



**UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS
PROTEÍNAS RhoA, RhoB, Rac Y LAS ENZIMAS
eNOS, iNOS y nNOS EN PLACENTAS DE RATAS
DEFICIENTES DE ÓXIDO NÍTRICO”**

**TESIS QUE PRESENTA LA:
Q.F.B. ANNA KARENINA PRADO CORONADO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ASESOR:
DC. Daniel Godínez Hernández**

**CO-ASESOR:
DC. Salvador Manzo Avalos**

Morelia, Michoacán. Febrero 2012

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología y en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A mi Alma Mater la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por su trascendencia académica en mi existencia.

A mis asesores y comité tutorial por el tiempo y apoyo dedicado a este proyecto.

A la Maestra Blanca Nateras quien se convirtió en mi mamá del laboratorio, mi amiga y mi confidente, gracias por creer en mí, todo mi cariño, admiración y respeto.

Al Doctor Ignacio Valencia por todos sus consejos y dedicarle tanto tiempo a mi proyecto. Aun sin ser parte de mi comité, fue mi mejor asesor.

A mis compañeros del Laboratorio de Farmacología, en especial a Ney, Sandy, Said y el vecino César por su presencia y apoyo.

A mis compañeros de generación, especialmente a Lore, Julie y Gera por ser parte fundamental de este viaje, gracias por todos los momentos compartidos, consejos y regaños, su amistad es lo más valioso que me llevo de esta experiencia.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta aquí.

A mi Mami por ser mi pilar más importante, gracias por todo tu amor y por nunca dejarme sola a pesar de las adversidades. TE AMO CON TODO MI CORAZÓN MAMITA.

A mi Papá por enseñarme a trabajar con pasión, porque muy a tu manera siempre me has impulsado a crecer y ser independiente. Gracias a ti entendí que lo que no te mata te hace más fuerte.

A mi hermana Gunnary por enseñarme que el cielo no es el límite sino el comienzo y que el trabajo duro, creer en lo que uno hace y la tenacidad son la clave del éxito. Gracias por ser mi heroína Big Sis, te amo.

A mi hermano Neftalí por ser mi ejemplo de vida y mi mayor meta, por enseñarme que la inteligencia se lleva en el corazón y la sabiduría en el alma. Gracias Big Bro por todos tus consejos y regaños aun en la distancia, te amo.

A mi madrina Arcelia, por tanto amor y apoyarme siempre que te necesito, aun estando tan lejos. Gracias por enseñarme que la honestidad es la mejor carta de presentación, te amo tía.

A mi primita Blanche por ser mi ángel, por creer en mí, por apoyarme siempre y regalarme una de las experiencias más lindas de mi vida. Te amo prima.

A mis hermana de vida Mago y Ana Lau por todo su cariño y apoyo, por ser mis mejores amigas y nunca dejarme sola, gracias por tantos momentos felices las adoro con todo mi corazón.

... Al amor de mi vida Julián, por permitirme elegirte y elegirme. Por nunca dejarme caer e impulsarme a seguir adelante aun cuando el panorama era oscuro. Gracias por ser el único que nunca dudo que llegaría hasta aquí. Por aligerarme las frustraciones y desencantos y compartir alegrías y triunfos. Por toda tu paciencia y apoyo incondicional, este trabajo también es tuyo Bishito.

AMOTE PARA SIEMPRE...

ÍNDICE GENERAL

Pág.

ÍNDICE GENERAL.....	I
---------------------	---

ÍNDICE DE FIGURAS	III
-------------------------	-----

I. INTRODUCCIÓN	1
------------------------------	----------

1. Hipertensión arterial sistémica	1
---	----------

1.1 Clasificación de la hipertensión según su etiología	3
---	---

• Hipertensión arterial primaria	3
--	---

• Hipertensión arterial secundaria	3
--	---

2. Embarazo	4
--------------------------	----------

2.1 Placenta.....	4
-------------------	---

2.2 Vasos sanguíneos.....	7
---------------------------	---

2.2.1 Endotelio	9
-----------------------	---

2.3 Preeclampsia.....	10
-----------------------	----

3. Proteínas G.....	12
----------------------------	-----------

3.1 Proteínas G Monoméricas	13
-----------------------------------	----

3.2 RhoA, RhoB y Rac en la hipertensión	15
---	----

4. Óxido Nítrico Sintetas.....	18
---------------------------------------	-----------

5. El NO en la hipertensión.....	20
---	-----------

5.1 Hipertensión por deficiencia de NO.....	23
---	----

II. JUSTIFICACIÓN	24
--------------------------------	-----------

III. HIPOTESIS.....	24
----------------------------	-----------

IV. OBJETIVOS.....	24
---------------------------	-----------

V. METODOLOGÍA	26
-----------------------------	-----------

5.1 Protocolo experimental	26
----------------------------------	----

5.2 Inducción de la síntesis de ON	26
--	----

5.3	Reactivos.....	26
5.5	Análisis por Western blot de las proteínas Rho y las enzimas NOS	27
	a) Homogenización	27
	b) Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry	27
	c) Electroforesis	28
	d) Transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinil dieno (PVDF)	28
	e) Reacción Quimioluminiscente.....	29
5.6	Análisis estadístico.....	30
VI.	RESULTADOS	31
6.1	Determinación de los niveles de las enzimas eNOS, iNOS y nNOS.....	31
6.2	Determinación de los niveles de las proteínas RhoA, RhoB y Rac	34
VII.	DISCUSIÓN	39
VIII.	CONCLUSIÓN.....	45
IX.	PERSPECTIVAS	45
IX.	LITERATURA CITADA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

TABLA 1.	CLASIFICACIÓN Y MANEJO DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA EN ADULTOS..	2
FIGURA 1.	ESQUEMA DE UN CORTE TRANSVERSAL DE UNA PLACENTA A TÉRMINO QUE MUESTRA:	6
FIGURA 2.	ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.	8
FIGURA 3.	ESTRUCTURA DE LA CÉLULA ENDOTELIAL.	10
FIGURA 4.	MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RHO.	14
FIGURA 5.	BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.	19
FIGURA 6.	MECANISMO DE RELAJACIÓN INDUCIDO POR LA ACTIVACIÓN DE LA GCs A TRAVÉS DEL NO.	21
FIGURA 7.	INTERACCIÓN ENTRE EL NO Y RHO.	22
FIGURA 8.	INMUNODETECCIÓN DE LA ENZIMA ENOS EN MUESTRAS DE CORDÓN Y COTILEDÓN DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON L-NAME.	32
FIGURA 9.	INMUNODETECCIÓN DE LA ENZIMA INOS EN MUESTRAS DE CORDÓN Y COTILEDÓN DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON L-NAME.	33
FIGURA 10.	INMUNODETECCIÓN DE nNOS. EN EL PANEL A OBSERVAMOS LA PLACA DONDE ESPERÁBAMOS ENCONTRAR LA BANDA CORRESPONDIENTE A nNOS SIN RESULTADO ALGUNO.	34
FIGURA 11.	INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RHO A EN MUESTRAS DE CORDÓN Y COTILEDÓN DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON L-NAME.	36
FIGURA 12.	INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RHO B EN MUESTRAS DE CORDÓN Y COTILEDÓN DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON L-NAME.	37
FIGURA 13.	INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RAC EN MUESTRAS DE CORDÓN Y COTILEDÓN DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON L-NAME.	38

I. INTRODUCCIÓN

1. Hipertensión arterial sistémica

La presión arterial (PA) se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial y se expresa a través de diferentes parámetros, tales como la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica. Con frecuencia se señala que la presión arterial está controlada por el gasto cardíaco (GC) el cual está determinado por la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción, los cuales a su vez están en función del retorno venoso que depende de otros factores como: la actividad constrictora o dilatadora de las venas, la actividad del sistema renal y la resistencia vascular periférica total (RVPT) que es igual al producto de ambas presiones y dependerá de la actividad constrictora o dilatadora de las arteriolas, del sistema renina-angiotensina y de la propia magnitud del gasto cardíaco, entre otros. La elevación de las cifras de la PA por encima de los valores normales es uno de los problemas de salud más frecuentemente observados en la población mexicana (SSA, 2001). La hipertensión arterial es una de las enfermedades cardiovasculares más importantes, debido a su prolongado tiempo de evolución y a las complicaciones que puede generar (ENSA, 2000).

La hipertensión es un problema de salud pública con consecuencias frecuentemente devastadoras. Representa uno de los factores de riesgo más importantes para infarto agudo al miocardio y para los accidentes cerebrales vasculares; puede conducir a hipertrofia e insuficiencia cardíaca, disección aórtica e insuficiencia renal (Robins *et al.*, 2005).

La HA se consideraba tradicionalmente como el proceso hemodinámico en el cual las resistencias al flujo sanguíneo se encuentran elevadas, en la

actualidad se define como el aumento del tono vascular del sistema circulatorio (Cruz, 2001).

Se considera HA cuando el promedio de la presión arterial, tomada en dos ocasiones, es mayor o igual a 140 mmHg para la presión sistólica y/o mayor o igual a 90 mm Hg para la presión diastólica (Tabla 1, Chabanian *et al.*, 2003). Mientras más alta sea la presión arterial, más grande es la posibilidad de sufrir un ataque al corazón, insuficiencia cardiaca, embolia y enfermedades del riñón.

Tabla 1. Clasificación y manejo de la presión sanguínea en adultos. Modificado de JNC 7 2003.

Clasificación de la Presión Sanguínea	Presión Sanguínea Sistólica (mmHg)	Presión Sanguínea Diastólica (mmHg)
Normal	80-120	60-80
Pre hipertensión	121-139	o 81-89
Estado 1 de la Hipertensión	140-159	o 90-99
Estado 2 de la Hipertensión	≥160	o ≥100

La presión arterial elevada suele deberse a una combinación de varias anormalidades (multifactorial). Varios reportes epidemiológicos señalan que factores hereditarios, factores ambientales y el estilo de vida entre los que se incluye el estrés, el consumo excesivo de sal, el consumo de alcohol, el sedentarismo, el tabaquismo, la obesidad y la edad avanzada pueden predisponer al individuo al desarrollo de la hipertensión, la cual afecta principalmente a los adultos y a los ancianos (Brenner, 2004).

1.1 Clasificación de la hipertensión según su etiología

Existen dos categorías para clasificar a la PA elevada según la causa por la que se presente:

- **Hipertensión arterial primaria**

La HA primaria (idiopática o esencial) la padecen aproximadamente del 90 al 95% de los pacientes con hipertensión. La causa de este desorden no se conoce aún, pero los distintos estudios indican que los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la HA primaria. Esta enfermedad puede ser dañina por efectos primarios como el aumento del trabajo del corazón y la lesión de las propias arterias por la presión excesiva (SSA, 2001).

- **Hipertensión arterial secundaria**

Es la hipertensión de causa conocida, la padecen aproximadamente entre el 5 y el 10% del total de los pacientes con hipertensión. Es importante diagnosticarla a tiempo porque en algunos casos pueden curarse con cirugía o con tratamiento médico específico del padecimiento que esta originando la hipertensión. Las causas de este tipo de hipertensión pueden ser enfermedades que produzcan carga de volumen con aumento del líquido extracelular, por vasoconstricción que da un aumento de la RVPT y por combinación de sobrecarga de volumen y vasoconstricción (SSA, 2001).

2. Embarazo

El periodo de desarrollo fetal se llama embarazo o gestación, durante el cual las mujeres gestantes exhiben un proceso de adaptación fisiológico, dando lugar a modificaciones a nivel anatómico, bioquímico y endócrino, mismos que se inician desde el momento de la concepción y algunos de ellos persisten hasta después del alumbramiento (Khalil et al., 1998).

El embarazo normal está asociado con cambios hemodinámicos marcados como un incremento en el ritmo cardiaco, en el gasto cardiaco, en el volumen plasmático y en el flujo sanguíneo uterino y renal (Auger et al., 2004). Sin embargo, a pesar de estos incrementos existe una significativa disminución tanto de la presión arterial, aproximadamente 10 mm Hg, como de la resistencia periférica total (Khalil et al., 1998).

En el control de la presión arterial, durante el embarazo normal, participan diversos sistemas presores como el sistema nervioso autónomo y la producción de catecolaminas, el sistema renina angiotensina y la vasopresina, los cambios mediados por el volumen y la función de las células endoteliales (Baergen, 2005).

2.1 Placenta

La placenta es el único órgano transitorio endocrino en las hembras de los mamíferos que se presenta durante el desarrollo embrionario. Cumple una función vital ya que tiene una relación íntima entre el embrión y la madre y a través de esta última con el medio (Aban et al., 1992). Las principales funciones de la placenta son: de tipo metabólico, como síntesis de glucógeno colesterol y ácidos grasos; el intercambio de gases respiratorios como oxígeno, dióxido y monóxido de carbono; la transferencia de nutrientes como vitaminas, hormonas y anticuerpos; y la eliminación de

productos de desecho y secreción endocrina para conservar el embarazo (Moore y Persaud, 2004).

La formación de la placenta ocurre a partir de la fecundación del óvulo por el espermatozoide (Walker, 2003). La mórula resultante sufre un proceso de diferenciación, que lleva por un lado a la formación del producto y por otro a la formación de la placenta (Cross, 2005).

La placenta cuenta con una porción fetal y una materna (figura 1), la porción fetal está formada por dos partes, una capa celular interna llamada citotrofoblasto y una capa celular externa denominada sincitiotrofoblasto (Raouf, 2002), el cual aparece alrededor del quinto día para que el embrión pueda implantarse en el sexto día en la mucosa uterina. La implantación es posible gracias a que esta parte tiene enzimas con actividad proteolítica, capaces de lisar parte del epitelio en la que tiene que implantarse y gracias a ello, iniciar las relaciones materno-fetal (Brenner et al., 2002).

La porción materna comprende la mucosa uterina, que en cada ciclo menstrual se prepara por la acción de una serie de hormonas ováricas (foliculina y progesterona) para la anidación, la cual se lleva a cabo alrededor del día 21, momento que coincide con el máximo engrosamiento y vascularización de esta mucosa, que además contiene una gran cantidad de glucógeno. Todo esto hace que el blastocisto encuentre las condiciones idóneas para implantarse y nutrirse (Brenner et al., 2002).

Hacia el final de la tercera semana se establecen las condiciones anatómicas necesarias para el intercambio fisiológico entre la madre y el embrión. Hacia el final de la cuarta semana se establece una red vascular compleja en la placenta que facilita el intercambio materno-embriionario

de gases, nutrientes y productos de deshechos metabólicos (Moore y Persaud, 2004).

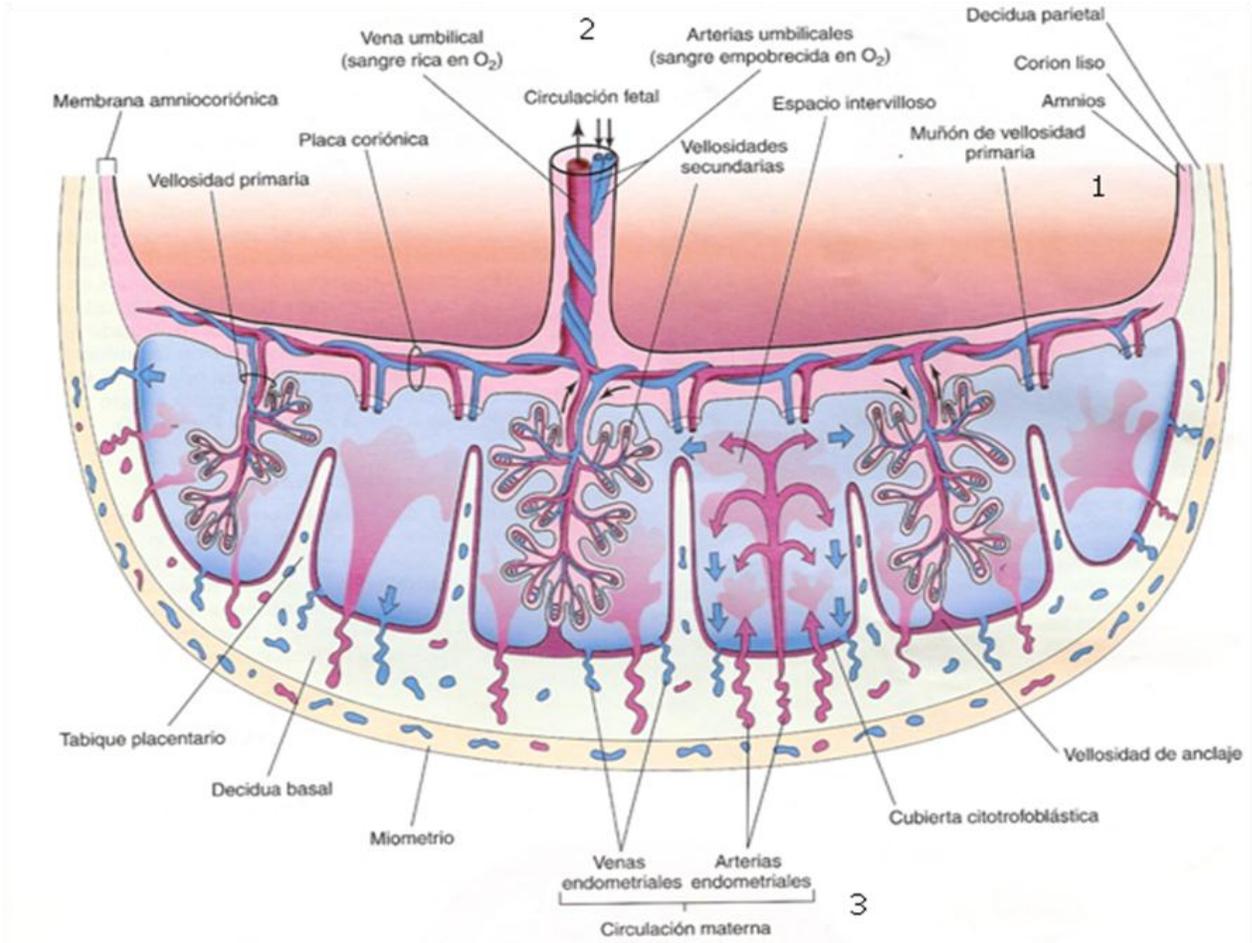


Figura 1. Esquema de un corte transversal de una placenta a término que muestra: 1) relación de corion veloso (parte fetal de la placenta) con la decidua basal (parte materna de la placenta), 2) circulación placentaria fetal y 3) circulación placentaria materna. Obsérvese que las arterias umbilicales llevan sangre poco oxigenada (en azul) a la placenta y que la vena umbilical lleva sangre oxigenada (en rojo) al feto (Moore y Persaud, 2004).

Otro componente placentario es el cordón umbilical el cual se origina cuando la cavidad amniótica crece rápidamente a expensas de la cavidad coriónica. Se une con la superficie fetal y su epitelio se une con el

amnios, el cual se adhiere a la superficie fetal de la placenta (Raouf, 2002). El cordón umbilical está formado por dos arterias y una vena, rodeadas por tejido conjuntivo mucoide (gelatina de Wharton). Su función es el transporte de sustancias nutritivas y sangre rica en oxígeno entre el embrión y la placenta. La longitud del cordón umbilical varía entre 50 y 60 cm por 1.5 cm de diámetro (Sasaki et al., 2006).

El flujo sanguíneo de la placenta no está controlado por el sistema nervioso puesto que la placenta es un órgano no innervado (Shconfelder et al., 1996). Se ha reportado que el flujo sanguíneo de la placenta está regulado por la acción directa del óxido nítrico sobre los vasos sanguíneos placentarios (Roselli et al., 1998).

2.2 Vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son las estructuras encargadas de transportar toda la sangre hasta las células. Se subdividen en arterias, venas y capilares. Las arterias son vasos que transportan la sangre desde el corazón hacia el resto de los órganos, se caracterizan por disminuir progresivamente de diámetro y por subdividirse continuamente. Las venas por su parte, son vasos que transportan la sangre desde los órganos hasta el corazón, a diferencia de las arterias, estos vasos se van uniendo progresivamente de modo que aumentan continuamente de diámetro. Finalmente, los capilares son vasos de calibre pequeño, que se encuentran en medio de las arterias y las venas (Dvorkin y Cardinali, 2003).

La pared de los vasos sanguíneos consiste en tres capas principalmente: la íntima también conocida como endotelio, la media y la adventicia (figura 2). Los capilares, los cuales tienen solamente una capa íntima de células endoteliales sobre la lamina basal, son la excepción. Respecto a la

organización de las capas, se pueden distinguir cuatro bloques de construcción en la pared vascular, del exterior al interior encontramos: células del músculo liso, fibras de colágeno, fibras elásticas y células endoteliales (Lermoli, 2003).

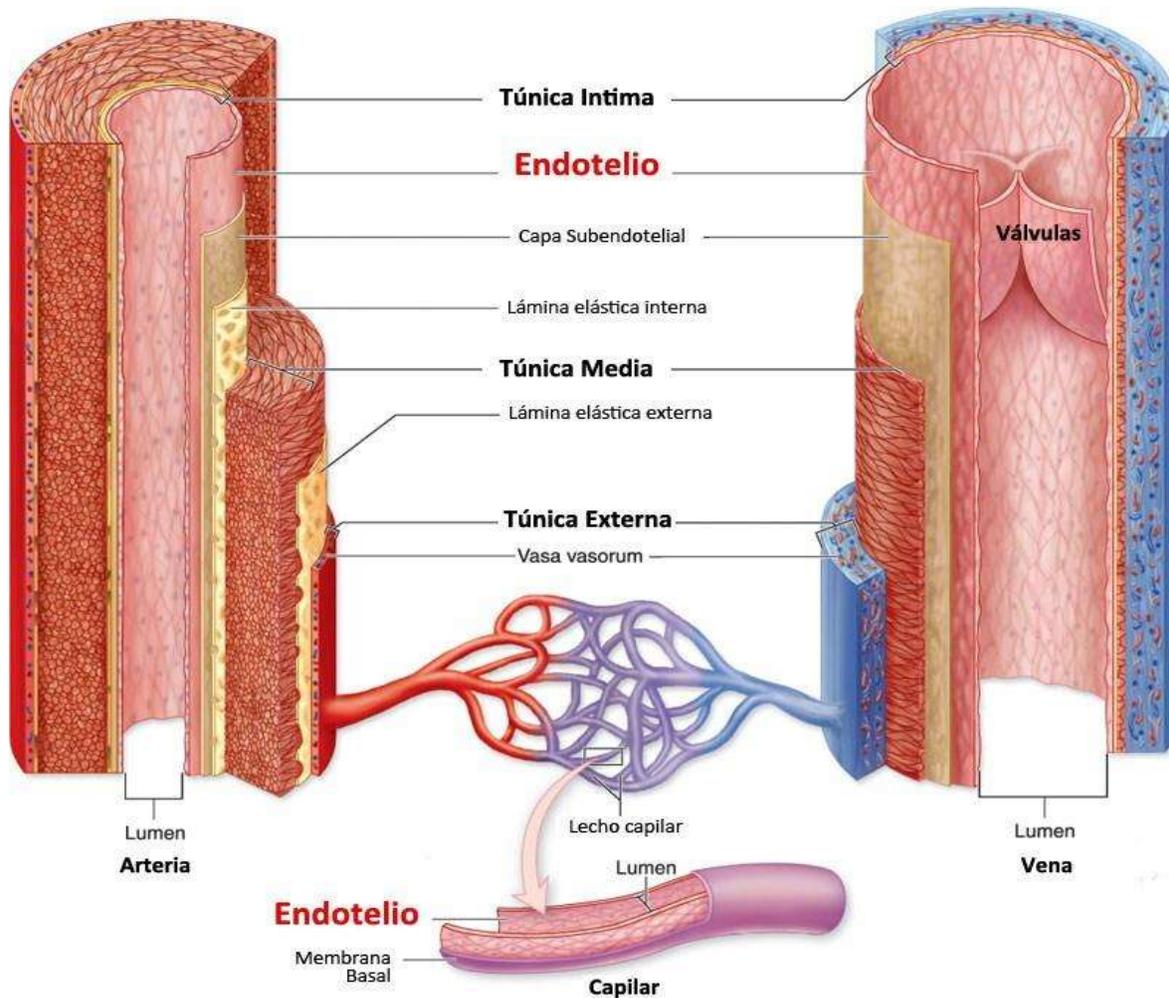


Figura 2. Estructura de los vasos sanguíneos. Corte transversal de arteria, capilar y vena, se muestran las capas que componen a cada vaso, las cuales son tres capas principales: túnica íntima, túnica media y túnica externa y las diferencias entre dichas capas dependiendo del vaso, Dvorkin y Cardinali, 2003.

2.2.1 Endotelio

El endotelio es la capa de células que recubre la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos del organismo (figura 3). Es la estructura reguladora más importante entre el flujo sanguíneo y la pared vascular. El endotelio intacto es una de las condiciones más importantes para evitar la vasoconstricción, principal características de los trastornos hipertensivos. La mayoría de las enfermedades cardiovasculares cursan por algún grado de disfunción endotelial. El endotelio es un órgano regulador, sensor, transductor, que además de sus obvias funciones de barrera y transporte, modula su entorno a través de la producción de una serie de mediadores biológicamente activos que regulan el tono vascular, la interacción con células (plaquetas, monocitos y otros leucocitos), la coagulación y el crecimiento del músculo liso vascular (Dvorkin y Cardinali, 2003).

Los mediadores biológicos que sintetiza el endotelio para llevar a cabo sus funciones se dividen en dos grupos: los vasodilatadores donde encontramos al óxido nítrico (NO, por su siglas en inglés), al factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDRF, por sus siglas en inglés) y a la prostaciclina (PGI₂); y los vasoconstrictores como son la endotelina (ET-1), el tromboxano (TXA₂) y la prostaglandina H₂ (PGH₂). El principal mediador de una función endotelial normal es el óxido nítrico. En este sentido, en condiciones normales predomina la acción de los agentes vasodilatadores (Lermoli, 2003).

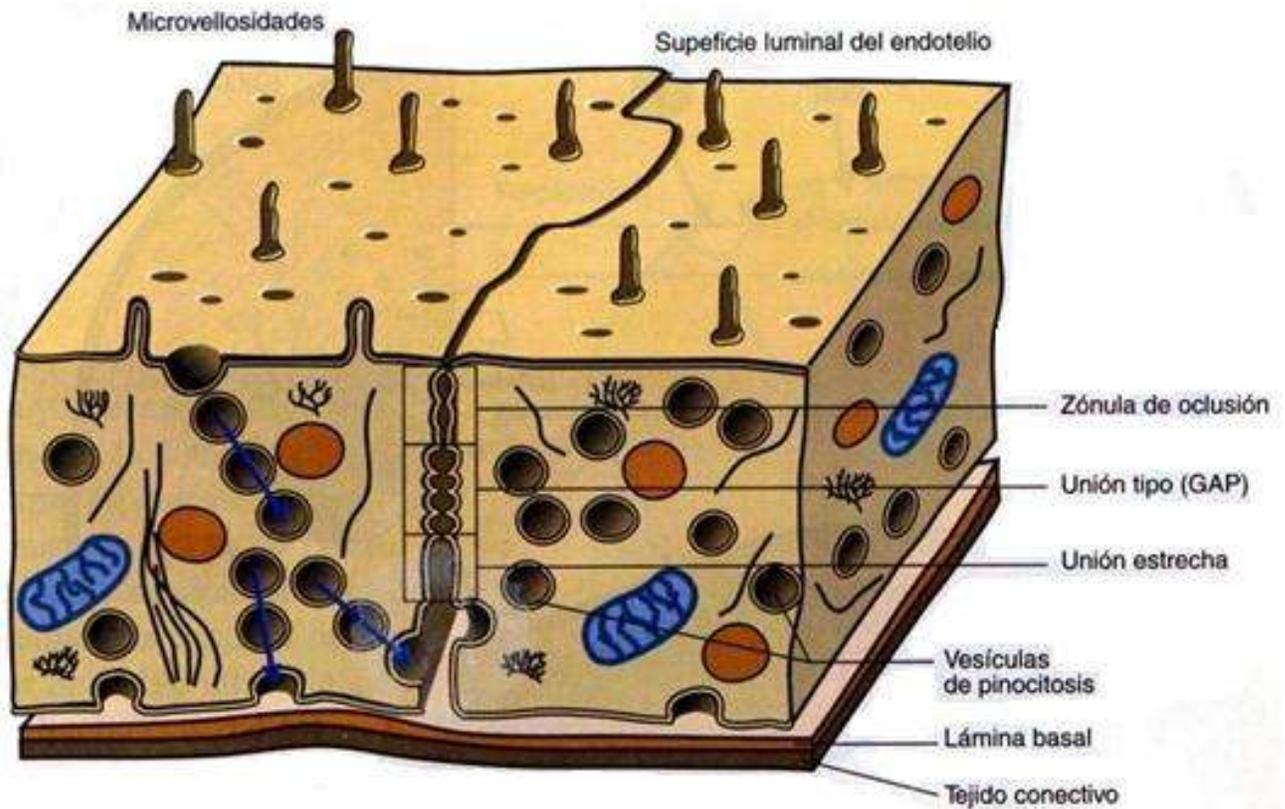


Figura 3. Estructura de la célula endotelial. Best y Taylor, 2003.

2.3 Preeclampsia

Existen diferentes trastornos hipertensivos asociados al embarazo dentro de los cuales se encuentran: la hipertensión crónica con preeclampsia sobreagregada, la preeclampsia, la eclampsia y el síndrome de HELLP, entre otros (Gant, 1982).

La preeclampsia (PE), también conocida como hipertensión asociada al embarazo, se define como la elevación sostenida de la presión arterial mayor o igual a 140 mm Hg sistólica y/o 90 mm Hg diastólica, por lo menos

en dos registros con un mínimo de 6 horas entre uno y otro; o bien, una elevación de 30 mm Hg o más en la presión sistólica y 15 mm Hg o más en la presión diastólica, sobre las cifras previas existentes en el primer trimestre del embarazo (Centro Nacional de Equidad y Género y Salud Reproductiva, 2007). Además, la preeclampsia se caracteriza por la aparición de albuminuria, edema, hiperuricemia y a veces anomalías de la coagulación. Ocurre después de las veinte semanas de embarazo. En algunas pacientes, la PE puede ir de leve a severa y puede requerir hospitalización, monitoreo intensivo, inducción del parto prematuramente y terapia parenteral anti-hipertensiva y anticonvulsiva (Chabanian et al., 2003).

La preeclampsia es una de las principales causas de mortalidad materna, fetal y neonatal en todo el mundo. Se ha estimado que del 5 al 8% de los embarazos se ven afectados por este desorden, resultando en una enfermedad de alta morbilidad (Lain y Roberts, 2002). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 8 y el 10% de las mujeres que se embarazan en Latinoamérica sufren de PE. En México, la PE es la complicación más frecuente del embarazo y la primera causa de ingreso de pacientes embarazadas a las unidades de terapia intensiva debido a hemorragias masivas (Estrada-Altamirano et, al., 2002). En Michoacán, las principales causas de muerte materna están asociadas a hemorragias obstétricas y a la preeclampsia/eclampsia. En el 2008, se registraron 40 defunciones en mujeres embarazadas, durante el parto o en el puerperio; el grupo de edad más frecuente fue el de 25 a 29 años (SINAIS, 2008).

Por otro lado, existen diversas hipótesis sobre el origen de la preeclampsia; una de ellas es la invasión inadecuada del trofoblasto, que lleva a la remodelación incompleta de las arterias espirales uterinas y por lo tanto a una perfusión placentaria reducida, la cual a su vez conduce a la

disfunción generalizada del endotelio vascular materno. En el embarazo normal, la proliferación, migración e invasión de las células del trofoblasto son estrictamente reguladas in situ (Chakraborty et al., 2002). Normalmente, las células del trofoblasto invaden el miometrio y la decidua materna en un proceso denominado pseudovasculogénesis. La migración de estos trofoblastos transforman las arteriolas espirales maternas, que suministran la sangre materna a la placenta a partir de vasos de resistencia de calibre pequeño, a vasos de gran calibre, permitiendo un adecuado flujo sanguíneo materno. En la PE, este proceso es desordenado y el trofoblasto fetal no invade adecuadamente el miometrio materno ni las arterias espirales (Brosens et al., 1972).

3. Proteínas G

Las proteínas G son una familia de proteínas que unen nucleótidos de guanina, de ahí su denominación (Kaziro et al., 1991). Se dividen principalmente en 2 clases, dependiendo de su peso y estructura molecular: las heterotriméricas, que constan de 3 subunidades (α , β y γ) funcionan como transductores de los receptores de la membrana plasmática (Blackmore et al., 1985) y las monoméricas, que son interruptores moleculares que controlan procesos celulares complejos como la regulación del citoesqueleto de actina, el tráfico vesicular, el crecimiento celular, la citocinesis y la transcripción génica. Ambos tipos de proteínas G, ciclan entre dos estados conformacionales: uno unido a GTP (estado activo) en el cual interactúan con una de las más de sesenta de sus proteínas blanco (efectores) y el otro estado unido a GDP (estado inactivo) (Werner, 2004).

3.1 Proteínas G Monoméricas

Dentro de las proteínas G monoméricas encontramos a la superfamilia de Ras que es particularmente interesante ya que sus miembros son reguladores maestros de muchos procesos celulares. Estas GTPasas se clasifican en cinco grupos: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran. De la familia de Rho, en mamíferos se han descrito veinte proteínas distintas: Rho (isoformas A, B y C), Rac (isoformas 1, 2 y 3), Cdc42, TC10, TCL, Chp (isoformas 1 y 2), Rho G, Rnd (isoformas 1, 2 y 3), Rho BTB (isoformas 1 y 2), Rho D, Rif y TTF (Werner, 2004). Como en otros miembros de la superfamilia de Ras, la activación de las proteínas Rho es promovida por una señal río arriba que activa factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, por sus siglas en inglés) que catalizan el intercambio de nucleótidos y median la activación, mientras que las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs, por sus siglas en inglés) promueven la hidrólisis de GTP, conduciéndola a su inactivación (Bustelo et al., 2007). Los Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina Rho (Rho-GDIs; por sus siglas en inglés) estabilizan la forma inactiva de la proteína (unida a GDP, figura 4) (Etienne-Manneville y Hall, 2002).

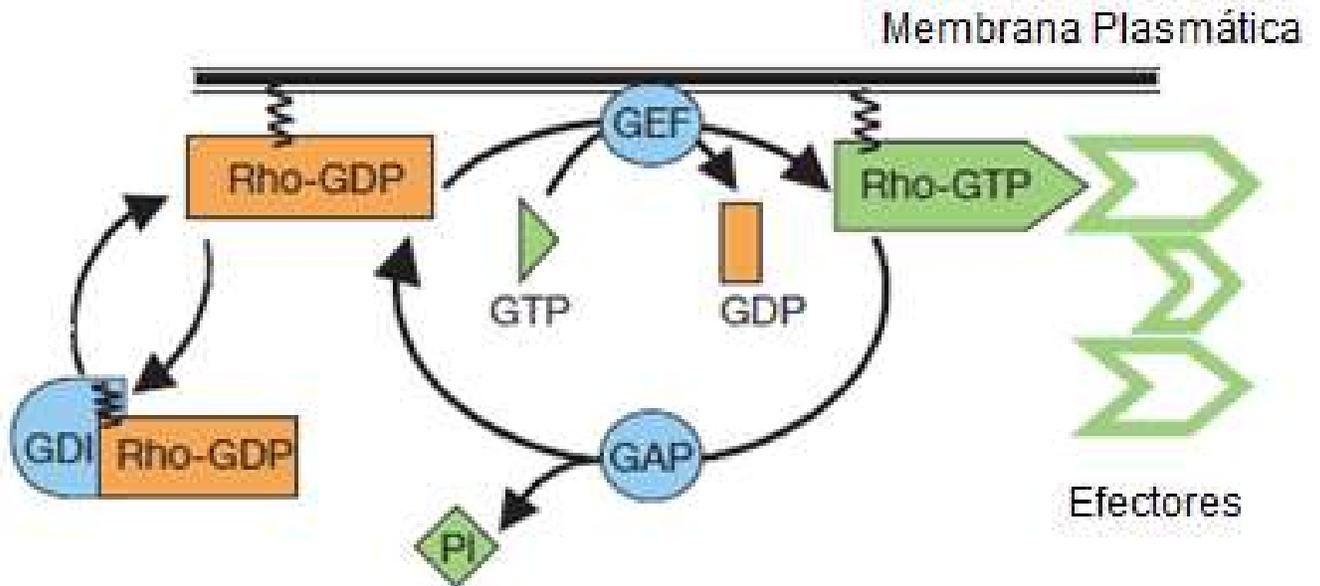


Figura 4. Mecanismo de activación de las proteínas Rho. Esquema de las proteínas Rho ciclando entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. Etienne y Hall, 2002.

Las GTPasas de la familia Rho comprenden al menos veintidós genes en humanos que codifican por lo menos para veintidós proteínas (Wherlock y Mellor, 2002). Estas coordinan diversos procesos celulares que incluyen fagocitosis, mitogénesis, adhesión celular, expresión génica, progresión del ciclo celular, remodelación del citoesqueleto de actina y apoptosis celular (Ridley, 1995; Etienne-Manneville y Hall, 2002). Un papel general de estas proteínas es el establecimiento de la polaridad celular a través de la regulación del citoesqueleto de actina. Controlan la polimerización, ramificación y agrupación de las fibras de actina permitiendo así la remodelación del citoesqueleto hacia distintos tipos de elementos (Wherlock y Mellor, 2002).

Las proteínas como RhoA, Rac1 y Cdc42 y otros miembros de la familia se piensa que interactúan con algunos efectores a través de una región

adicional de 13 residuos conocida como región de inserción, la cual es una característica distintiva de la familia de las GTPasas. Existen evidencias de que RhoA estimula la polimerización de los filamentos de actina hacia la formación de fibras de estrés, Rac reorganiza la actina para producir lamelopodios (protrusión del eje principal de la célula que sirve para la quimiotaxis) y Cdc42 está asociado con la formación de proyecciones delgadas ricas en actina llamadas filopodios (pseudópodo fino soportado por microfilamentos) (Takai et al., 2001; Wherlock y Mellor, 2002).

Se conocen veintiocho diferentes efectores para las proteínas Rho entre los cuales se incluyen las cinasas de fosfoinositidos (PI3K; por sus siglas en inglés), Rho-cinasa o cinasa asociada a Rho (ROCK; por sus siglas en inglés) y proteínas que interactúan con actina (Werner, 2004).

3.2 RhoA, RhoB y Rac en la hipertensión

En el 2004, Seasholtz y Brown describieron que la activación de las proteínas Rho en la vasculatura del músculo liso es suficiente para producir vasoconstricción y por lo tanto elevar la presión sanguínea. La contracción del músculo liso vascular está regulada por el incremento de Ca^{2+} intracelular, además otro mecanismo que contribuye a la contracción del músculo liso vascular es la sensibilización al Ca^{2+} , que ocurre independientemente del incremento en Ca^{2+} intracelular y es mediado por la proteína RhoA.

El incremento de la resistencia vascular está involucrado en la patogénesis de la hipertensión. En este sentido existen reportes donde el compuesto Y-27362, un inhibidor específico de la Rho-cinasa, corrige dramáticamente la hipertensión en varios modelos de ratas hipertensas, teniendo poco efecto

en ratas normotensas, indicando un aumento en la señalización de RhoA/Rho-cinasa durante la hipertensión (Uehata et al., 1997).

El compuesto Y-27632 también produce dilatación cerebral (en la arteria basilar), lo cual es significativamente mayor en ratas espontáneamente hipertensas o ratas donde se induce la hipertensión mediante el tratamiento con L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa) en comparación con ratas normotensas (Chrissolis y Sobey, 2001).

Estos estudios resaltan la importancia de la vía RhoA/Rho-cinasa en el control de la presión sanguínea y sugieren una relación en la medida de la expresión/activación de Rho y la presión sanguínea puesto que se ha relacionado esta ruta con estados prolongados de contracción del músculo liso vascular (VSMC; por sus siglas en inglés) (Friedl et al., 2006). La proliferación y migración de las VSMC son también respuestas dependientes de Rho y de igual manera están aumentadas en la hipertensión (Seasholtz y Brown, 2004).

Otros estudios han revelado que la vía de RhoA/Rho-cinasa esta activada en el sistema nervioso central de ratas espontáneamente hipertensas y contribuyendo a la regulación de la presión sanguínea a través del sistema nervioso simpático (Moriki, et al. 2003).

La proteína Rho B se localiza en vesículas internas y en la membrana nuclear. Se sabe que cuando Rho B está activa, su blanco es la proteína cinasa N (PKN1), la cual es un efector de Rho en los endosomas, donde regula el trafico endosomal mediado por el receptor EGF. Además, estimula el ensamblaje de los filamentos de actina y regula el transporte endosomal a través de la proteína efectora DIAPH1. Algunos estudios genómicos han demostrado la regulación a la alta de las proteínas Rho B y Rab en la

gestación del cerdo de Guinea. En células neuronales, Rho B es el principal regulador de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (Conway et al., 2004).

Se ha determinado la presencia de Rho B y su efector DIAPH1 en el miometrio humano, donde los niveles del efector aumentaron en muestras de mujeres embarazadas comparadas con mujeres normales, lo que sugiere que esta proteína está implicada en la regulación de las interacciones actina-miosina durante el embarazo (Lartey et al., 2007).

Además de RhoA y RhoB, existen reportes de que Rac es considerada como un mediador central de la fisiología vascular, reactividad vascular y regulación de la presión sanguínea (Nowicki et al., 2001).

Rac estimula la cascada de señalización de la cinasa del amino terminal de JUN (JNK), resultando en la fosforilación del factor de transcripción c-Jun, aumentando su potencial de activación transcripcional y por lo tanto afectando la expresión de varios genes. También se sabe que la actividad de Rac disminuye en placentas de mujeres con PE, comparadas con placentas de mujeres normales. Donde además, la actividad de la vía de transducción de señales dependiente de JNK es regulada río abajo en la PE. Lo anterior sugiere que la regulación de esta vía está involucrada en la alteración de genes importantes para la invasión, proliferación y adhesión de células placentarias en la PE (Hannke-Lohmann et al., 2000).

Otro papel importante de la proteína Rac es el de regular el ensamblaje de los componentes del complejo NADPH oxidasa, la cual fue descrita por primera vez en fagocitos y neutrofilos. Recientemente, un complejo NADPH oxidasa regulado por Rac, se ha caracterizado en células no fagocíticas, tales como las del músculo liso vascular, cardiomiocitos y células endoteliales (Griendling et al., 2000).

Por otro lado, Seasholtz y Brown en 2004, reportan que la actividad de la eNOS puede proteger contra los cambios contráctiles asociados a la actividad de Rho A en la hipertensión y que a su vez existe también una retroalimentación negativa, donde al estar activa Rho A esta inhibe la expresión del RNAm de eNOS, por lo tanto los niveles de NO disminuyen lo cual conlleva a la hipertensión.

4. Óxido Nítrico Sintetas

Las enzimas encargadas de la síntesis del NO son las NOS. La síntesis del NO se lleva a cabo en diversas células, además de las endoteliales (Moncada et al., 1991).

Existen cuatro isoformas de la óxido nítrico sintasa. Estas enzimas son citosólicas y las expresan genes diferentes, dos son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina, una es inducible por citocinas y otra se localiza en las mitocondrias. Dichas isoformas son: la endotelial (eNOS o NOS III), la inducible (iNOS o NOS II), la neuronal (nNOS o NOS I) y la mitocondrial (mtNOS) (Ghafourifar et al., 2007). Estas enzimas catalizan la oxidación sucesiva de alguno de los dos residuos amino guanidino de la L-arginina para formar dos intermediarios inestables, la NG -hidroxi-L-arginina y posteriormente la NG -oxo-L-arginina de mayor estado de oxidación. De esta última se libera el óxido nítrico y la L-citrulina (Figura 5, Moncada et al., 1991).

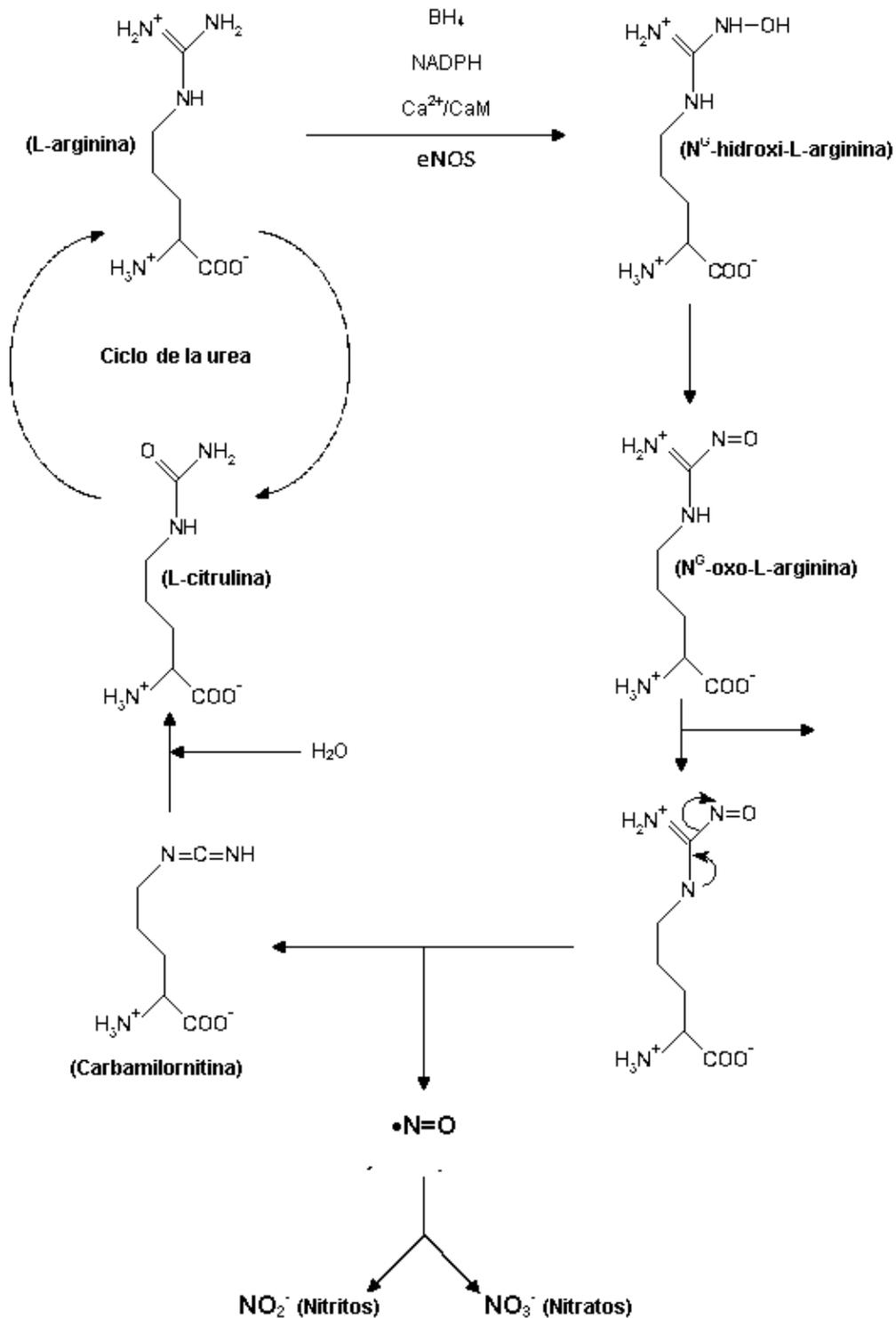


Figura 5. Biosíntesis del óxido nítrico. La NOS cataliza la oxidación de 5 electrones de un nitrógeno guanidino de la L-arginina, para generar NO y L-citrulina. La N^G-hidroxi-L-hidroxiarginina es un intermediario que está estrechamente unido a la enzima. Ambos pasos de la reacción son independientes de calcio/calmodulina y esta reacción se potencia con la presencia de la tetrahydrobiopterina, Moncada et al., 1991

5. El NO en la hipertensión

Existe una fuerte relación entre la ruta de señalización de Rho y el NO en la hipertensión. La inhibición de la actividad de las proteínas Rho, mediante el uso de estatinas o la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, regula negativamente la expresión de la eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial; por sus siglas en inglés) (Laufs y Liao, 1998) y de la iNOS (Muniyappa et al., 2000) en células endoteliales humanas y VSMC de rata, respectivamente.

El NO es un potente vasodilatador que se produce en la vasculatura (mayormente producido en las células endoteliales en respuesta a un incremento del Ca^{2+} intracelular) a través de la conversión de L-arginina a L-citrulina por alguna de las isoformas de la NOS (Wu, et al. 1998).

El NO juega un papel importante en diferentes procesos fisiológicos, tales como la regulación de la presión sanguínea y el tono vasomotor, las interacciones endotelio-plaquetas, la neurotransmisión, el control de la proliferación celular y la inmunomodulación. Una disfunción en la formación del NO y/o el aumento en el metabolismo de este, se sabe que juega un papel importante en la patogénesis de la hipertensión y otros desordenes cardiovasculares (Török 2008).

El NO es producido en el endotelio por acción de la eNOS. Debido a su naturaleza gaseosa, es capaz de difundir a capas más internas, llegando a las células musculares lisas donde se unirá a la guanilato ciclasa soluble (GCs), activándola y produciendo GMPc, que activará la PKG (Proteína Cinasa C), la cual podrá actuar sobre distintos sustratos, siendo uno de los más estudiados la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (PCLM), cuya fosforilación (P-CLMP) permite llevar a cabo la defosforilación de la CLM (Cadena Ligera de Miosina) dando lugar a la relajación celular o vasodilatación (Figura 6, Chou et al. 1998).

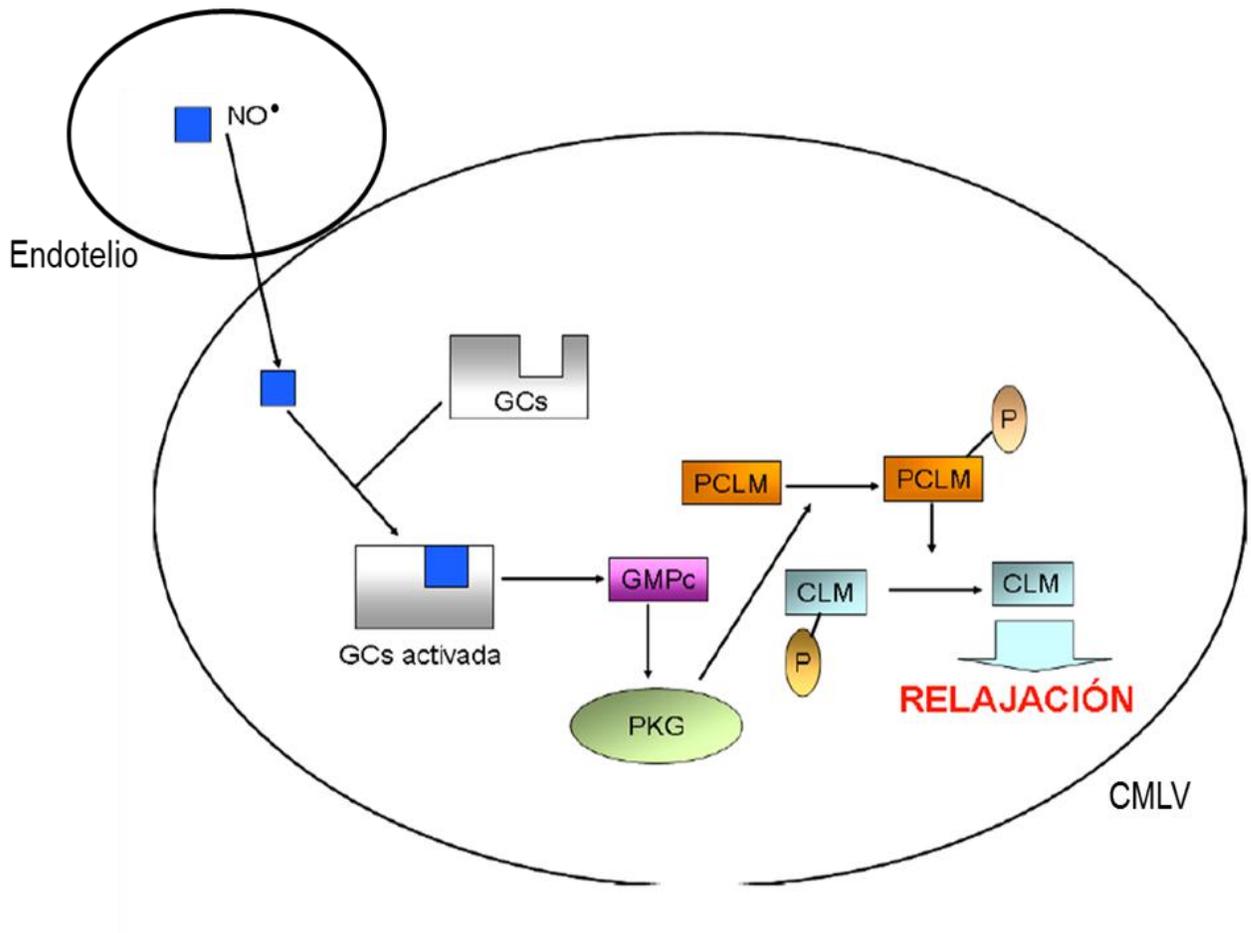


Figura 6. Mecanismo de relajación inducido por la activación de la GCs a través del NO. Marín-Garrido, 2007.

El estudio realizado por Sandu *et al.*, en el 2001 demostró que la relajación vascular inducida por NO endógeno se lleva a cabo principalmente a través de la inhibición de la actividad de la RhoA/Rho-cinasa en la aorta de rata (figura 7).

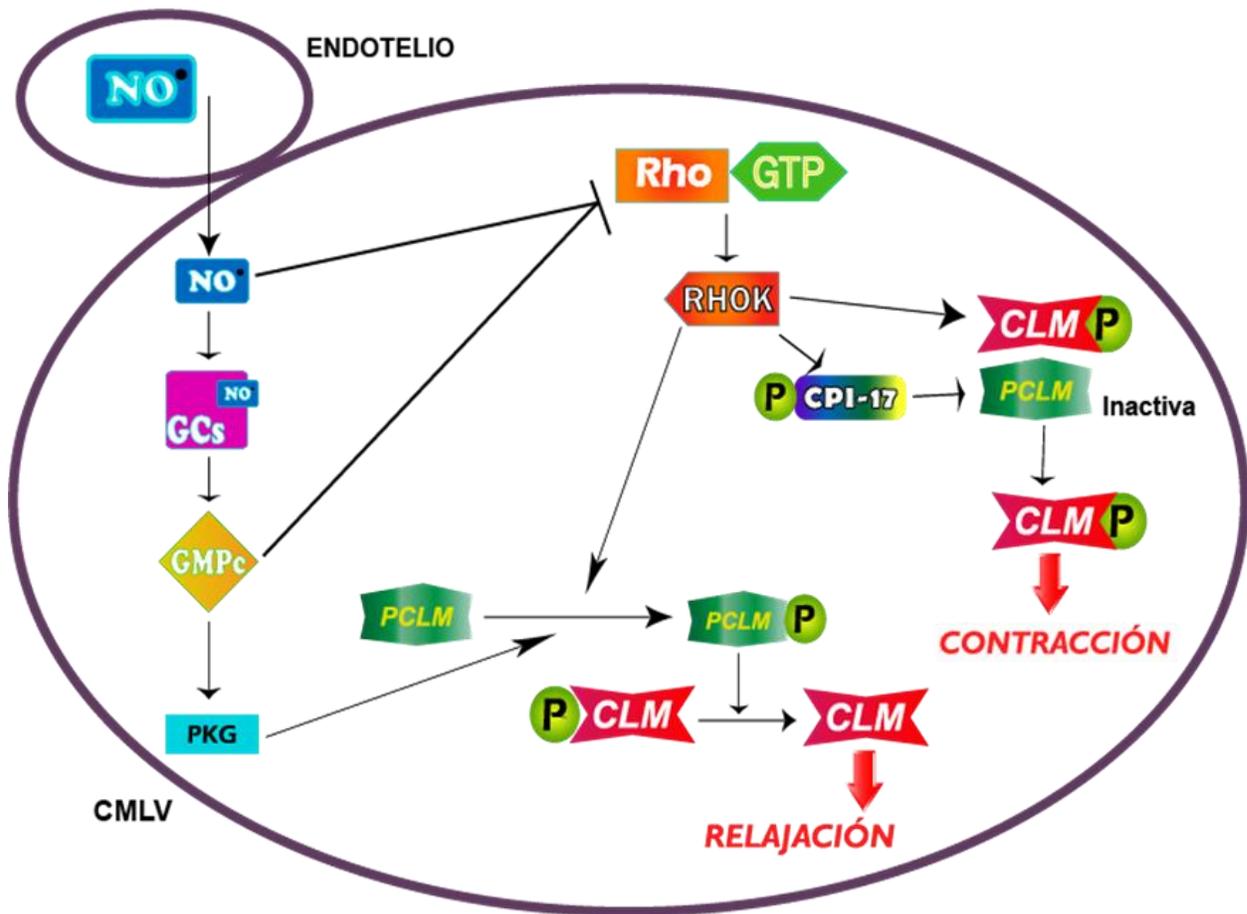


Figura 7. Interacción entre el NO y Rho. Una vez que el NO es producido en el endotelio difunde hacia las células del músculo liso adyacentes donde activa a la GC lo cual aumenta las concentraciones de GMPC y este a su vez activa a la PKG que fosforila a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (PCLM) y esta desfosforila a la cadena ligera de miosina (CLM) lo cual lleva a una relajación. Por otro lado, la activación de la proteína Rho le permite interactuar con su efector Rho cinasa (RHOK), esto puede llevar a la relajación por el mismo mecanismo del NO o a la contracción al activar al CPI-17, el cual es un inhibidor de la PCLM, que le impide desfosforilar a la CLM manteniéndola contraída. Modificado de Martín-Garrido, 2007; Sandu et al., 2001.

5.1 Hipertensión por deficiencia de NO

La hipertensión arterial representa un grave problema de salud pública. A pesar de que existe un gran número de publicaciones relacionadas con el tema, la etiología de la misma sigue siendo desconocida. Hay una diversidad de modelos experimentales de hipertensión que se han empleado para el escrutinio de esta patología. Existen modelos de hipertensión primaria como ratas espontáneamente hipertensas (SHR); modelos de hipertensión secundaria como ratas sensibles a la dieta de sal (DOCA), hipertensión renovascular (one, two-clip one kidney), hipertensión por infusión de angiotensina II (bomba osmótica), hipertensión por inhibición de la síntesis de óxido nítrico por L-NAME (El N ω - Nitro-L-Arginina metil éster) que es un análogo sintético de la L-Arginina y actúa como un inhibidor no selectivo de las 4 isoformas de la NOS (Zats et al., 1998).

La administración a largo plazo de inhibidores de las NOS, por ejemplo el L-NAME, por administración oral o intravenosa ha demostrado producir una hipertensión sostenida y reversible en diferentes especies como ratón, rata, conejos y perros (Mattson et al., 2007).

La característica común de todos ellos es que existe un desequilibrio en las sustancias vasoactivas, principalmente una disminución del NO, por lo que resulta importante estudiar los mecanismos fisiopatológicos de este último tipo de hipertensión mencionado.

II. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas Rho participan en procesos como la contracción vascular y se sabe que regulan negativamente a la NOS. El NO es el principal encargado de regular el flujo sanguíneo en la placenta y está disminuido durante la HA. Debido a que no se conoce la asociación entre el NO y las proteínas Rho en trastornos hipertensivos en el embarazo, es de nuestro interés determinar si con la inhibición de las NOS durante el embarazo los niveles de las proteínas Rho se encuentran alterados.

III. HIPOTESIS

La inhibición de la síntesis del NO por el L-NAME en la placenta modula la expresión de las proteínas Rho y las NOS.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general: Analizar los niveles placentarios de las proteínas Rho y las NOS en el embarazo con deficiencia de óxido nítrico.

Objetivos particulares:

- ✓ Determinar el efecto de la deficiencia de óxido nítrico sobre los niveles de las proteínas RhoA, RhoB y Rac en placentas de ratas deficientes de NO.

- ✓ Determinar el efecto de la deficiencia de óxido nítrico sobre los niveles de las enzimas eNOS, iNOS y nNOS en placentas de ratas deficientes de NO

V. METODOLOGÍA

5.1 Protocolo experimental

Se utilizaron ratas hembra Wistar preñadas de 250 a 300 g de peso y se dividieron en dos grupos: el grupo control y el grupo de hipertensas. Todos los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética Institucional y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Secretaria de Agricultura, México). Durante el tratamiento a los animales de todos los grupos se les midió la ingesta de agua y el peso corporal para ajustar la dosis de los fármacos administrados.

5.2 Inducción de la síntesis de ON

Para la inhibición de la síntesis de NO se administró una dosis de 50 mg/Kg/día (Lu et al., 2007) del fármaco L-NAME (clorhidrato de N^ω- Nitro-L-Arginina metil éster: un inhibidor no selectivo de las NOS; Sigma) (Zatz et al., 1998) disuelto en el agua de beber, mientras que al grupo control se le administró solamente agua ad libitum.

5.3 Reactivos

Los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich: Solución de KCl y sales de la solución Krebs - Henseleit (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, EDTA, glucosa). Todos los reactivos se disolvieron en agua destilada

5.4 Extracción del tejido

Las ratas se sometieron a anestesia profunda con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), después se procedió a aislar y exponer la placenta de los animales de todos los grupos experimentales.

Se realizó una incisión abdominal, incidiendo plano por plano, hasta exponer el útero y extraer los fetos de los cuales se separó la placenta y el cordón para las distintas determinaciones, tanto los de los niveles de las proteínas RhoA, RhoB, Rac como de las enzimas eNOS, iNOS y nNOS mediante la técnica de Western blot de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (1970) y Towin et al. (1979).

5.5 Análisis por Western blot de las proteínas Rho y las enzimas NOS

a) Homogenización

La placenta se dividió en cordón y cotiledón para posteriormente hacer un homogenado total de cada uno aplicando 1 ml de buffer de lisis (Trizma-Base 2.4 gr, NaCl 8.7 gr, CaCl₂ 0.7 gr, MgCl₂ 0.1 gr, Triton X-100 10 ml, desoxicolato de sodio 5 gr y SDS 1gr en 1 lt de agua destilada) y 100 µl de MINICOMPLETE (mezcla de inhibidores de proteasas).

Posteriormente, se realizó una centrifugación a 5 000 rpm por 5 min a 4°C para separar los componentes más pesados del sobrenadante, este último se separó y se congeló a -81°C hasta ser utilizado.

b) Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero de bovino (BSA). Para ello se emplearon volúmenes correspondientes a 10, 20, 30, 40, 50, 60,

70 y 80 μg de proteína y se agregaron los reactivos empleados en el método de Lowry (Lowry et al., 1951) incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se tomó la lectura de absorbencia a 660nm empleando un espectrofotómetro (Perkin Elemer Lambda 18 UV/visible). Las muestras de cordón y cotiledón se sometieron al mismo tratamiento. La curva de calibración se hizo en Excel versión 2007 (Microsoft Office) y por interpolación se estimó la concentración de proteínas en las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

c) Electroforesis

Al volumen de las muestras, determinado por la curva de calibración, se les agregó 10% de buffer de carga Laemlli (TRIS HCl TRIS 0.125M pH 6.8, SDS 0.35 M, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.03 mM). Las muestras se hirvieron 3 minutos, a 100°C para desnaturalizar las proteínas.

Se prepararon geles SDS-PAGE al 10 y 13%, cargando 50 μg de proteína, de cada una de las muestras en pozos diferentes, en el pozo número uno se cargaron 5 μl de marcador de peso molecular (AMRESCO® protein marker Wide range). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas aproximadamente a 100 V, por medio de la aplicación de un campo eléctrico para separar las proteínas en función de su masa molecular.

d) Transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a la membrana de PVDF (fluoruro de polivinildieno; Bio-Rad), utilizando buffer de transferencia (Trizma Base 0.6 gr, glicina 2.8 gr, metanol 20 ml al 10% en 180 ml de agua destilada). La electrotransferencia se hizo en condición semiseca empleando un TRANS-BLOT (Bio-Rad), durante 1 hora a 18 V.

Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron incubadas durante 1 hora, con agitación constante en TBS-tween con leche baja en grasas para el bloqueo de los sitios inespecíficos (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, tween 20 0.05% y leche 5%), a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos específicos contra las proteínas Rho A, Rho B y Rac y las NOS isoformas e, i y n y α -actina. La dilución que se usó fue de 1:1000 para los anticuerpos primarios en TBST-5% leche.

Posteriormente la membrana se lavó cinco veces: dos con TBS-tween 0.15M, una con TBS-tween 1M y dos más con TBS-tween 0.15M, para después incubar a temperatura ambiente por dos horas con el segundo anticuerpo anti-IgG (acoplado a la enzima peroxidasa; Zymed®) en TBS-tween leche, a una dilución de 1:2000. Pasando este tiempo la membrana se lavó tres veces con TBS-tween 0.15M, en agitación constante a temperatura ambiente durante cinco minutos en cada lavado.

La inmunodetección de las proteínas Rho y la α -actina se realizó en la misma membrana puesto que el que sus pesos moleculares sean muy diferentes lo permite.

e) Reacción Quimioluminiscente

El revelado de las placas se realizó incubando la membrana con luminol, un sustrato de fluorescencia (Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante del casete de radiografía, se sobrepuso la membrana de PVDF, posteriormente se expuso a una placa fotográfica para captar la luz emitida por la reacción y el tiempo de exposición dependió de la intensidad de la banda, posteriormente la placa fotográfica se sometió a un revelado.

Las placas se digitalizaron con ayuda de un escáner (HP Scanjet G4050). La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ Software) y se normalizaron con la densidad de la α -actina (proteína control interno).

5.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar, utilizando el programa Sigma Plot 8.02 para la construcción de las gráficas. En todos los casos se aplicó ANOVA de 2 vías seguido de la prueba de tukey y se tomó como nivel de significancia estadística $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 Determinación de los niveles de las enzimas eNOS, iNOS y nNOS

Para determinar la expresión de las enzimas eNOS, iNOS y nNOS en el tejido placentario de ratas deficientes de óxido nítrico, el tejido de animales de los 2 grupos experimentales se dividió en cotiledón y cordón. Se realizó una electroforesis para separar las enzimas por masa molecular, después se emplearon anticuerpos específicos contra cada una de las enzimas y se llevó a cabo una reacción quimioluminiscente (técnica de western blot).

Con los datos obtenidos del western blot se realizó un análisis densitométrico, dividiendo los pixeles de la banda correspondiente de la proteína de interés entre el número de pixeles correspondiente a la banda de la proteína usada como control de carga.

En el panel A de la figura 8 observamos las placas representativas de los experimentos con una $n = 4$. Las bandas obtenidas fueron para la enzima eNOS de 140 kDa y para la α -actina fue de 43 kDa, que fue la proteína de control de carga.

En el panel B observamos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico, donde podemos apreciar que en el tejido de cordón no existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión de la eNOS entre los animales control y animales tratados, sin embargo, se observa una tendencia a disminuir en los animales tratados. En cambio en el cotiledón, el nivel de la sintasa endotelial está disminuido, de manera estadísticamente significativa, en animales tratados con L-NAME con respecto a su control.

α La inmunodetección de la enzima iNOS se muestra en la figura 9. En el panel A se muestran las bandas que corresponden a la enzima con un peso aproximado de 130 kDa y las bandas representativas del control de carga (-actina) con un peso de 43 kDa. En el panel B observamos la gráfica que se obtuvo del análisis densitométrico, donde observamos una disminución estadísticamente significativa de la iNOS en ambos tejidos de los animales tratados con L-NAME con respecto al control.

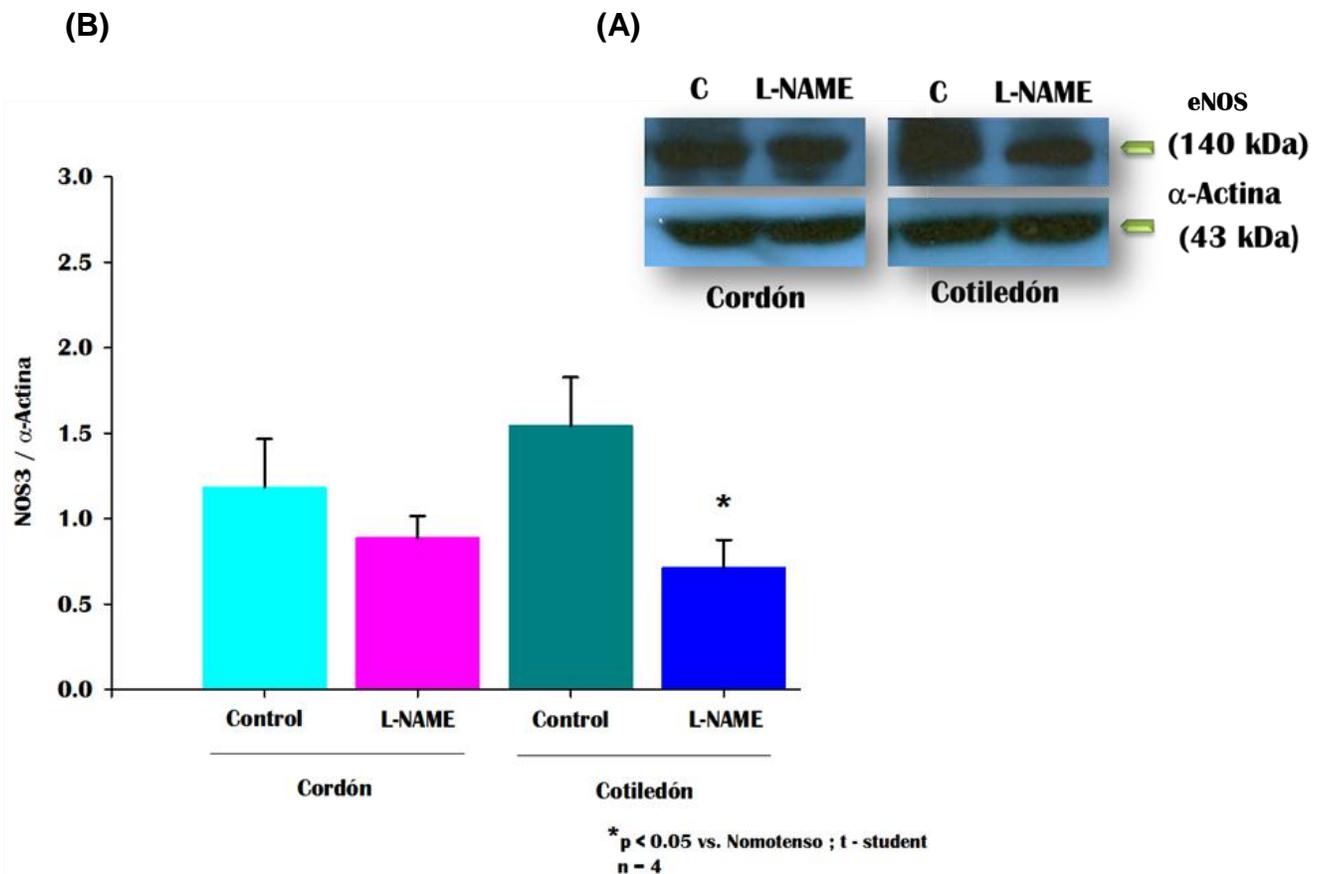


Figura 8. . Inmunodetección de la enzima eNOS en muestras de cordón y cotiledón de ratas control y ratas tratadas con L-NAME. En el panel A observamos la inmunodetección de la enzima eNOS en cordón y cotiledón de animales control y tratados con L-NAME y la banda correspondiente a la proteína usada como control de carga, la α -actina. En el panel B observamos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos individuales.

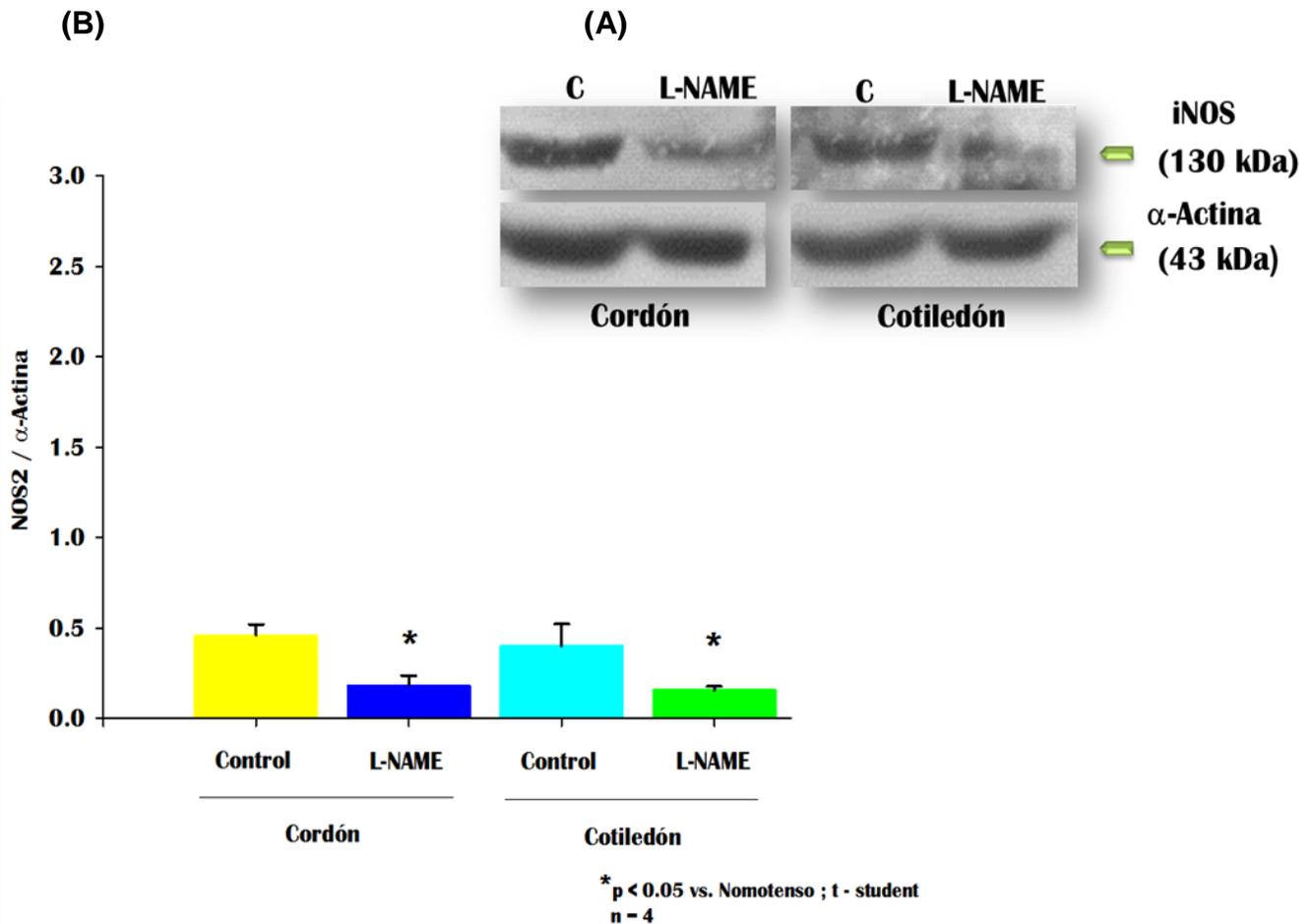


Figura 9. Inmunodetección de la enzima iNOS en muestras de cordón y cotiledón de ratas control y ratas tratadas con L-NAME. En el panel A observamos la inmunodetección de la enzima iNOS en cordón y cotiledón de animales control y tratados con L-NAME y la banda correspondiente a la proteína usada como control de carga, la α -actina. En el panel B observamos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos individuales

En lo que respecta a los ensayos para determinar los niveles de la enzima nNOS, la inmunodetección se llevó a cabo, sin embargo, no fue detectada. Probablemente debido a que como se mencionó en los antecedentes, la placenta es un órgano no innervado por lo tanto esta isoforma no está presente, puesto que es una isoforma que predomina en el tejido nervioso. En la figura 10 podemos observar la detección de la banda de la proteína

de control de carga, sin embargo, no se obtuvieron bandas donde se esperaba encontrar la banda correspondiente a la isoforma nNOS.

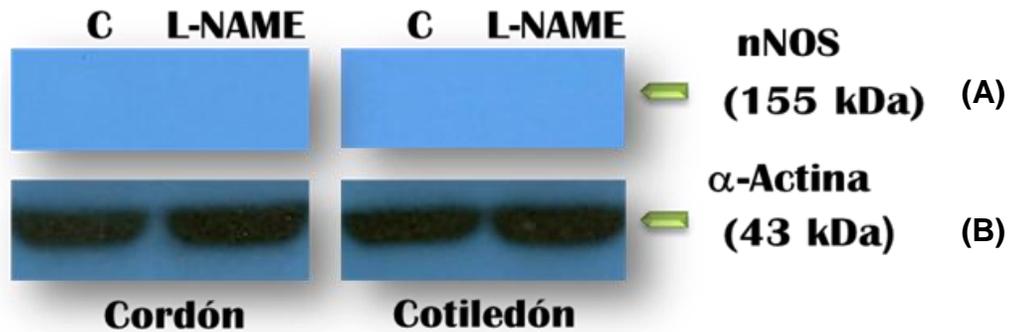


Figura 10. Inmunodetección de nNOS. En el panel A observamos la placa donde esperábamos encontrar la banda correspondiente a nNOS sin resultado alguno. En el panel B se encuentra la banda de la proteína de control de carga α -actina con un peso de alrededor de 43 kDa. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos individuales.

6.2 Determinación de los niveles de las proteínas RhoA, RhoB y Rac

Para determinar la expresión de las enzimas Rho A, Rho B y Rac en el tejido placentario de ratas deficientes de óxido nítrico, el tejido de los animales de ambos grupos experimentales se dividió en cotiledón y cordón. Se realizó una electroforesis para separar las enzimas por masa molecular, después se emplearon anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas y se llevó a cabo una reacción quimioluminiscente (técnica de western blot).

Obteniendo la relación entre los niveles de los pixeles de la banda correspondiente de la proteína de interés entre el número de pixeles correspondiente a la banda de la proteína usada como control de carga, se realizó un análisis densitométrico.

En la parte superior de la figura 11 observamos las placas representativas de experimentos individuales con una $n = 4$. En el panel A observamos la banda correspondiente a RhoA con un peso aproximado de 24 kDa y la banda correspondiente a la α -actina con un peso aproximado de 43 kDa. En el panel B vemos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico, donde observamos que los niveles de la proteína aumentan de manera estadísticamente significativa en el cordón de animales tratados con L-NAME con respecto a su control. En los resultados correspondientes al cotiledón vemos que no hay diferencia estadísticamente significativa, pero si se observa una tendencia a imitar el patrón observado en el cordón. También podemos observar que los niveles de la proteína son aproximadamente el doble el doble en el cordón respecto a los del cotiledón, lo cual no se observaba en las NOS. Lo anterior podría deberse a las distintas necesidades del tejido, ya que los vasos del cordón son de conductancia y por lo tanto de mayor calibre y los vasos del cotiledón son de resistencia y de menor calibre.

La inmunodetección de la proteína RhoB se muestra en la figura 12. En el panel A se muestran las bandas que corresponden a la proteína Rho B con un peso aproximado de 25 kDa y las bandas representativas del control de carga α -actina con un peso de 43 kDa. En el panel B observamos la gráfica que se obtuvo del análisis densitométrico, donde observamos más cantidad de la proteína en el cordón respecto al cotiledón (aproximadamente el doble), sin presentarse diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con L-NAME respecto a sus controles en cada uno de los tejidos.

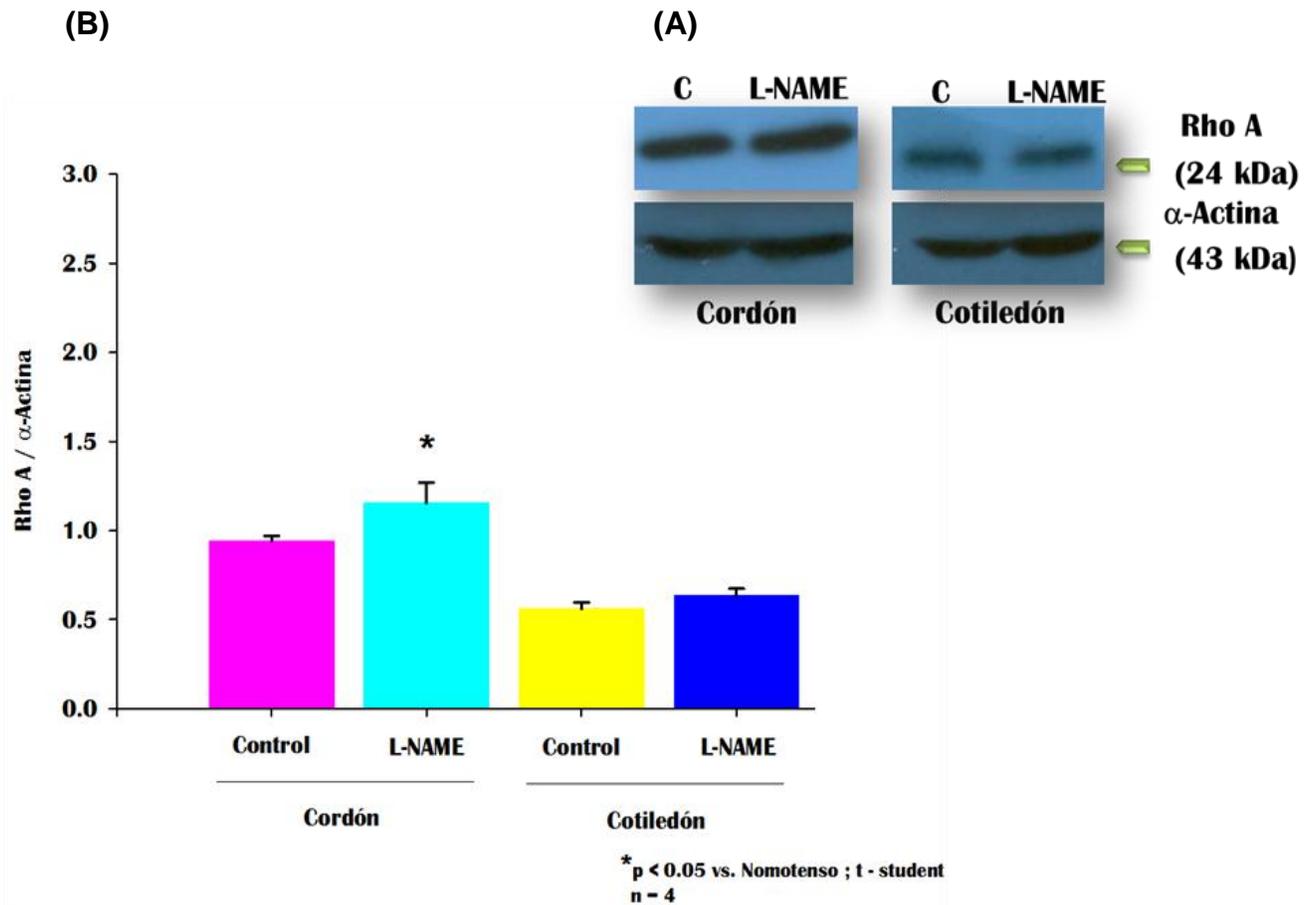


Figura 11. Inmunodetección de la proteína Rho A en muestras de cordón y cotiledón de ratas control y ratas tratadas con L-NAME. En el panel A observamos la inmunodetección de la proteína Rho A en cordón y cotiledón de animales control y tratados con L-NAME y la banda correspondiente a la proteína usada como control de carga, la α -actina. En el panel B observamos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos individuales.

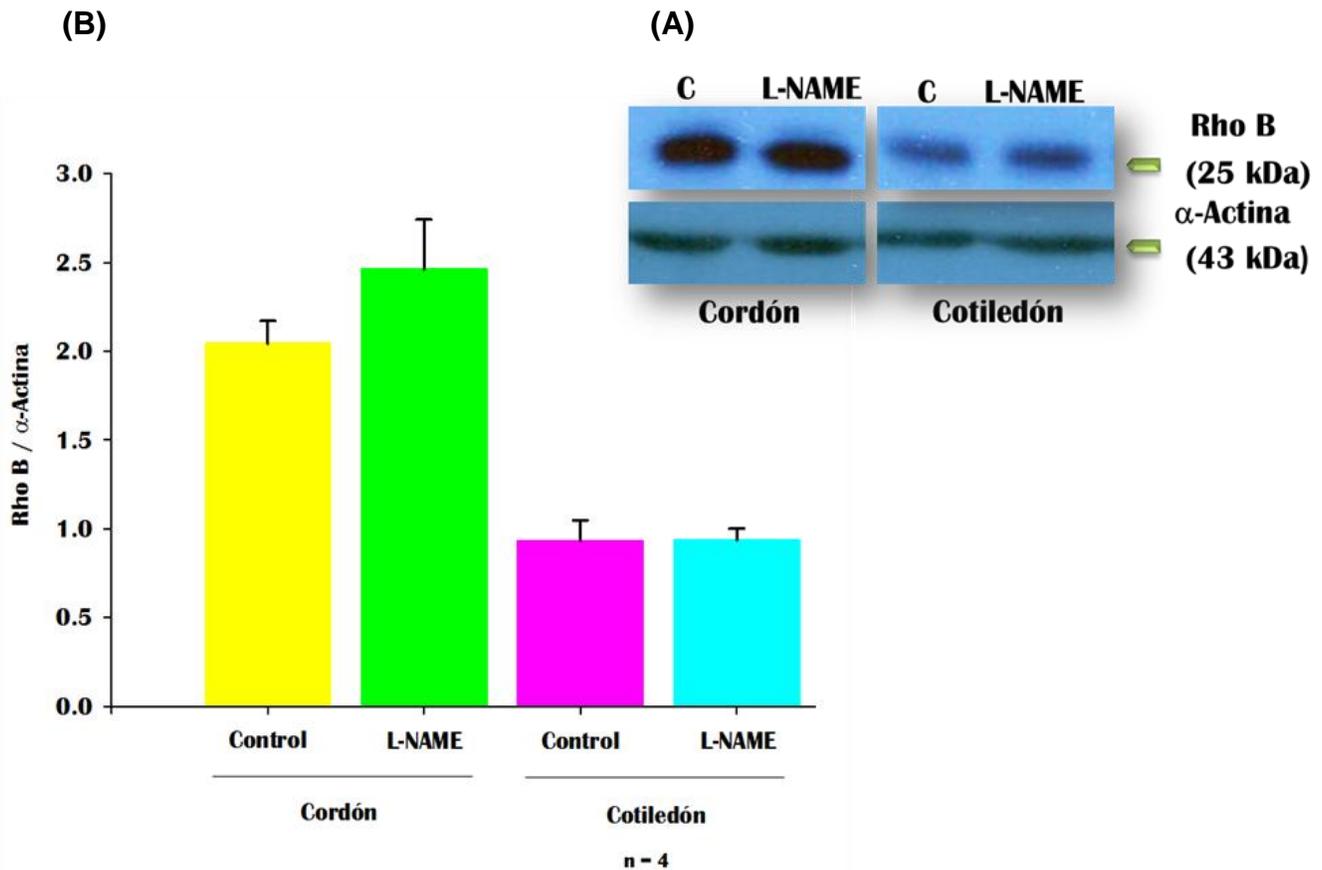


Figura 12. Inmunodetección de la proteína Rho B en muestras de cordón y cotiledón de ratas control y ratas tratadas con L-NAME. En el panel A observamos la inmunodetección de la proteína Rho B en cordón y cotiledón de animales control y tratados con L-NAME y la banda correspondiente a la proteína usada como control de carga, la α -actina. En el panel B observamos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos individuales.

Los resultados correspondientes a la inmunodetección de la proteína Rac se muestra en la figura 13, en el panel A observamos las bandas correspondientes a la proteína con un peso de 21 kDa, aproximadamente, y las bandas de la proteína de control α -actina con un peso de 43 kDa y en el panel B tenemos la gráfica del análisis densitométrico donde observamos que en el cordón los niveles de Rac son menores en los animales tratados con L-NAME respecto a los controles. Aun cuando en el cotiledón no existen

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, podemos observar la misma tendencia. De igual manera se observa que hay diferencia en los niveles de Rac dependiente del tejido.

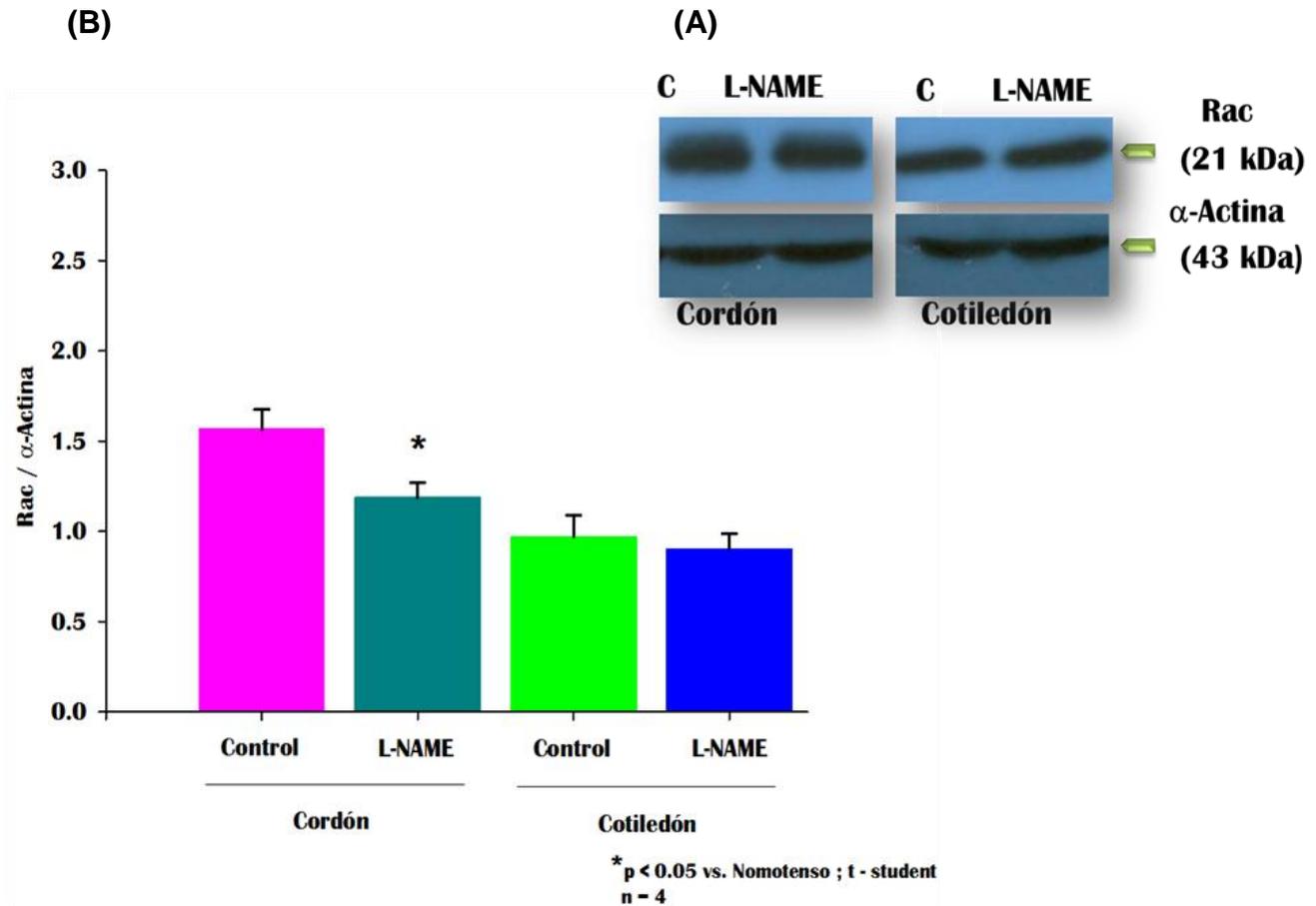


Figura 13. Inmunodetección de la proteína Rac en muestras de cordón y cotiledón de ratas control y ratas tratadas con L-NAME. En el panel A observamos la inmunodetección de la proteína Rac en cordón y cotiledón de animales control y tratados con L-NAME y la banda correspondiente a la proteína usada como control de carga, la α -actina. En el panel B observamos la gráfica correspondiente al análisis densitométrico. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos individuales.

VII. DISCUSIÓN

Los trastornos hipertensivos asociados al embarazo, particularmente la preeclampsia (PE), son la principal causa de muerte materno-fetal en el mundo (OMS, 2007). En nuestro país, del 2005 al 2008 se reportaron 1226 muertes a causa de la preeclampsia/eclampsia, de las cuales 148 fueron en Michoacán (SINAIS). Actualmente se desconoce el origen de esta enfermedad y aunque existen numerosas teorías sobre las causas, ninguna ha logrado dilucidar los mecanismos por los cuales se desarrolla esta patología, sin embargo la mayoría de las teorías concuerdan con el hecho de que la placenta juega un papel importante en la etiología de la misma (Dinesh, 2005).

En el presente trabajo se examinó la presencia de las óxido nítrico sintasas (NOS) y de las proteínas Rho A, Rho B y Rac en placentas de ratas deficientes de óxido nítrico.

El NO es el principal agente vasoactivo con efectos relajantes del organismo, aunado a esto, se sabe que el flujo sanguíneo de la placenta no está controlado por el sistema nervioso puesto que la placenta es un órgano no inervado (Schonfelder et al., 1996), por lo que él NO juega un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo placentario.

Durante nuestro trabajo empleamos un modelo de hipertensión que se basa en la inhibición de la síntesis de NO a través del uso de un inhibidor no selectivo de las NOS, el L-NAME (Zatz et al., 1998). Este modelo está ampliamente validado y se cuentan con reportes sobre el uso de este agente y la dosis empleada en el presente trabajo (50 mg/Kg) y la producción de hipertensión arterial en el embarazo en ratas (Lu et al., 2007).

Además, existen reportes donde se describe la relación entre la expresión de las NOS y la actividad de las proteínas G monoméricas, específicamente Rho A. Por un lado, Laufs y Liao en 1998, utilizan células humanas endoteliales a las cuales les administran, primero un activador de la proteína Rho A, el CNF (factor de necrosis celular) que mantiene a la proteína en su estado activo al impedir la hidrólisis de GTP y observan que disminuyen los niveles de expresión del RNAm de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Posteriormente administran estatinas (inhibidores de la HMG CoA-reductasa, enzima de la ruta de síntesis del mevalonato) las cuales inhiben indirectamente la actividad de Rho por no permitir la geranilgeranilización necesaria para que las proteínas Rho se trasloquen a la membrana y puedan ser activadas. Al administrar estos inhibidores observan una sobre expresión del RNAm de la eNOS, por lo tanto concluyen que la actividad de Rho A inhibe la expresión de la eNOS.

Posteriormente, Muniyappa y colaboradores (2000), llevan a cabo un experimento similar sobre otra de las isoformas de la NOS, la isoforma inducible (iNOS), ellos emplean homogenados de células de músculo liso vascular de aorta de rata, a los cuales les agregan interleucina 1B (IL-1B) la cual promueve la expresión de la iNOS por estimular una respuesta inmunológica en el organismo. Los autores observan que en presencia de la IL-1B los niveles de la enzima aumentan considerablemente, mientras que en presencia de otro inhibidor de la actividad de Rho A, como es la exoenzima C3 tranferasa de *Clostridium botulinum*, que inactiva a la proteína por ADP-ribosilación, observan que los niveles de la iNOS aumentan considerablemente respecto al control, por lo tanto concluyen también que la actividad de Rho A inhibe la expresión de la NOS siendo en este caso la isoforma inducible.

Siguiendo la misma línea de investigación Seasholtz y Brown (2004) reportan que la actividad de la eNOS puede proteger contra los cambios contráctiles asociados a la actividad de Rho A en la hipertensión y proponen un modelo donde al encontrarse activa la proteína Rho A, se inhibe a la eNOS por lo tanto los niveles de GMPc disminuyen y ocurre lo mismo con el NO lo cual lleva a la hipertensión, al mismo tiempo proponen que existe una retroalimentación negativa y que cuando la eNOS se encuentra activa esto inhibe la actividad de la Rho A.

En nuestros resultados, encontramos que en el cotiledón de rata tratada con L-NAME los niveles de expresión de la eNOS estaban disminuidos (figura 8), lo cual fue un resultado inesperado ya que al estar inhibiendo la actividad de la NOS nosotros esperábamos ver una expresión aumentada de la enzima a manera de mecanismo compensatorio. Al tratar de relacionar esta disminución en la expresión de la eNOS con la expresión de Rho A en el mismo tipo de tejido, nos dimos cuenta que los niveles de Rho A no presentaba diferencia estadísticamente significativa (figura 11) y que aunque presentaba una tendencia a aumentar no era suficiente para poder atribuir nuestro resultado a lo ya reportado en la literatura. Todo esto nos llevó a pensar en otra posible explicación a esta disminución de la eNOS, planteamos como una opción que el uso del L-NAME no solo disminuye la síntesis del NO, sino que también afecta, por un mecanismo no descrito, la expresión de la propia NOS. Sin embargo para poder probar esta teoría necesitaríamos llevar a cabo otro tipo de ensayos, una opción podría ser células transfectadas que sobre expresen las NOS y la aplicación del L-NAME a dichas células.

Siguiendo con el análisis de resultados de la expresión de la eNOS (figura 8), en lo que respecta a cordón de ratas tratadas con el inhibidor de las NOS, no se observaron cambios en el patrón de expresión respecto al control.

Aunque si se observaba la misma tendencia del cotiledón, la diferencia no era estadísticamente significativa.

Respecto a la relación entre Rho y NOS, en lo que concierne a la determinación de la expresión de la iNOS (figura 9), observamos que los niveles de la enzima tanto en cordón como en cotiledón de ratas tratadas con L-NAME, estaban sensiblemente disminuidos respecto a sus controles. Al igual que en nuestros resultados de eNOS, llevamos a cabo la comparación respecto a los niveles de expresión de Rho A (figura 11). En el cordón de ratas tratadas observamos que por un lado los niveles de iNOS disminuyeron y por el otro los niveles de Rho A aumentaron. Esto concuerda con los antecedentes presentados sobre la regulación negativa que existe entre ambas (Seasholtz y Brown, 2004) y muy probablemente lo que observamos en este resultado puede ser producto de dicha regulación. Sin embargo, en lo observado en el cotiledón no podemos concluir de la misma manera, puesto que los niveles de Rho A no presentan diferencia estadísticamente significativa, mientras que los niveles de iNOS en este tejido mostraron una diferencia clara y es que en ratas tratadas se observa perfectamente la disminución de la enzima. Este fenómeno es igual al observado para la eNOS en cotiledón, que a pesar de no haber un aumento en la expresión de Rho A, si hay una disminución en la iNOS, por lo cual una vez más consideramos la posibilidad de que el L-NAME, usado para inhibir la síntesis de NO, no solo tenga dicho efecto sino que también está alterando de alguna manera la expresión de la NOS. Sin embargo, como ya se mencionó antes para poder probar esta hipótesis son necesarios otro tipo de experimentos.

Como se mencionó al principio de esta discusión, sabemos que la placenta es un tejido no innervado (Schonfelder et al., 1996), esto se reportó al trabajar con placentas humanas en las cuales no fue posible detectar la presencia

de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), nuestros resultados respecto a esta isoforma concuerdan con lo reportado en la literatura y es que a pesar de que los ensayos previos fueron hechos en humanos nosotros encontramos que es una característica que comparte nuestro modelo.

En los resultados obtenidos para Rho B (figura 12) podemos ver que esta proteína tiene una tendencia a aumentar en ambos tejidos de animales tratados, pero no hay una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los dos. Existen reportes en la literatura de la presencia de esta proteína en miometrio, así como de niveles significativamente elevados de Rho B en placenta humana (Lartey et al., 2006), mas no se especifica cuál es su función en estos tejidos. Por nuestros resultados nosotros podríamos pensar que sea cual sea su función, es importante la regulación que está llevando a cabo en el tejido placentario puesto que es la proteína que mayormente se expresó de las tres. Para poder determinar dicha función necesitaríamos llevar a cabo experimentos haciendo uso de los activadores e inhibidores de Rho B, lo cual queda como una perspectiva.

Otra proteína que se considera un mediador central de la fisiopatología cardiovascular, la reactividad vascular y la regulación de la presión sanguínea, es Rac (Nowicki et al., 2001). Aun así, existen pocos reportes de la presencia de Rac en tejido placentario. En nuestros resultados (figura 13) se observó una disminución estadísticamente significativa en cordón de ratas tratadas con L-NAME comparadas con sus controles. En cotiledón no hubo dicha diferencia pero si se observa una tendencia similar. Lo cual concuerda con lo reportado en el 2000 por Hannke-Lohmann et al., donde ellos observan una disminución de Rac en placentas de mujeres con PE. Recordemos que Rac juega un papel importante en el ensamblaje del complejo de la NADPH oxidasa, la cual produce especies reactivas de oxígeno que son un factor importante en el desarrollo de la disfunción

endotelial observada durante la PE (Lee et al., 2003). Por lo tanto la disminución de esta proteína podría deberse probablemente a un mecanismo compensatorio para reducir el daño endotelial que está llevando a la producción disminuida de NO y por lo tanto a la PE.

Finalmente, haciendo una comparación de los patrones de expresión dependientes del tejido analizado, se observó que las NOS presentan el mismo patrón en ambos tejidos donde la eNOS se expresa en mayor medida que la iNOS y la nNOS no se expresa en ninguno de los dos. Esto no ocurre con las proteínas Rho y Rac, para estas en el caso del cordón la proteína que más abunda es Rho B, seguida de Rac y la que se expresa en menor medida es Rho A. En el caso del cotiledón Rac y Rho B parecen tener un patrón de expresión muy similar mientras que Rho A se expresa en menor medida. Esta comparación nos lleva a pensar que la expresión de estas proteínas está determinada por el tejido donde se encuentran. Los vasos que componen a los cotiledones son vasos de resistencia y de un menor calibre que los que componen al cordón que son vasos de conductancia. Con base en esto sabemos que los requerimientos de regulación del flujo sanguíneo son diferentes. Así, un estímulo que llevara a la contracción en un vaso de menor calibre tendría más repercusiones que en uno de mayor calibre, sobre el flujo sanguíneo. Sin embargo este patrón no se observa en las NOS y esto puede deberse a que la función de síntesis de NO es igual de importante en ambos tipos de vasos.

VIII. CONCLUSIÓN

La inhibición de las NOS por el L-NAME no solo disminuye la síntesis del NO sino también disminuye la expresión de las NOS y aumenta la expresión de las proteínas Rho y disminuye la expresión de la proteína Rac, de manera dependiente de tejido.

IX. PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar los niveles de las proteínas Rho y Rac en presencia de sus activadores e inhibidores en placentas de ratas deficientes de óxido nítrico.
- ✓ Determinar los niveles de las NOS en presencia de los activadores de Rho y Rac en placentas de ratas deficientes de óxido nítrico.
- ✓ Analizar el papel fisiológico tanto de las NOS como de Rho y Rac en placentas de rata aisladas y perfundidas.

IX. LITERATURA CITADA

Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpaci R, Dilek S, 2004. Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med.* 204: 195-202.

Auger K, Beauséjour A, Brochu M, St-Louis J, 2004. Increased Na⁺ intake during gestation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278: 1848-1856.

Baergen R, 2005. *Manual of Benirschke and Kauffman's Pathology of the Human Placenta.* Ed. Springer.

Blackmore P, Bocckino S, Waynick L, Exton J, 1985. Role of guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. *J Biol Chem.* 260: 18206-216.

Brosens I, Robertson W, Dixon H, 1972. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1: 177-191.

Bustelo X, Sauzeau V, Berenjeno I, 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays.* 29: 356-370.

Centro Nacional de Equidad y Género y Salud Reproductiva, 2007. Secretaría de Salud. *Prevención, diagnóstico y manejo de la Preeclampsia/Eclampsia.* Cuarta edición.

Chabanian A, Bakris G, Black H, Cushman W, Green L, Izzo J Jr, Jones D, Materson B, Oparil S, Wright J, Rocella E, 2003. Seven report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *Hypertension* 42: 1206-52.

Chakaborty C, Gleeson L, McKinnon T, Lala P, 2002. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol.* 80: 116-124.

Chou T, Yen H, Li C, Ding Y, 1998. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31: 643-48.

Conway A, James A, O'Kane E, Rakhit S, Morris B, 2004. Regulation of myosin light chain phosphorylation by RhoB in neuronal cells. *Exp Cell Res.* 300: 35-42.

Dinesh M, 2005. Role of the rennin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288: 614-25.

Cross J, 2005. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice-review. *Natur.* 26: 3-9.

Estrada-Altamirano A, Hernández-Pacheco J, Cisneros-Castolo M, y García-Benitez C, 2002. Experiencia en la unidad de cuidados intensivos obstétricos del Instituto Nacional de Perinatología, 1993-1998. *Perinatol Reprod Hum.* 16: 88-95.

Etienne-Manneville S, Hall A, 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-35.

Field A, Sexton D, O'Reilly M, Smith T, Morrison J, 2006. RhoA/RHO Kinase: human umbilical artery mRNA expression in normal and preeclamptic pregnancies and functional role in isoprostane-induced vasoconstriction. *Reproduction* 132: 169-176.

Gant N, Worley R, 1982. HIPERTENSIÓN EN EL EMBARAZO Conceptos y tratamiento. Primera edición. Appleton-Century-Crofts. Capítulo 1: 1-9.

Ghafourifar P, Sen C, 2007. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Frontiers in bioscience* 12: 1072-87.

Griendling K, Sorescu D, Ushio M, 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86: 494-501.

Hannke-Lohman A, Pildner S, Dehne K, Benard V, Kolben M, Schmitt M, Lengyel E, 2000. Downregulation of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the placentas of women with preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 96: 582-87.

Kaziro Y, Itoh H, Kozana T, Nakafuku M, Satoh T, 1991. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem.* 60: 349-400.

Khalil R, Crews J, Novak J, Kassab S, Granger J, 1998. Enhanced vascular Reactivity During Inhibition of Nitric Oxide Synthesis in pregnant rats. *Hypertension* 31: 1065-69.

Laemmli U, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.

Lain K, y Roberts J, 2002. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA.* 287: 3183-86.

Lartey J, Smith M, Pawade J, Strachan B, Mellor H, López A, 2007. Up-regulation of myometrial RHO effector proteins (PKN1 and DIAPH1) and CPI-17 (PPP1R14A) phosphorylation in human pregnancy is associated with increased GTP-RhoA in spontaneous preterm labor. *Biol Repr.* 76: 971-982.

Laufs U, Liao J, 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPases. *J Biol Chem.* 273(37): 24226-271.

Lermoli R, 2004. Bases fisiológicas de la práctica médica. Editorial Médica Panamericana. 13ª edición. Capítulo 4: 53-72.

Lu Y, Zhang H, Gokina N, Mandala M, Sato O, Ikebe M, Osol G, Fisher S, 2007. Uterine artery myosin phosphatase isoform switching and increased sensitivity to SNP in a rat L-NAME model of hypertension pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 294: C562-571.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275.

Martín-Garrido A. El peróxido de hidrogeno como mediador en el proceso de contracción-relajación estudios in vivo e in vitro. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, España. 2007.

Mattson L, Cowley W, 2007. Nitric Oxide and hypertension. Ed. Hypertension and hormone mechanisms. *Contemporary endocrinology*. 225-244.

Moncada S, Palmer R, Higgs E, 1998. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 38:1709-15.

Muniyappa R, Xu R, Ram J, Sowers J, 2000. Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278: H1762-68.

Nowicki P, Flavahan S, Hassanain H, Mitra S, Holland S, Goldschmidt-Clermont P, Flavahan N, 2001. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res*. 89: 114-116.

Olaiz G, Rojas R, Barquesa S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública, 2003. Disponible en www.insp.mx/ensa/ensa_tomo2.pdf

Oparil S, Weber M, 2004. HIPERTENSIÓN EL RIÑÓN de Brenner y Rector. Primera Edición. McGraw Hil. Capítulo 1: 1-21.

Ridley A, 1995. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* 5: 24-30.

Rosselli M, Kelle P, Dubey R, 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 4: 3-24.

Sandu O, Ito M, Begum N, 2001. Signal transduction in smooth muscle selected contribution: insulin utilizes NO/cGMP pathway to activate myosin phosphatase via Rho inhibition in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol.* 91: 1475-82.

SSA, 2001. http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/enf_cardiovasculares.pdf

Schonfelder G, Jonh M, Hopp H, Fuhr N, Giet M, Paul M, 1996. Expression of inducible NOS in placenta of women with gestational diabetes. *FASEB J.* 10: 777-84.

Seasholtz T, Brown J, 2004. RHO SIGNALING in vascular Diseases. *Molecular Interventions* 4: 348-57.

Takai Y, Sasaki T, Matosaki T, 2001. Small GTPases-binding proteins. *Physiol Rev.* 81: 153-208.

Tobwin H, Staehelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 4350-54.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990-94.

Werner L, 2004. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *Journal of Cell Sciences* 117: 143-53.

Wherlok M, Mellor H, 2002. The Rho GTPases family: a Racs to Wrchs story. *Journal of cell science* 115: 239-40.

Zatz R, y Baylis C, 1998. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 32: 958-964.