosselli M. Increased nitric oxide activity in early renovascular hypertension. *Am J Physiol*, 1996; 270(1): 118-24.
 - Enming J, Lombardi D, Siegal J, et al. Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension*, 1998; 31:1331-1337.
 - Erami C, Zhang H, Ho JG, French DM, Faber, J.E., (2002). Alpha(1)-adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 283, H1577-H1587.
 - Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006. Secretaría de Salud de México 2006.
 - Ezzati et al. WHO 2000 report. *Lancet* 2002; 360:1347-1360.
 - Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin (1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47: 515-521.
 - Furchgott RF. The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1967;139:553-570.
 - Fyhrquist F, Saijonmaa O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*. 264;224-236.
 - Gammelgaard I, Wamberg S, Bie P. Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol* 2006; 188: 129-38.
 - García-Saíñz JA, Vázquez-Prado J and Medina LC (2000) α_1 -Adrenoceptors function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 389:1-12.
 - Garovic Vesna and Textot Stephen C. Renovascular Hypertension; Current Concepts. *Seminars in Nephrology* 2005;25:261-271.
 - Ge T, Hughest H, junquero DC, et al. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expresión of prostaglandin H synthase-1

-
- and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Cir Res* 1995; 76:1003-10.
- Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62:749–756.
 - Gisbert, R., Noguera, M.A., Ivorra, M.D., D'Ocon, P., (2000). Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295, 810-817.
 - Gisbert, R., Ziani, K., Miquel, R., Noguera, M.A., Ivorra, M.D., Anselmi, E., D'Ocon, P. (2002). Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, 135, 206-216.
 - Godínez-Hernández, D., Gallardo-Ortiz, I.A., López-Sánchez, P., Villalobos-Molina, R., (2006). Captopril therapy decreases both expression and function of alpha-adrenoceptors in pre- hypertensive rat aorta. *Auton. Autacoid. Pharmacol.*, 26, 21-29.
 - González JR. Do angiotensin II receptor antagonists substitutive angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of high blood pressure?. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53:4-12.
 - Grant TL, McGrath JC. (1988). Interactions between Angiotensin II and α -adrenoceptor agonists mediating pressor responses in the pithed rat. *Br J Pharmacol*, 95, 1229-1240.
 - Griffin SA, Brown WCB, McPherson F, et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*, 1991; 17:626-635.
 - Gröne HJ, Helmchen U. Impairment and recovery of the clipped kidney in two kidney, one clip hypertensive rats during and after antihypertensive therapy. *Lab Invest* 1986; 54:645-655.
 - Guimaraes S, Moura D. vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*, 2001; 53 (2):319-356.

-
- Han C, Abel PW and Minneman KP (1987) Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chloroethylclonidine. *Mol Pharmacol* 32:505–510.
 - Han C, Li J, Minneman KP. Subtypes α adrenoreceptors in rat blood vessels. *Eur J pharmacol* 1990, 190:97-104.
 - Helmchen U, Gröne HJ, Kirchertz EJ, Bader H, Bohle RM, Kneissler U, Khosla MC. Contrasting renal effects of different antihypertensive agents in hypertensive rats with bilaterally constricted renal arteries. *Kidney IntSuppl* 1982; 12:S198-S205.
 - Henrion D, Laher I, Laporte R, Bevan JA. (1992). Angiotensin II amplifies arterial contractile response to norepinephrine without increasing Ca^{++} influx: role of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther*, 261, 835-840.
 - Hilgers KF, Mann JF. Role of angiotensin II in glomerular injury: lessons from experimental and clinical studies. *Kidney Blood Press Res* 1996; 19:254-262.
 - Himmelstein SI, Klotman PE. The role of thromboxane in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in rats. *Am J Physiol* 1989; 257: F190-F196.
 - Hu ZW, Shi XY, Okazaki M, Hoffman BB., (1995). Angiotensin II induces transcription and expression of alpha 1-adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 268, H1006-H1014.
 - Ibarra M, Terron JA, Lopez-Guerrero JJ, Villalobos-Molina R., (1997). Evidence for an age-dependent functional expression of alpha 1D-adrenoceptors in the rat vasculature. *Eur. J. Pharmacol.*, 322, 221-224.
 - Ibarra M, Pardo JP, Lopez-Guerrero JJ, Villalobos-Molina R. Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors in contraction. *Br J Pharmacol* 2000;129(4):653-60.
 - Jaiswal N, Jaiswal RK, Tallant EA, Diz DI, Ferrario C.M., (1993). Alterations in prostaglandin production in spontaneously hypertensive rat smooth muscle cells. *Hypertension*, 21, 900-905.
 - Jackson B, Franze L, Sumithran E, Johnston CI. Pharmacologic

-
- nephrectomy with chronic angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in renovascular hypertension in the rat. *J Lab Clin Med* 1990; 115:21-27.
- Kamikihara S, Mueller A, Lima V, et al. α 1- Adrenoreceptors in proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats. *Archives of Pharmacology* 2007; 376(1-2): 117-126.
 - Knepper SM, Buckner SA, Brune ME, DeBernardis JF, Meyer MD, Hancock AA. A-61603, a potent alpha 1-adrenergic receptor agonist, selective for the alpha 1A receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274(1):97-103.
 - Korsgaard N, Mulvany MJ. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension* 1988; 12:162-167.
 - Kurtz, A., and Wagner, C. Cellular control of renin secretion. *J. Exp. Biol.* 1999;202:219–225.
 - Laher I, Thompson LP, Gagne L. (1990). Protein Kinase C as a modulator of response amplification in vascular smooth muscle. *Blood Vessels*, 27, 333-340.
 - Li HT, Long CS, Gray MO, Rokosh DG, Honbo NY, Karliner JS., (1997). Cross talk between angiotensin AT1 and alpha 1-adrenergic receptors: angiotensin II downregulates alpha 1a-adrenergic receptor subtype mRNA and density in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.*, 81, 396-403.
 - Lin L, Mistry M, Stier CT Jr, Nasjletti A., 1991. Role of prostanoids in renin-dependent and renin-independent hypertension. *Hypertension*, 17, 517-25.
 - Li HT, Long CS, Gray MO, Rokosh DG, Honbo NY, Karliner JS. Cross talk between angiotensin AT1 and alpha 1-adrenergic receptors: angiotensin II downregulates alpha 1a-adrenergic receptor subtype mRNA and density in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1997;81(3):396-403.
 - Luft FC, Wilcox CS, Unger T, Kuhn R, Demmert G, Rohmeiss P, Ganten D, Sterzel RB., (1989). Angiotensin-induced hypertension in the rat. Sympathetic nerve activity and prostaglandins. *Hypertension*, 14, 396-403.
 - McGrath JC. Evidence for more than one type of postjunctional α -adrenoreceptor. *Biochem Pharmacol*, 1982; 31:467-484.

-
- Marano G, Argiolas L. (1994). Postjunctional regulation by Angiotensin II of α_1 -adrenoceptor-mediated pressor responses in the rat. *Eur J Pharmacol*, 261, 121-126.
 - Martínez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991; 17:707-719.
 - Martínez-Salas SG, Campos-Peralta JM, Pares-Hipolito J, Gallardo-Ortiz IA, Ibarra M, Villalobos-Molina R. Alpha1A-adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Auton Autacoid Pharmacol* 2007;27(3):137-42.
 - Mendez E, Calzada C, Ocharan E, Sierra A, Castillo C, Ramirez I, et al. Differential expression of alpha1-adrenergic receptor subtypes in coronary microvascular endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol* 2006;546(1-3):127-33.
 - Mistry M, Nasjletti A., (1988). Role of pressor prostanoids in rats with angiotensin II-salt-induced hypertension. *Hypertension*, 11, 758-762.
 - Morrow AL and Creese I (1986) Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of 3H-WB 4101 and 3H-prazosin binding. *Mol Pharmacol* 29:321–333.
 - Mulvany MJ. Control of vascular structure. *Am J Med* 1993; 94:20S-23S.
 - Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79:1193–1226.
 - Oliver E, Marti D, Monto F, Flacco N, Moreno L, Baretino D, et al. The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328(3):982-90.
 - Owens GK, Reidy MA. Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation. *Cir res* 1985; 57:695-670.
 - Owens GK, Schwartz SM. Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy,

-
- hyperploidy, and hyperplasia. *Circ Res* 1982; 51:280-289.
- Owens GK, Schwartz SM. Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ Res* 1983; 53:491-501.
 - Owens GK, Rabinovitch PS, Schwartz SM. Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:7759-7763.
 - Owen GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1987; 9:178-187.
 - Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW, Brown RD. Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(2):854-68.
 - Powell JS, Clozel J, Mueller M, et al. Inhibitors of angiotensin converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science Wash*, 1989; 245:186-188.
 - Purkerson ML, Martin KJ, Yates J, Kissane JM, Klahr S., (1986). Thromboxane synthesis and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 8, 1113-1120.
 - Ramracheya RD, Muller DS, Wu Y, et al. Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia* 2006; 49:321-31.
 - Ran J, Hirano T, Adachi M. Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E227-32.
 - Reams GP, Bauer JH. (1987). Angiotensin II potentiates the vasoconstrictive effect of norepinephrine in normotensive and hypertensive man. *J Clin Hypertens*, 3, 610-616.

-
- Romero JC, Knox FG. Mechanisms underlying pressure-related natriuresis: the role of the rennin-angiotensin and prostaglandin systems. *Hypertension*, 1988; 11: 724-738.
 - Ruan X, Chatziantoniou C, Arendshorst WJ., (1999). Impaired prostaglandin E(2)/prostaglandin I(2) receptor-G(s) protein interactions in isolated renal resistance arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34, 1134-1140.
 - Rudner XL, Berkowitz DE, Boot JV, et al. Subtypes specific regulation of human vascular α 1-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* 100;2336-2344.
 - Ruíz O, Ruperez M, et al. Renal and vascular hipertensión-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin nephrol hypertens* 2006; 15:159-66.
 - Ruíz OM, Egido J, et al. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor kappa pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends cardiovasc Med* 2007; 17: 19-25.
 - Salomonsson M, Brannstrom K, Arendshorst WJ. α (1)-adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278(1):F138-47.
 - Santos RA, Campagnole MJ, Andrade SP. Angiotensin (1-7): an update. *Regul Pept* 2000;91:4595-4098.
 - Santos RA, Castro CH, Gava E, et al. Impairment of in vivo Herat function in angiotensin (1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006; 47:996-1002.
 - Shi AG, Kwan CY and Daniel EE. Relation between density (maximum binding) and alpha adrenoceptor binding sites and contractile response in four canine vascular tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250:1119–1124.

-
- Siwik DA, Brown RD. regulation of protein synthesis by alpha 1 adrenergic receptor subtypes in cultured rabbit aortic vascular smooth muscle cells. *J cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:508-518.
 - Stahl RA, Helmchen U, Paravicini M, Ritter LJ, Schollmeyer P. Glomerular prostaglandin formation in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 1984; 247:F975-F981.
 - Tabrizchi R, Triggle CR. (1994). Pressor responses to the α_1 -adrenoceptor agonist cirazoline: effects the captopril, phenoxybenzamine and nifedipine. *J Physiol*, 93, 15-20.
 - Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, et al. The alpha (1D)- adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest*, 2002, 109: 765-775.
 - Ushikubi, F., Hirata, M., and Narumiya, S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J. Lipid Mediat. Cell Signal*, 1995. 12:343–359.
 - Van Kleef E, Smits J, Lombardi D, et al. A1- Adrenoreceptorblockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA síntesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Cir Res*, 1992; 70:1122-1127.
 - Vázquez-Cruz B, López P, Talamas-Rohana P, Escalante B. Increased renal vasoconstriction and gene expression of cyclooxygenase- 1 in renovascular hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2000; 36: 577-583.
 - Vazquez B, Escalante B. Renal vascular interaction of angiotensin II and prostaglandins in renovascular hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:21-7.
 - Villalobos-Molina R, Ibarra M., (1996). Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, 298, 257-263.

-
- Villalobos-Molina R, Lopez-Guerrero JJ, Ibarra M., (1997). Alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur. J. Pharmacol.*, 322, 225-227.
 - Villalobos-Molina, López-Guerrero JJ, Ibarra M. Functional evidence of 1D-adrenoreceptor in the vasculature of young and adults spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1999; 126:1534-1536.
 - Villalobos-Molina R, Vazquez-Cuevas FG, Lopez-Guerrero JJ, Figueroa-Garcia MC, Gallardo-Ortiz IA, Ibarra M, et al. Vascular alpha-1D-adrenoceptors are overexpressed in aorta of the aryl hydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Auton Autacoid Pharmacol* 2008;28(2-3):61-7.
 - Villalobos-Molina R, Ibarra M. Increased expression and function of vascular alpha1D-adrenoceptors may mediate the prohypertensive effects of angiotensin II. *Mol Interv* 2005;5(6):340-2.
 - Welch WJ, Patel K, Modlinger P, Mendonca M, Kawada N, Dennehy K, Aslam S, Wilcox CS. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1, AT2, and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293:H2644-H2649.
 - Wenzel UO, Wolf G, Jacob I, Schwegler C, Qasqas A, Amann K, et al. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:2005-2013.
 - Wilcox CS, Cardozo J, Welch WJ. AT1 and TxA2/PGH2 receptors maintain hypertension throughout 2K,1C Goldblatt hypertension in the rat. *Am J Physiol* 1996;271(4 Pt 2):R891-6.
 - Wilcox CS, Welch WJ, Snellen H. Thromboxane mediates renal hemodynamic response to infused angiotensin II. *Kidney Int* 1991; 40:1090-1097.

-
- Wilcox CS, Welch WJ., (1990). Thromboxane mediation of the pressor response to infused angiotensin II. *Am. J. Hypertens.*, 3, 242-249.
 - Wilcox, C.S., Cardozo, J., Welch, W.J., (1996). AT1 and TxA2/PGH2 receptors maintain hypertension throughout 2K,1C Goldblatt hypertension in the rat. *Am. J. Physiol.*, 271, R891-R896.
 - Xiang DF, Skopec J, Diederich A, et al. Prostaglandin H2 and tromboxane A2 are contractile factors in intrarenal arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19:795-8.
 - Ye JM, Colquhoun EQ. Changes in functional expression of alpha-1 adrenoceptors in hindlimb vascular bed of spontaneously hypertensive rats and their effects on oxygen consumption. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286(2):599-606.
 - Young D, Jingxin Q, Sharon H, et al. Regulation of type 1 angII receptor in vascular tissue: role of α 1-adreceptor. *American Physiological Society*, 1997, R1224-1229).
 - Zacharia J, Hillier C, MacDonald A. Alpha1-adrenoceptor subtypes involved in vasoconstrictor responses to exogenous and neurally released noradrenaline in rat femoral resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2004;141(6):915-24.
 - Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. (1996). Role of the Calcium-dependent K^+ channels in the regulation of arterial and venous tone by nitric oxide in Pigs. *Eur. J. Physiol.*, 432, 671- 677.
 - Zhong H and Minemann KP (1999) α 1-Adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 375:261–276.
 - Zhou, L., Vargas, H.M., (1996). Vascular alpha 1D-adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 305, 173-176.
 - Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P., (2002). Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in

conductance arteries. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.), 282, H475-H481.

- Zini S, Fournie MC, Chauvel E, et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 11968-73.