



# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**



## **Participación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{1D}$ en la reversibilidad de las alteraciones vasculares durante la hipertensión inducida por angiotensina II**

TESIS QUE PRESENTA

**QFB. SANDRA NOEMÍ RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

DIRECTORES DE TESIS

Doctor en Ciencias en Farmacología  
**DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ**

Doctora en Ciencias en Farmacología  
**ITZELL A. GALLARDO ORTÍZ**

Morelia, Michoacán

Febrero de 2014

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de una beca de maestría y del proyecto CIC-UMSNH 2.36.

## *Dedicatorias*

*Díos*

*Porque siempre está a mi lado vigilando mis pasos y el sendero de mi camino.*

### *A mis padres*

*Quienes con gran esfuerzo y cariño, me dieron las herramientas necesarias para caminar día a día hacia mis sueños, aún cuando estos pudieran parecer lejanos. Gracias por sus consejos que siempre han sido parte de mi impulso, por estar siempre en cada paso de mi vida. Pero sobre todo por confiar en mí y siempre brindarme el apoyo en momentos difíciles y sobre todo para poder culminar esta etapa de mi vida.*

### *A mis hermanos Juan y Tony*

*Por estar siempre conmigo por ser mis amigos en esta travesía de la vida, gracias por todos los consejos y el apoyo que me brindaron cuando lo necesite, y por siempre apoyarme en todos mis sueños que eh realizado. Quienes me han enseñado con su ejemplo a siempre salir adelante a pesar de las adversidades.*

## *Agradecimientos*

*A mis asesores, Dra. Itzell A. Gallardo Ortiz y Dr. Daniel Godínez Hernández por su contribución en mi formación.*

*A los miembros de mi Comité Tutoral, Dr. Carlos Cervantes Vega, Dr. Cristian Cortes Rojo y Dr. Homero Reyes de la Cruz por sus valiosas sugerencias que enriquecieron de manera importante este trabajo.*

*Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Itzell A. Gallardo Ortiz y Juan Javier López quienes además de transmitirme sus conocimientos, me orientaron, ayudaron en el desarrollo de este proyecto y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Agradecerles la confianza que siempre me mostraron, así como la dedicación y la atención que me han ofrecido.*

*Al Dr. Rafael Villalobos Molina por las facilidades prestadas para llevar a cabo este proyecto.*

*A la Dra. Erika Rendón-Huerta y Dra. Raquel Guerrero-Alquicira, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo en el procesamiento y la tinción de Massón de muestras de arterias aortas y caudales de ratas.*

*A mis amigos, Itzell Gallardo y Marian Martínez por haberme brindado su amistad, cariño y apoyo, así como compartir conocimientos, alegrías y tristezas. Por apoyarme siempre y hacerme más agradable mi estancia en el laboratorio.*

*A las instituciones....*

*A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme los cimientos para construir éxitos profesionales*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las facilidades para desarrollar este trabajo de tesis.*

## Índice

Abreviaturas.....	5
Índice de figuras.....	7
Resumen.....	8
1. Introducción.....	10
1.1 Hipertensión y prevalencia.....	10
1.1.1 Remodelación vascular.....	11
1.2 Reguladores de la presión arterial.....	15
1.2.1 Descripción del Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	16
1.2.1.1 Formación de Angiotensina II.....	16
1.2.1.2 Receptor AT <sub>1</sub> .....	19
1.2.1.3 Receptor AT <sub>2</sub> .....	21
1.3 Funciones y efectos del SRA.....	22
1.3.1 Incremento de la resistencia vascular periférica por la Ang II.....	23
1.3.2 Alteración de la función renal por la Ang II.....	23
1.3.3 Alteración de la estructura cardiovascular.....	24
1.4 Papel del sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación cardiovascular.....	26
1.4.1 Receptores adrenérgicos.....	26
1.4.2 Clasificación de los receptores adrenérgicos.....	27

# Maestría en Biología Experimental

---

1.4.3 Receptores $\alpha_1$ - adrenérgicos.....	29
1.5 Antecedentes.....	32
2. Justificación.....	34
3. Hipótesis.....	35
4. Objetivos.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos particulares.....	35
5. Materiales y métodos (Protocolo experimental).....	36
5.1 Animales.....	36
5.2 Infusión continua de angiotensina II.....	36
5.3. Efecto del procedimiento quirúrgico en la presión arterial y reactividad vascular en arterias aorta y caudal.....	37
5.4 Tratamiento con BMY 7378 (antagonista adrenérgico $\alpha_{1D}$ ) o losartán (antagonista $AT_1$ ) en ratas con bomba de Ang II. Registro de la presión arterial.....	37
5.5 Registro de la presión arterial sistólica en animales con bomba.....	38
5.6 Registro de la contracción isométrica en arterias aorta y caudal aisladas de ratas control y tratadas con angiotensina II.....	39
5.7 Estudio histológico de las arterias aorta y caudal de ratas control y tratadas.....	40
5.8 Análisis de resultados.....	40
6 Resultados.....	42

## Maestría en Biología Experimental

---

6.1 Efecto del procedimiento quirúrgico sobre la presión arterial sistólica.....	42
6.2 Efecto del procedimiento quirúrgico sobre la reactividad vascular.....	43
6.3 Efecto de la infusión continua de Ang II sobre la presión arterial sistólica.....	45
6.4 Efecto contráctil de los agonistas $\alpha_1$ -adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas control y ratas tratadas con Ang II y tratamientos.....	46
6.5 Evaluación de la reactividad vascular durante la contracción producida con KCl 80 mM en las arterias aortas y caudal.....	49
6.6 Análisis histológico de las arterias aorta torácica y caudal.....	51
7. Discusión.....	54
8. Resumen de resultados.....	65
9. Conclusión.....	66
10. Perspectivas.....	66
11. Bibliografía.....	67

### Abreviaturas

**$\alpha_1$  – ARs.** Receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos

**$\alpha_2$  – ARs.** Receptores  $\alpha_2$ - adrenérgicos

**$\beta$  – ARs.** Receptores  $\beta$  -adrenérgicos

**ADN.** Acido desoxirribonucleico

**Ang I.** Angiotensina I

**Ang II.** Angiotensina II

**AMPc.** Adenosín monofosfato cíclico

**AR s.** Receptores adrenérgicos

**AT<sub>1</sub>R.** Receptor AT<sub>1</sub>

**AT<sub>2</sub>R.** Receptor AT<sub>2</sub>

**CAGE.** Quimostatina sensible a la generación de Ang II (*chymostatin-sensitive Ang II-generating enzyme*).

**CE.** Células endoteliales

**DAG.** Diacilglicerol

**ECA.** Enzima convertidora de angiotensina

**ET-1.** Endotelina-1

**GDP.** Guanosina difosfato

**GPCR.** Receptores acoplados a proteínas G

**GTP.** Guanosina trifosfato

**IP<sub>3</sub>.** Inositol 1,4,5- trifosfato

**MLV.** Músculo liso vascular

**NA.** Noradrenalina

**NO.** Óxido nítrico

**PGI<sub>2</sub>** Prostaciclina

**PKC.** Proteína cinasa C

**PLC.** Fosfolipasa C

**RNA<sub>m</sub>.** Ácido ribonucleico mensajero

**SHR.** Ratas espontáneamente hipertensas

**SNS.** Sistema nervioso simpático

**SRA.** Sistema Renina Angiotensina

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura arterial.

Figura 2. Esquema del Sistema Renina Angiotensina.

Figura 3. Sistema renina angiotensina tisular.

Figura 4. Mecanismos múltiples de acoplamiento receptor-efector AT<sub>1</sub>.

Figura 5. Efectos de la angiotensina II.

Figura 6. Efecto del procedimiento quirúrgico en la presión arterial.

Figura 7. Efecto del procedimiento quirúrgico en la respuesta contráctil.

Figura 8. Curso temporal de la infusión continua con Ang II sobre la presión arterial sistólica en ratas control y en ratas con Ang II y tratamientos.

Figura 9. Efecto contráctil de los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos en arteria aorta de ratas control y tratadas.

Figura 10. Efecto contráctil de los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos en arteria caudal de ratas control y tratadas.

Figura 11. Evaluación de la función contráctil del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación inducida por KCl 80 mM en arterias aorta y caudal.

Figura 12. Análisis histológico de la aorta torácica.

Figura 13. Análisis histológico de la arteria caudal.

### Resumen

La hipertensión es el principal factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en humanos. Entre los sistemas más importantes relacionados con el control de la presión sanguínea están el sistema Renina-Angiotensina (SRA) y los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ( $\alpha_1$ -ARs). La angiotensina II (Ang II) es importante en regular la presión arterial, provoca remodelación vascular e hipertensión así como incrementos en el ARNm y proteína de  $\alpha_1$ -ARs. La literatura describe que el SRA aumenta en ratas espontáneamente hipertensas jóvenes, y podría contribuir en la patogénesis de la hipertensión genética. En el sistema cardiovascular, los  $\alpha_1$ -ARs regulan la contracción del músculo liso vascular y cardíaco, y han sido implicados en patologías como la hipertensión y la hipertrofia cardíaca.

Nuestro objetivo fue explorar la influencia del bloqueo de los receptores  $AT_1R$  y  $\alpha_{1D}$ -AR sobre la hipertensión inducida por infusión continua con Ang II (200ng/kg/min/28días), se evaluó la reactividad en las arterias aorta y caudal de rata. La Ang II incrementó la presión arterial ( $115\pm 2$  a  $220\pm 8$  mmHg); sin embargo, el losartán (antagonista  $AT_1R$ ), administrado en el agua de bebida, revirtió parcialmente la hipertensión por Ang II ( $142\pm 2$  mmHg), mientras que el BMY 7378 (antagonista  $\alpha_{1D}$ -AR) no la revirtió ( $204\pm 9$  mmHg). La contracción máxima a fenilefrina aumentó en aorta ( $E_{max}$ ,  $6.7\pm 0.4$  vs  $7.9\pm 0.3$ ), y no en arteria caudal de ratas con Ang II; el BMY 7378 y el losartán revirtieron la hiperreactividad producida por Ang II en aorta. La evaluación histológica de las arterias aorta y caudal de los diferentes grupos de ratas mostró que la Ang II produce hipertrofia del vaso en la túnica media; sin embargo, ésta se revirtió con la administración de BMY7373 o losartán, administrados cuando ya existía hipertrofia establecida por 2 semanas con Ang II. Estos datos, indican que: la hiperreactividad inducida por Ang II, parece estar mediada, de manera indirecta, por  $\alpha_{1D}$ -AR.

*Hipertensión, angiotensina II, hipertrofia, reactividad*

### **Abstract**

Hypertension is the main risk factor in the development of cardiovascular disease in humans. Among the most important systems related to the control of blood pressure are the renin-angiotensin system (RAS) and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors ( $\alpha_1$ -ARs). Angiotensin II (Ang II) is important in regulating blood pressure, causes vascular remodeling and hypertension as well as increases in mRNA and protein  $\alpha_1$ -ARs. The literature describes that increases SRA young spontaneously hypertensive rats, and it may contribute to the pathogenesis of hypertension genetic. In the cardiovascular system the  $\alpha_1$ -ARs regulate the contraction of vascular smooth muscle and heart, and have been implicated in diseases such as hypertension and cardiac hypertrophy.

Our aim was to explore the influence of the locking of the  $AT_1R$  and  $\alpha_{1D}$ -AR receptors on the hypertension induced by continuous infusion of Ang II (200ng/kg/min/28días), the reactivity in the aorta rat caudal arteries were evaluated. Ang II increased blood pressure (  $115 \pm 2$ - $220 \pm 8$  mmHg ), however , losartan (  $AT_1$ -R antagonist ) administered in the drinking water , partially reversed by Ang II hypertension (  $142 \pm 2$  mmHg ) , while BMY 7378 (  $\alpha_{1D}$  -AR antagonist ) not reversed (  $204 \pm 9$  mm Hg ) . The maximum contraction to phenylephrine increased aorta (Emax,  $6.7 \pm 0.4$  vs.  $7.9 \pm 0.3$ ) and not in rat caudal artery with Ang II , the 7378 and BMY reversed hyperreactivity losartan produced by Ang II in aorta . Histological evaluation of the aorta and caudal arteries of different groups of rats showed that Ang II causes hypertrophy of the vessel in the tunica media, but this was reversed by the administration of losartan or BMY7373 administered when there was already established by hypertrophy 2 weeks with Ang II. These data indicate that: induced hyperreactivity Ang II seems to be mediated indirectly by  $\alpha_{1D}$ -AR.

*Hypertension, angiotensin II, hypertrophy, reactivity*

## 1. Introducción

### 1.1 Hipertensión arterial y prevalencia

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica de etiología variada, que se ha asociado con el aumento de catecolaminas circulantes en plasma, hipersensibilidad del sistema nervioso simpático, incremento del tono vascular y de las resistencias periféricas (Marín, 1993; Villalobos-Molina e Ibarra, 1999; Tanoune y col., 2002; Lyssand y col., 2008).

Se considera hipertensión cuando la presión arterial diastólica es superior a 90 mmHg y la sistólica mayor a 140 mmHg, como promedio de dos o más mediciones en las visitas al médico. Esta alteración en la presión arterial es el factor de riesgo más importante para las enfermedades cardiovasculares, y es el uno de los problemas de salud pública más importante en las ciudades industrializadas (Willians, 1994). Actualmente se encuentra entre las primeras causas de mortalidad y morbilidad en México. La prevalencia es del 33.3% de la población mexicana mayor de 20 años, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Gutiérrez y col., 2012).

El desarrollo de la hipertensión es el resultado de múltiples interacciones entre la susceptibilidad genética y factores ambientales que influyen la función cardíaca, renal y vascular para el incremento en la presión arterial. Un factor clave en la hipertensión es el incremento de la resistencia vascular periférica, debido a las alteraciones funcionales, estructurales y mecánicas en las arterias de resistencia (Touyz, 2005).

La hipertensión arterial es una enfermedad frecuente, que en sus fases iniciales es asintomática, de fácil detección y casi siempre fácil de tratar. Sin embargo, en el 5-10% de los casos existe una causa directamente relacionada con la elevación de la presión (por ejemplo, defectos congénitos en el corazón, anomalías renales; etc.) a este tipo de hipertensión se le denomina *hipertensión arterial secundaria*. En el 90-95% restante, la enfermedad es denominada *hipertensión primara o esencial*, donde la causa es desconocida (Brokk y Julius, 2000).

Existen una gran cantidad de factores que, contribuyen en el desarrollo de la hipertensión, como el consumo de alcohol, tabaquismo, la edad, obesidad, género y resistencia a la insulina, entre otros (Kasper y col., 2006). A pesar de la gran cantidad de investigaciones sobre el tema, no se conocen los eventos que conducen al desarrollo de la hipertensión arterial; sin embargo, en el ámbito vascular se han propuesto tres factores involucrados en la patogénesis de esta condición: 1) hipersensibilidad de los vasos sanguíneos a estímulos vasoconstrictores, 2) cambios estructurales en las paredes de los vasos sanguíneos (hay clara reducción del diámetro luminal y aumento en la relación media/lumen), y 3) disfunción endotelial ( Mulvany, 2008).

### **1.1.1 Remodelación vascular**

La principal anomalía hemodinámica en la hipertensión es el incremento en la resistencia periférica, debido a los cambios estructurales y funcionales en la

vasculatura. Los cambios funcionales son respuestas agudas, las cuales incluyen un incremento en la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores, y disminución en la vasodilatación. El incremento de la resistencia periférica resulta, de forma general, por reducción en el calibre de las arterias de resistencia (aquéllas entre 100-300  $\mu\text{m}$  de diámetro), que responden a estímulos fisiológicos o fisiopatológicos para mantener la perfusión de acuerdo a las necesidades metabólicas de los tejidos. El control vasomotor es responsable de la adaptación rápida del diámetro del lumen, mientras que las alteraciones en las propiedades estructurales de la pared vascular constituyen un proceso dinámico que ocurre en respuesta a modificaciones hemodinámicas a largo plazo. Inicialmente los cambios son adaptativos, y posteriormente son maladaptativos que provocan modificaciones en el grosor de la túnica media y diámetro del lumen. Este proceso llamado *remodelación vascular*, contribuyen a la fisiopatología de enfermedades vasculares, incluyendo la hipertensión (Touyz, 2005; Mulvany, 2008).

La remodelación vascular se ha clasificado de acuerdo a la naturaleza de los cambios en el diámetro del lumen (hacia dentro o hacia afuera), y por los cambios en la masa media (incremento = hipertrofia; decremento = atrofia) (Mulvany y col., 1996). La hipertrofia es un proceso reversible en etapas tempranas, que se refiere al incremento del tamaño de las células como consecuencia del aumento en la síntesis de proteínas. Este cambio estructural de los vasos sanguíneos se presenta en la hipertensión e incluye la reducción del diámetro y el incremento en el grosor de la túnica media (Baker y col, 1992).

Durante la remodelación vascular, hay un proceso activo de cambios estructurales, relacionado con alteraciones en procesos celulares (incluyendo crecimiento, apoptosis, migración, inflamación y producción de proteínas de matriz extracelular), y que incrementa la relación túnica media / lumen (Touyz, 2003; Touyz, 2005). El aumento en la relación túnica media / lumen en pequeñas arterias de resistencia, dado por el aumento de la masa muscular o por un reacomodo inadecuado de elementos celulares, favorece de forma muy importante la fisiología de la hipertensión y sus complicaciones; estos cambios estructurales aumentan la reactividad vascular, lo cual potencia el incremento de la resistencia periférica, característica de la hipertensión (Schiffirin y Touyz 2004; Touyz, 2007; Mulvany 2008).

En este contexto, desde hace varios años se ha sugerido que la hipertensión primaria se asocia con cambios estructurales en los vasos de resistencia (Mulvany y col., 1996). En virtud de la importancia de la pared vascular en el desarrollo de la hipertensión arterial, es menester mencionar que los elementos que constituyen la pared vascular son las células y la matriz extracelular. Las células representan el 20% del peso seco de la pared y las más importantes son las células endoteliales (CE) y las células del musculo liso vascular (MLV). La matriz comprende cuatro grupos de macromoléculas: elastina, colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas estructurales. La pared vascular se puede describir como un órgano activo, flexible, dinámico, que cambia de forma y sus componentes aumentan, disminuyen o se reorganizan, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos

(Dubey y col., 1997; Iermoli, 2001). Las arterias están formadas por tres túnicas o capas: íntima, media y adventicia (Figura 1).

- La íntima está constituida por una monocapa de células endoteliales con matriz extracelular.
- La media está separada de la íntima por la lámina elástica interna y comprende células del MLV, fibrillas elásticas y matriz extracelular.
- La adventicia (externa) es la más variable y contiene fibroblastos, tejido fibroelástico denso y nutrientes

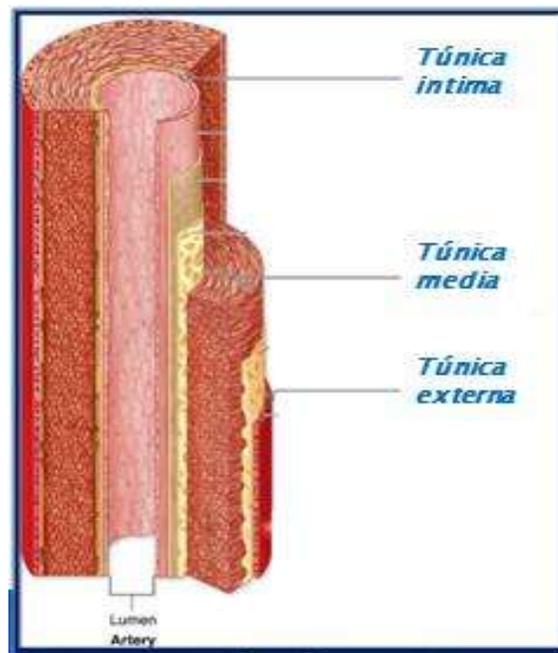


Figura 1. Estructura arterial. Las arterias están formadas por tres capas principales: la íntima, la media y la adventicia. (Tomado y modificado de Quesada y Carbonell 1999).

En los vasos sanguíneos, las células del músculo liso y la matriz son responsables de las características estructurales y funcionales de la pared vascular, como la

contracción – relajación, crecimiento, desarrollo, y remodelación; y están involucradas en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (Touyz y Schiffrin, 2000). Existen muchos factores, tanto locales como sistémicos, que regulan la función de las células de MLV como los péptidos vasoactivos angiotensina II (Ang II) y endotelina-1 (ET-1), involucrados en activar vías relacionadas con el crecimiento, así como la vasoconstricción; de igual manera también hay algunos factores vasorelajantes como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Touyz y Schiffrin, 2000).

### **1.2 Reguladores de la presión arterial**

El sistema circulatorio asegura una correcta y adecuada perfusión sanguínea a todos los tejidos, lo cual depende por un lado de una presión arterial que permita la circulación de la sangre y, por otro lado, de la capacidad de cada órgano o tejido para auto regular su propio flujo (Quesada y Carbonell, 1999). Los ajustes circulatorios se realizan mediante modificaciones en el gasto cardíaco, cambiando el diámetro de los vasos sanguíneos de resistencia (arteriolas principalmente) o la cantidad de sangre almacenada en los vasos de capacitancia (las venas). Por lo que en este contexto, para la regulación de la presión arterial a nivel fisiológico existen diversos sistemas encargados de mantenerla, entre ellos la regulación nerviosa (la reactividad vascular a catecolaminas) y la regulación humoral (sistema renina angiotensina; SRA), entre otros (Grassi, 1998; Brokk y Julius, 2000; Guyton y Hall, 2000). A continuación se describen con mayor detalle.

### 1.2.1 Descripción del sistema renina angiotensina (SRA)

#### 1.2.1.1 Formación de Angiotensina II

El SRA tiene una función importante al regular los procesos fisiológicos del sistema cardiovascular (Engberding y Griendling, 2008). La principal molécula efectora del SRA es la angiotensina II (Ang II), una hormona que afecta la función de prácticamente todos los órganos, incluyendo el corazón, los riñones, la vasculatura y el cerebro, y participa en efectos benéficos o patológicos (Metha y Griendling, 2007). La Ang II es una hormona octapeptídica pleiotrópica, y es el componente más importante de este sistema. Este sistema comienza por hidrólisis enzimática del angiotensinógeno, liberado por el hígado, vía la renina, por una aspartil proteasa proveniente de las células yuxtglomerulares de riñón (Kumar y col., 2000). La renina es una glicoproteína con 340 aminoácidos con una vida media de casi 15 minutos, cuya secreción está controlada por tres vías, dos que actúan a nivel local dentro de los riñones en la mácula densa y la tercera que actúa en todo el sistema nervioso central, mediada por la liberación de noradrenalina a partir de nervios noradrenérgicos renales. Hidroliza el angiotensinógeno en enlace 10-11 del amino terminal para formar así la angiotensina I., (Itoh y col., 1993).

La conversión de Ang I a Ang II, se realiza por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una dipeptidil carboxipeptidasa que hidroliza el dipéptido carboxilo terminal His-Leu de la angiotensina I, para de esa manera producir el octapéptido, que será la angiotensina II (Figura 2), y que se degrada subsecuentemente por proteólisis adicional.

Asimismo, la ECA influye en la degradación metabólica de bradiginina, un vasodilatador potente que libera sustancias vasoactivas desde el endotelio; además, la bradiginina inhibe la proliferación celular del músculo liso al estimular la liberación de factores endoteliales como el NO y la PGI<sub>2</sub> (Touyz y Schiffrin, 2000; Eguchi y col., 2001; Lemarié y col., 2008; Mugabe y col., 2009).

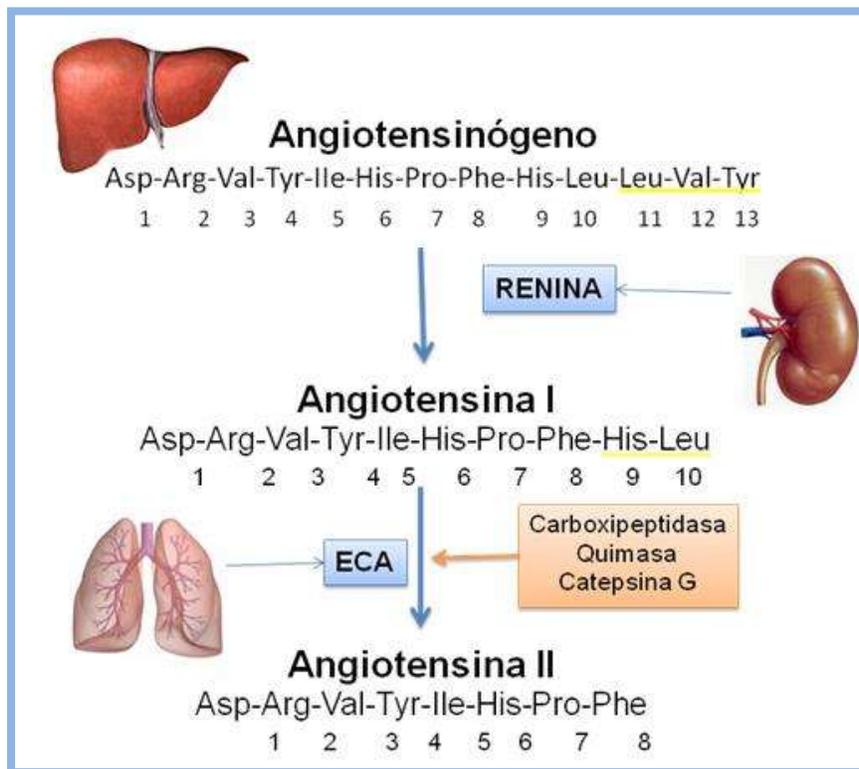


Figura 2. Esquema del Sistema Renina Angiotensina. El sistema renina angiotensina comienza con la hidrólisis del angiotensinógeno, en la cual la renina incide en el aminoácido 11 Leu formando así el decapeptido angiotensina I, y este por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) rompe en el aminoácido 9 His formando así el octapéptido angiotensina II. Las líneas amarilla indican los sitios de proteólisis de las diferentes enzimas. Las vías alternas que pueden formar angiotensina II, son carboxipeptidasa, quimasa y catepsina G. (Modificado de Touyz, 2000).

La Ang II tiene una vida media biológica en la circulación que va de 15 a 60 segundos; actúa en el MLV, considerándose como un agente muy potente que

aumenta la presión sanguínea, inclusive más que la noradrenalina (Goodman y Gilman, 2007)

El SRA se consideraba originalmente como un sistema circulante. Sin embargo, estudios recientes han localizado casi todos los componentes del SRA (angiotensinógeno, renina y ECA) en tejidos y órganos; tales la como la vasculatura, el corazón, el riñón y el cerebro, lo que indica la existencia de SRA tisular o local (Danser, 1996; Touyz y Schiffrin, 2000). Así, estos órganos operan de manera independiente al SRA circulante. Todos los componentes del SRA, excepto la renina, se producen en la vasculatura así como también se encuentra la ECA en altas concentraciones en la capa adventicia (Figura 3) (Kumar y col., 2000; Touyz y Schiffrin, 2000).

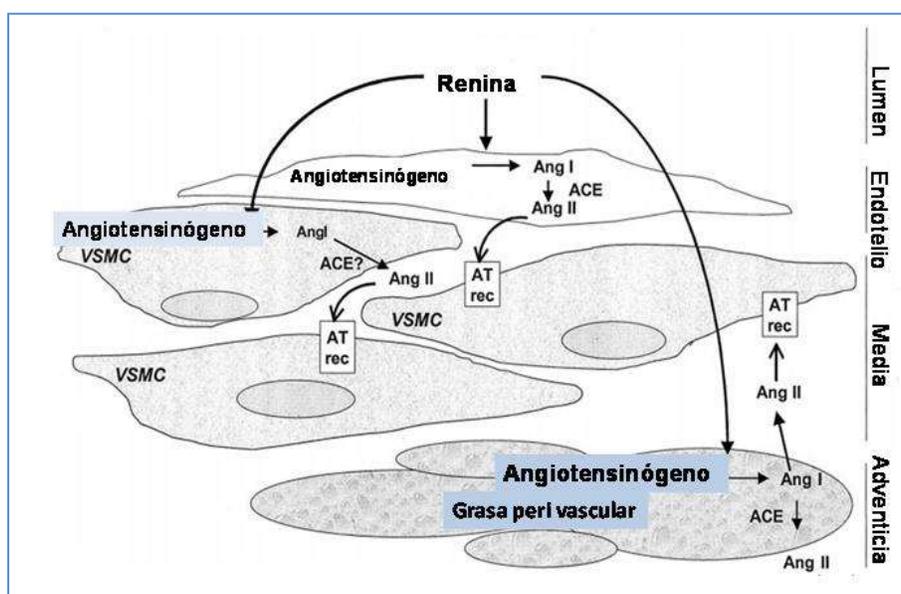


Figura 3. Sistema renina angiotensina tisular. El angiotensinógeno, ECA y los receptores a Ang II, los AT se encuentran en el endotelio, células de músculo liso vascular así como en la grasa perivascular. VSMC; vascular smooth muscle cells, ACE; angiotensin-converting enzyme. (Tomado y modificado de Touyz, 2000).

Cabe mencionar que la vía descrita no es la única vía de síntesis de Ang II, pues existen otras vías alternas importantes en algunos tejidos o que se activan durante estados patológicos; por ejemplo, las quimasas, la catepsina G, la quimiostatina sensible a la generación de Ang I (chymostain-sensitive Ang II-generating enzyme, CAGE) y la carboxipeptidasa (Figura 2), (Engberding y Griendling, 2008).

La angiotensina II puede incrementar el tono simpático de manera directa, así como la liberación de noradrenalina al estimular terminaciones nerviosas simpáticas que contribuyen a una mayor vasoconstricción. Muchos de los efectos fisiológicos conocidos de la Ang II son mediados por los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$ . Ambos receptores pertenecen a la familia de los receptores con siete dominios transmembranales y comparten el 30-34% de su secuencia de aminoácidos (Touyz, 2000).

### **1.2.1.2 Receptor $AT_1$**

El  $AT_1$ -R está codificado en humanos por un solo gen ubicado en el cromosoma 3, mientras que en los ratones se conocen dos genes localizados en los cromosomas 17 y 2 que dan origen a dos formas del  $AT_1$ -R, conocidas como receptores  $AT_{1a}$  y  $AT_{1b}$ , con más de 95 % de similitud en su secuencia de aminoácidos. El  $AT_1$ -R está conformado por 359 aminoácidos, tiene un peso molecular de 40 KDa, y se encuentra distribuido en todos los órganos, incluyendo el hígado, el pulmón, las adrenales, el cerebro, el riñón, el corazón y la

vasculatura; en forma particular está presente en las tres tunicas del vaso sanguíneo (Touyz, 2000; Mehta y Griendling, 2007).

La unión entre la Ang II y el AT<sub>1</sub>-R induce un cambio conformacional en el receptor que promueve su interacción con la proteína G<sub>αq/11</sub> (entre otras), que a su vez regula la transducción de la señal a través de varios sistemas efectores, tales como la activación de fosfolipasas A, D y C, y la inhibición de la adenilato ciclasa. La activación de la fosfolipasa C genera IP<sub>3</sub> el cual libera Ca<sup>2+</sup> del retículo y diacilglicerol (DAG), el cual activa a la PKC (Figura 4). La PKC a su vez, fosforila diversas proteínas que participan en acciones como: la contracción del músculo liso, la secreción de aldosterona, así como el crecimiento y la proliferación celular (Escobar y col., 2004; Engeberding y Griendling, 2008).

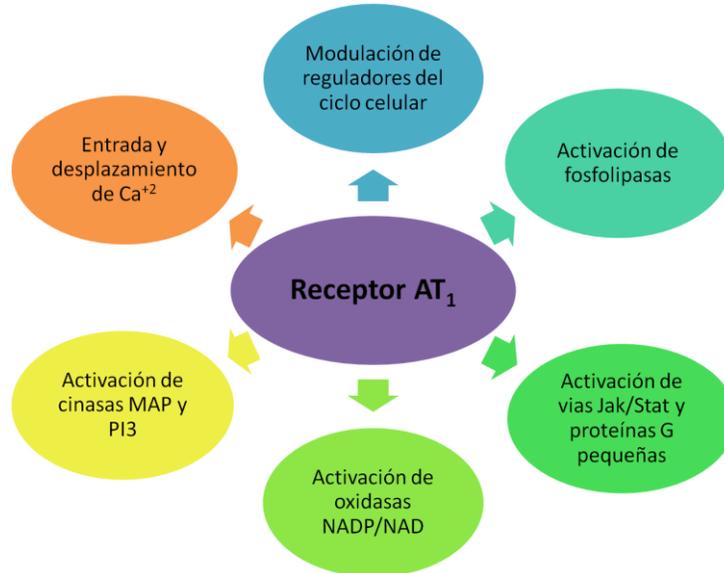


Figura 4. Mecanismos múltiples de acoplamiento receptor-efector AT<sub>1</sub>. Los receptores AT<sub>1</sub> se acoplan a proteínas G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>12/13</sub>. A través de efectores, segundos mensajeros y cascadas de señalización, se incluye subsecuentemente un grupo grande de vías de respuesta para producir efectos inmediatos y a largo plazo de la Ang II (Tomado y modificado Goodman y Gilman, 2007).

Otra característica del AT<sub>1</sub>-R es que al unir Ang II, eventualmente se fosforilan sus residuos de serina en el extremo carboxilo terminal, lo cual da lugar al reclutamiento de proteínas denominadas arrestinas, permitiendo la endocitosis del complejo Ang II-AT<sub>1</sub>-R dentro de vesículas recubiertas con clatrina y, por lo tanto, la desensibilización del sistema. Una vez internalizado el receptor, puede ser degradado o desfosforilado y reciclado hacia la membrana celular; cabe aclarar que esto solo se presenta con el AT<sub>1</sub>-R, y no con el AT<sub>2</sub>-R (Thomas y Qian, 2003).

### **1.2.1.3 Receptor AT<sub>2</sub>**

La segunda isoforma del receptor a la Ang II, es el AT<sub>2</sub>-R. Los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> comparten 30-34% de similitud, está conformado por 363 aminoácidos, el gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma X, tanto en humanos como en ratones (Touyz, 2000; Mehta y Griendling, 2007). El AT<sub>2</sub>-R se expresa de manera predominante durante la etapa fetal, disminuyendo su expresión de manera considerable después del nacimiento. Entre los tejidos que se expresan están, incluidos la aorta fetal, el mesenquima gastrointestinal, el tejido conectivo y el cerebro. Cabe mencionar que en la etapa adulta la expresión de este receptor se incrementa bajo condiciones de estrés o algunas patologías, entre las cuales se incluyen insuficiencia e hipertrofia cardíacas (Griendling y col., 1996; Shanmugan y col., 1996; Escobar y col., 2004; Lévy, 2004).

Las vías de señalización del AT<sub>2</sub>-R no se conocen claramente; sin embargo, existe evidencia que muestra el acoplamiento del AT<sub>2</sub>-R con proteínas G inhibitoras

( $G_{\alpha i/2}$ ,  $G_{\alpha i/3}$ ), lo cual provoca la activación de fosfatasa tanto de serina-treonina. Este acoplamiento provoca la desfosforilación de proteínas activadas por el acoplamiento del  $AT_1$ -R ( $AT_1$ - $G_{\alpha q}$ ), siendo éste un mecanismo por el cual el  $AT_2$ -R antagoniza las acciones del  $AT_1$ -R. Los efectos fisiológicos del  $AT_2$ -R, son contrarios a los del  $AT_1$ -R, es decir participa en la vasodilatación y en la inhibición de la proliferación celular, además interviene en el desarrollo fetal y en la diferenciación tisular (Escobar y col., 2004).

### 1.3 Funciones y efectos del SRA

El SRA tiene un papel importante dentro de los principales mecanismos que regulan la presión arterial sistémica, y los procesos fisiológicos del sistema cardiovascular, siendo la Ang II el principal efector de las respuestas vasculares, mediante la estimulación de receptores  $AT_1$  (Touyz y Schiffrin, 2000). La Ang II regula procesos con diferente temporalidad: media eventos inmediatos (en segundos-minutos), tempranos (en minutos-horas) y tardíos (en horas-días) (Touyz, 2005). La Ang II es un potente vasoconstrictor, en el riñón altera la reabsorción de sodio y agua, al estimular la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal para sintetizar y secreta aldosterona; también es un potente estimulante de la síntesis de proteínas y la principal característica de hipertrofia en células vasculares del músculo liso. También la Ang II ejerce su efecto directamente en el músculo liso vascular como vasoconstrictor, afectando así la contractilidad y la frecuencia cardíaca e incrementa el tono simpático y la

neurotransmisión adrenérgica y facilita la liberación de catecolaminas (Weir y Dzau, 1999; Watanabe y col., 2005; Godínez y col., 2006).

### **1.3.1 Incremento de la resistencia vascular periférica por la Ang II**

La Ang II aumenta la resistencia periférica total por efectos directos e indirectos sobre los vasos sanguíneos: vasoconstricción directa o aumento de la neurotransmisión noradrenérgica periférica.

*Vasoconstricción directa.* La Ang II contrae arteriolas precapilares, así como arterias por activación de los AT<sub>1</sub>-R localizados en células de músculo liso vascular y estimulación vía G<sub>q</sub>- PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>+2</sup>.

*Aumento de la neurotransmisión noradrenérgica periférica;* este tipo de neurotransmisión se facilita al incrementar la liberación de noradrenalina a partir de terminales nerviosas simpáticas, inhibir la recaptación de noradrenalina hacia las terminales nerviosas y aumentar la respuesta vascular a la noradrenalina. Las concentraciones altas del péptido estimulan de manera directa a las células ganglionares (Zimmerman y col., 1987; Saino y col., 1997).

### **1.3.2 Alteración de la función renal por la Ang II**

La Ang II genera efectos pronunciados sobre la función renal para reducir la excreción urinaria de Na<sup>+</sup> y agua, en tanto incrementa la excreción de K<sup>+</sup>.

El efecto general de este péptido sobre los riñones es aumento de la presión renal-natriuresis. También se sabe que la Ang II estimula la zona

glomerulosa de la corteza suprarrenal e incrementa la síntesis y secreción de aldosterona.

### **1.3.3 Alteración de la estructura cardiovascular**

La Ang II contribuye de manera importante a los cambios patológicos en las estructuras cardiovasculares (Figura 5). A este respecto, la Ang II:

- 1) Estimula la migración, proliferación e hipertrofia de células de músculo liso vascular (Bell y Madri, 1990; Daemen y col., 1991; Itoh y col., 1993; Dubey y col., 1995).
- 2) Aumenta la producción de matriz extracelular por células de músculo liso vascular (Scott-Burden y col., 1990).
- 3) Causa hipertrofia de los miocitos cardiacos.
- 4) Incrementa la producción de matriz extracelular por fibroblastos cardiacos (Baker y col., 1992).

En resumen, los efectos de la Ang II en la resistencia periférica, la función renal y la estructura cardiovascular ocurren por mecanismos directos e indirectos.

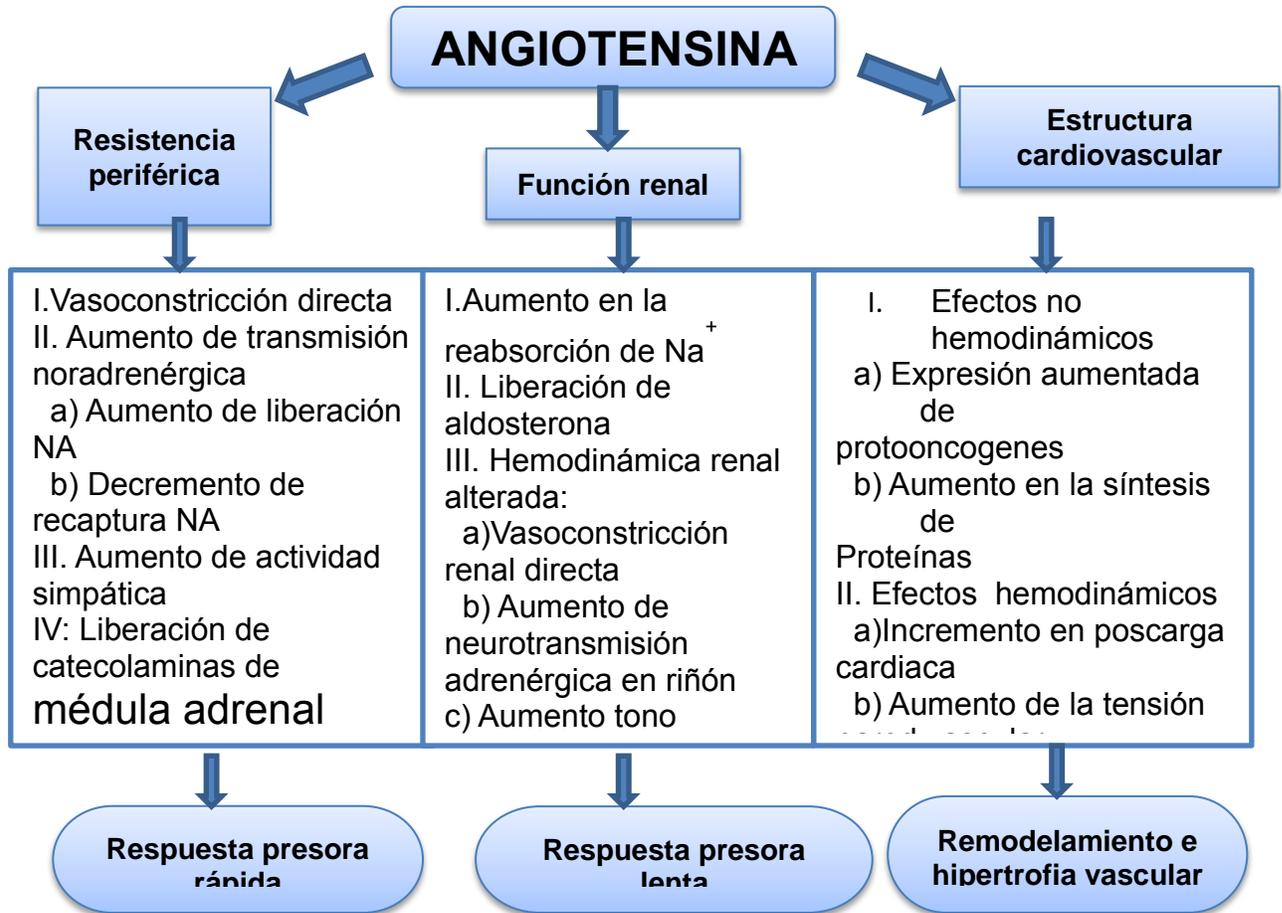


Figura 5. Efectos de la angiotensina II. Resumen de los tres efectos principales de la Ang II y los mecanismos que lo median. NA, noradrenalina. (Tomado y modificado Goodman y Gilman, 2007).

La Ang II estimula la emigración, la proliferación, la hipertrofia, o una combinación de ellos, debido a que actúan de manera directa sobre las células para inducir la expresión de protooncogenes específicos. En cultivo de células, la Ang II incrementa con rapidez (en minutos) las concentraciones de estado estacionario de ARNm para los protooncogenes c-fos, c-jun, c-myc y erg-1. Las proteínas FOS y JUN, codificadas por c-fos y c-jun, se combinan y forman AP-1, y este último altera la expresión de varios genes que estimulan el crecimiento de células (Crawford y col., 1994; Ostrom y col., 2003).

### **1.4 Papel del sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación cardiovascular**

El SNS está distribuido ampliamente por todo el organismo y participa en la gran mayoría de los procesos fisiológicos. Este sistema posee la capacidad para llevar a cabo una regulación momentánea y a corto plazo (segundos-minutos) y sostenida (días-años) de la presión sanguínea. El SNS controla el músculo liso vascular, así como la frecuencia y la fuerza de contracción del corazón (Rang y col., 2008). La importancia de la contribución del SNS sobre el tono vascular, normal y anormal, se hace evidente al presentarse una caída considerable de la presión arterial, después del antagonismo farmacológico de los receptores adrenérgicos, tanto en humanos como en animales, además de los efectos inmediatos del SNS sobre los vasos sanguíneos, debido a que existen evidencias que sugieren que los nervios simpáticos perivasculares tienen efectos tróficos a largo plazo sobre el sistema cardiovascular (Mark, 1996).

#### **1.4.1 Receptores adrenérgicos**

Las catecolaminas interactúan con una familia bien conocida de receptores adrenérgicos (AR). Estos receptores son mediadores críticos de las respuestas del SNS, y de respuestas involucradas en la homeostasis cardiovascular. Los AR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Finch y

Graham, 2006), se localizan en la membrana celular, donde reconocen a sus agonistas y transducen la señal hacia el interior de la célula (Xin y col. 1997).

Los AR median respuestas celulares a las catecolaminas noradrenalina (NA) y adrenalina. Estas hormonas son secretadas por la glándula adrenal o liberadas como neurotransmisor de neuronas adrenérgicas dentro del sistema nervioso central y neuronas posganglionares simpáticas periféricas. Estas catecolaminas participan en la regulación cardiovascular; por ejemplo, la activación de AR en el corazón, incrementa la frecuencia cardiaca y la fuerza de contracción, mientras que en el músculo liso vascular contraen los vasos, lo que produce un incremento de la presión arterial (Izzo y Black, 2008).

### 1.4.2. Clasificación de los receptores adrenérgicos

Los AR se dividen en tres familias:  $\alpha_1$  AR,  $\alpha_2$  AR y  $\beta$  AR, su función se realiza al unirse a las catecolaminas, transducen señales al acoplarse y activar a las proteínas G heterotriméricas, formadas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ( $G_{q/11}$ ,  $G_i$  y  $G_s$ , respectivamente), promoviendo el intercambio de GTP por GDP en la subunidad  $\alpha$  y su disociación de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  (Finch y Graham, 2006). A la fecha se han clonado los genes de 9 ARs:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (Phillip y col., 2002). Los receptores  $\alpha_1$  se han clasificado en  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ; su cascada de señalización incrementa el  $Ca^{+2}$  intracelular, ya que activan a la fosfolipasa C (PLC) vía una proteína  $G_{q/11}$ , generando inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  viaja hasta sus receptores en el retículo endoplásmico y

libera  $\text{Ca}^{+2}$ , el cual actúa de manera sinérgica con DAG para activar a la proteína cinasa C (PKC), que fosforila proteínas específicas. Los tres  $\alpha_1$ -AR poseen afinidad similar por las catecolaminas, se expresan en las arterias y al unirse a sus agonistas median respuestas simpáticas, como la contracción del músculo liso vascular y cardíaco (Touyz y Schiffrin, 2000; Waldrop y col., 2002).

Por otra parte, los receptores  $\alpha_2$  se clasifican en  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ . Esta familia de receptores disminuyen el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) al inhibir a la adenilato ciclasa vía una proteína  $G_i$ , mientras que los receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  estimulan la producción de AMPc al estimular la adenilato ciclasa vía proteínas  $G_s$ . Los  $\alpha_2$ -AR y  $\beta$ -AR son activados por adrenalina, pero pueden ser diferenciados por fármacos con efectos opuestos sobre la adenilato ciclasa (Kobilka y col., 1998). En la tabla 1, se muestran las características de los tres receptores adrenérgico

**Tabla 1. Receptores adrenérgicos y vías de señalización. Tomado y modificado de Goodman y Gilman, 2007.**

Receptor adrenérgico	Proteína G asociada	Segundo mensajero
$\alpha_1$ - Adrenérgicos $\alpha_{1A}$ , $\alpha_{1B}$ y $\alpha_{1D}$	Proteína $G_{\alpha/11}$	Activa PLC: $\text{IP}_3$ - $\text{Ca}^{+2}$ y DAG- PKC
$\alpha_2$ - Adrenérgicos $\alpha_{2A}$ , $\alpha_{2B}$ y $\alpha_{2C}$ ,	Proteína $G_{\alpha_i}$ y $G_o$	Inhibe adenilato ciclasa y baja AMPc Activa canales de $\text{K}^+$ Inhibe canales de $\text{Ca}^{+2}$

$\beta$ - Adrenérgicos	Proteína	Activa la adenilato ciclasa
$\beta_1$ , $\beta_2$ y $\beta_3$	$G_s$	y aumenta AMPc

### 1.4.3. Receptores $\alpha_1$ - adrenérgicos

Los  $\alpha_1$ -AR son de gran interés debido a su importancia al regular las respuestas fisiológicas mediadas por catecolaminas en el sistema cardiovascular. Además, han sido implicados en patologías como hipertrofia y remodelación vascular. En este contexto, se ha demostrado que la hipersensibilidad del músculo liso vascular deriva, entre otras cosas, por estímulos sobre los  $\alpha_1$ -AR. Estos receptores son uno de los principales factores involucrados en mantener la presión arterial durante la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR); así como en otros modelos de hipertensión (Villalobos-Molina e Ibarra, 1999; García Sainz y col., 1999).

Sin embargo, algunos estudios han mostrado que los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) interactúan con varias proteínas además de la proteína G, ampliando la señalización y así se establecen distintas funciones dependiendo del receptor estimulado (Hall y col., 1999; Hall y Lefkowitz 2002). Aunque los tres  $\alpha_1$ -AR se acoplan a la vía de señalización por  $G_{q/11}$ , hay datos que indican que los tres actúan por señalización diferencial después de estimular a la proteína  $G_{q/11}$  (Zhong y Minneman, 1999; Chen y Minneman, 2005). Estudios recientes han mostrado que los  $\alpha_1$ -AR se asocian con otros sistemas; por ejemplo, se reportó que los receptores  $\alpha_{1D}$ , forman heterodímeros con el  $AT_{1D}$ -R durante el embarazo y

que la disminución de esta asociación se puede relacionar con preeclampsia (González- Hernández y col., 2010).

Estudios de unión con radioligandos, análisis farmacológicos y el clonaje molecular han mostrado que los tres  $\alpha_1$ -AR tienen diferentes propiedades farmacológicas y secuencias de aminoácidos.

En las arterias de las ratas se ha detectado el ARNm de los tres  $\alpha_1$ -AR (Piascik y col., 1994; Scofield y col., 1995). Sin embargo, por el uso de radioligandos o en estudios funcionales y con anticuerpos contra los  $\alpha_1$ -AR se demostró que uno o dos de los  $\alpha_1$ -AR predominan en la contracción del músculo liso (Piasck y col., 1997; Villalobos- Molina y col. 1997; Ibarra y col., 2000). Se sabe que el ARNm del  $\alpha_{1D}$ -AR está ampliamente distribuido, así como también es traducido en respuesta a ciertos estímulos, como en la hipertensión (Hague y col., 2006). Estos receptores se mantienen fosforilados en sus estado basal y los agonistas naturales adrenalina y noradrenalina, incrementan su fosforilación, un efecto similar a la activación directa de la PKC (García-Sáinz y col., 2001).

Los  $\alpha_1$ -AR se han caracterizado en una gran variedad de vasos. En particular, el  $\alpha_{1D}$ -AR se ha caracterizado en arterias: tales como la aorta, la carótida, la mesentérica, la femoral iliaca y la renal, y se ha observado que median la contracción por agentes adrenérgicos y que contribuyen al control de la presión arterial *in vivo* (Bracho-Valdés y col., 2009). Además, en las arterias que expresan el  $\alpha_{1D}$ -AR, predominante en la respuesta contráctil, pero no en las arterias que expresan el  $\alpha_{1A}$ -AR o  $\alpha_{1B}$ -AR, existe una población de receptores

constitutivamente activos, es decir, los receptores no requieren noradrenalina para ser estimulados; sin embargo, este fenómeno no se observa en los otros dos  $\alpha_1$ -AR y sugiere que los  $\alpha_{1D}$ -AR juegan un papel modulador en las arterias de conductancia, evitando cambios súbitos en el diámetro arterial cuando se remueve el agonista, manteniendo el flujo sanguíneo (Gisbert y col., 2000; Ziani y col., 2002)

En este contexto, existen diversas evidencias que muestran que los  $\alpha_{1D}$ -AR se relacionan con la génesis y/o el mantenimiento de la hipertensión, pues se encuentran presentes antes del establecimiento de la misma, y se ha sugerido que hay un incremento en la población constitutivamente activa de los  $\alpha_{1D}$ -AR, razón por la cual pueden ser responsables de la patología y el aumento en el tono simpático en las ratas SHR (Villalobos-Molina e Ibarra 1996, 1999; Villalobos-Molina y col., 1997; Guimaraes y Moura 2001; Gisbert y col., 2002; García-Sáinz y Villalobos-Molina, 2004).

Estudios previos han mostrado que los  $\alpha_1$ -AR estimulados por catecolaminas (norepinefrina) están involucrados en el desarrollo de hipertrofia, así como en la proliferación en células de músculo liso vascular (Xin y col., 1997).

## 1.5 Antecedentes

Respecto a la comunicación entre el SRA y el SNS, varias investigaciones se han enfocado en explicar la relación entre estos dos sistemas: el SRA y las vías adrenérgicas periféricas y su participación en la génesis de la hipertensión. Existen evidencias que sugieren que los dos sistemas tienen efectos, uno sobre el otro, en la vasculatura periférica en el sistema nervioso central (Saxena, 1992).

Por otro lado, Schiffrin y col. (1984) encontraron un aumento en la densidad de los  $\alpha_1$ -AR, y los receptores a Ang II en la vasculatura de ratas SHR, antes del desarrollo de hipertensión (4 semanas de edad).

La Ang II es un potente vasoconstrictor a través de la activación del  $AT_1$ -R en músculo liso vascular, y mediante la modulación de la función simpática. Esto último se debe a que la Ang II facilita la neurotransmisión de terminales nerviosas simpáticas, por lo cual conduce al aumento en la frecuencia y contractilidad cardíaca: al aumentar el tono simpático a nivel presináptico se facilita la liberación de noradrenalina (Weir y Dzau, 1999; Goodman y Gilman, 2007).

La infusión continua de Ang II *in vivo*, durante dos semanas aumenta la presión arterial, y en células de músculo liso vascular se incrementa la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), siendo este efecto depende de la estimulación de los  $\alpha_1$ -AR, pues la prazosina bloqueó el efecto mitogénico inducido por la Ang II (Van Kleef y col., 1992). También existen otros datos que muestran que la estimulación con Ang II en células de músculo liso vascular en cultivo, incrementa el contenido de proteína. De manera muy interesante, observaron que hubo

síntesis *de novo* de  $\alpha_1$ -AR (Hu y col., 1995) sugiriendo que entre ambos sistemas existe una posible comunicación cruzada (“cross-talk”).

Resultados de Godínez-Hernández y col., (2006) mostraron que dosis bajas de captopril, un inhibidor de ECA disminuye la respuesta funcional contráctil en ratas SHR de 4 semanas de edad, así como la expresión del ARNm y la proteína  $\alpha_{1D}$ -AR en la aorta de ratas SHR. Estos datos sugieren que la ausencia de Ang II disminuye la expresión de los  $\alpha_{1D}$ -AR en la aorta de ratas SHR, lo que conduce a la disminución de la reactividad vascular, indicando que existe una relación entre el SRA y los  $\alpha_{1D}$ -AR.

Datos recientes de nuestro grupo de trabajo, muestran que la infusión con Ang II durante dos semanas, incrementa la presión arterial, la reactividad vascular así como el desarrollo de hipertrofia en la aorta. Además se observó que el co-tratamiento con losartán (antagonista  $AT_1$ ) o con BMY7378 (antagonista  $\alpha_{1D}$ ), previenen el desarrollo de la hipertrofia, lo que sugiere que hay comunicación cruzada entre estos dos sistemas.

### **2. Justificación**

La hipertensión arterial representa actualmente un importante problema de salud pública en nuestro país, siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad. Así, es de suma importancia conocer más acerca de los procesos que ocurren durante este padecimiento. Nos interesa en particular la importancia de la angiotensina II así como los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$ -AR en el fenómeno hipertensivo. Se conoce que el antagonismo de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y  $AT_1$  previene el desarrollo de la hipertrofia vascular (aorta) dependiente de angiotensina II; sin embargo, se desconoce si el bloqueo de estos receptores, posterior a la hipertrofia vascular, pueda revertirla.

## 3. Hipótesis

El antagonismo de los receptores adrenérgico  $\alpha_{1D}$  y  $AT_1$  revierte los efectos vasculares generados por la infusión continua con angiotensina II.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Determinar si el antagonismo de los receptores adrenérgico  $\alpha_{1D}$  y  $AT_1$  revierte los efectos vasculares durante la hipertensión inducida por angiotensina II.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Determinar si el efecto hipertensivo de la angiotensina II se revierte con el antagonismo de los receptores adrenérgico  $\alpha_{1D}$  y  $AT_1$ .
2. Evaluar la reactividad vascular adrenérgica en la hipertensión inducida por angiotensina II.
3. Determinar la influencia de los receptores adrenérgico  $\alpha_{1D}$  y  $AT_1$  sobre el remodelamiento vascular durante la hipertensión inducida por angiotensina II.

## 5. Materiales y métodos

### Protocolo experimental

#### 5.1 Animales

Se emplearon ratas Wistar macho de 3 meses de edad, las cuales se mantuvieron con temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) y 40-60% de humedad, y con acceso libre a agua y alimento. El almacenamiento, cuidado y procedimientos experimentales de las ratas se realizaron evitando al máximo el sufrimiento innecesario, siguiendo las directrices aprobadas por el Comité Institucional de Bioética sobre el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México). El número de ratas por grupo (n) fue de 5 para experimentos *in vivo/in vitro*.

#### 5.2 Infusión continua de angiotensina II

Las ratas se entrenaron para la medición de la presión arterial en la cola por pletismografía no invasiva, con un sistema digital Letica (PanLab, España). Una vez registrada la presión arterial basal, a un grupo de ratas se les implantó una bomba osmótica Alzet (Alza Co., Cupertino, CA, EUA) por vía subcutánea, que contenía la Ang II (Sigma Aldrich) para ser liberada de manera continua a dosis de 200 ng/kg/hora/28 días; se midió la presión arterial cada tercer día, después de haber entrenado las ratas al procedimiento. Al final del tratamiento las ratas se sacrificaron, mediante anestesia profunda con pentobarbital sódico, para experimentos de órgano aislado y/o su preparación para histología.

### **5.3 Efecto del procedimiento quirúrgico en la presión arterial y reactividad vascular en arterias aorta y caudal**

Para evaluar el efecto del procedimiento quirúrgico, se emplearon ratas normotensas, controles después de cirugía o sin cirugía, que se adiestraron para medir la presión arterial basal y, posteriormente, se registró cada tercer día durante 14 días. Una vez finalizado el periodo de evaluación, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg ip), y se extrajo las arterias aorta torácica y caudal, para experimentos *in vitro*.

### **5.4 Tratamiento con BMY 7378 (antagonista adrenérgico $\alpha_{1D}$ ) o losartán (antagonista $AT_1$ ) en ratas con bomba de Ang II. Registro de la presión arterial**

Las ratas control y las tratadas con Ang II, Ang II+ BMY 7378 y Ang II+ Losartán, se entrenaron en paralelo. Una vez registrada la presión arterial basal, se dejaron con bomba + Ang II y a los 14 días un grupo de ratas recibió tratamiento vía oral con BMY 7378 (10 mg/kg/día) durante 14 días y otro grupo, recibió losartán (1mg/kg/día durante 14 días) en el agua de bebida; se midió la presión cada tercer día. Al final del tratamiento las ratas se sacrificaron para experimentos posteriores.

Los grupos para realizar los estudios funcionales y el análisis histológico fueron los siguientes:

A) Ratas Control

- B) Ratas con Ang II
- C) Ratas con Ang II + BMY7378
- D) Ratas con Ang II + Losartán

### **5.5 Registro de la presión arterial sistólica en los animales con bomba**

A las ratas se les midió la presión arterial sistólica por pletismografía. Esta evaluación se realizó registrando el pulso sistólico de la presión en la arteria caudal de las ratas. La toma de presión se llevó a cabo en un cuarto cerrado, libre de ruidos que puedan perturbar la tranquilidad de las ratas y a temperatura ambiente. Con el propósito de dilatar la arteria caudal y permitir un mejor flujo sanguíneo, las ratas se colocaron dentro de jaulas inmovilizadoras y sobre una placa provista de un sistema de calefacción que mantuvo la temperatura entre 30° y 32°C.

El sistema de registro LE 5007 es un instrumento programable, basado en un microprocesador que controla el proceso mecánico-electrónico operativo de una medición de presión sanguínea, por un método no invasivo. El registro se basa en la técnica esfigmomanométrica (la empleada en la toma de tensión en humanos); así, el equipo tiene un manguillo de presión que ocluye el paso de sangre, y de un transductor que registra las pulsaciones cardiacas. Ambos instrumentos se colocan en la cola del animal para operar sobre la arteria caudal. El sistema LE 5007 registra los valores de presión sistólica o máxima, diastólica o

mínima y frecuencia cardíaca. Para el almacenamiento de datos, el equipo se acopla a un sistema de adquisición de datos RSD232 y el software SEDACOM.

### **5.6 Registro de la contracción isométrica en arterias aorta y caudal aisladas de ratas control y tratadas con angiotensina II**

Las ratas se sacrificaron por anestesia profunda con pentobarbital sódico (50 mg/kg intraperitoneal). Las arterias aorta y caudal se disecaron y limpiaron de tejido conectivo y grasa, se cortaron en anillos de 4-5 mm de longitud. Se removió el endotelio y se fijaron en ganchos de acero inoxidable al fondo de una cámara para órgano aislado y a un transductor de tensión isométrica, conectado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems, Inc., U.S.A.), en donde se registró la tensión desarrollada por los anillos. Las arterias se sumergieron en solución Krebs con la siguiente composición (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.2; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0; dextrosa, 11.7 y EDTA, 0.026 y a pH de 7.4, a temperatura de 37°C y burbujeadas continuamente con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5). Los anillos arteriales se sometieron a una tensión inicial de 3 g (aorta) y 2 g (caudal), además se pre-estimularon 3 veces con fenilefrina (agonista  $\alpha_1$  adrenérgico) a concentración sub-máxima que produce 80% del E<sub>max</sub>, para sensibilizar a los vasos. Se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina, en anillos de aorta torácica y caudal, y en presencia de rauwolscina y propranolol ( $1 \times 10^{-7}$  M, cada uno), para antagonizar a los  $\alpha_2$ -AR y  $\beta$ -AR, respectivamente.

### **5.7 Estudio histológico de las arterias aorta y caudal de ratas control y tratadas**

Después de sacrificar las ratas, las arterias aorta torácica y caudal se disecaron y se limpiaron de tejido conectivo y graso, se cortaron en anillos de 4-5 mm de longitud, se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Los anillos de aorta se incluyeron en parafina, se cortaron (5  $\mu$ m de espesor) y se montaron en portaobjetos recubiertos de Poli-L-Lisina (1:10) (Sigma-Aldrich Co. EUA). Los cortes se desparafinaron y rehidrataron en alcoholes graduados y agua destilada, y se tiñeron por tricrómica de Masson (Hematoxilina-Eosina) (Luna, 1968). Las laminillas se analizaron en un microscopio Carl Zeiss (Modelo LSM 5 Pascal, Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes se capturaron y analizaron con el software KS-300 versión 3.0 (Carl Zeiss).

### **5.8 Análisis de resultados**

Los datos de todos los modelos utilizados representan la media  $\pm$  error estándar. En los experimentos *in vitro*, los valores promedio representan la contracción de 4 a 6 anillos de arterias diferentes de los grupos de ratas. Se empleó un software estadístico (Sigma Plot versión 11.0) para construir las graficas y realizar el análisis estadístico. En estos estudios de desplazamiento, los resultados son expresados en contracción (g) de la respuesta máxima inducida por el agonista adrenérgico. Para determinar las diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos o entre tratamientos con antagonistas, se realizaron análisis de varianza de 2 vías, seguido de la prueba de Tukey para el

análisis de significancia y se consideraron como estadísticamente significativos los datos con una  $P \leq 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1 Efecto del procedimiento quirúrgico sobre la presión arterial sistólica

Las ratas fueron sometidas a cirugía falsa (sham) mientras que en otro grupo no se realizó ningún procedimiento. Por pletismografía se registró el pulso sistólico de la presión en la arteria caudal de las ratas. En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos a partir de mediciones de la presión arterial tanto en ratas controles como en ratas sham. Se puede observar que en ambos grupos la presión arterial sistólica registró valores menores a 120 mmHg; asimismo, se puede apreciar que el procedimiento quirúrgico no tuvo ningún efecto.

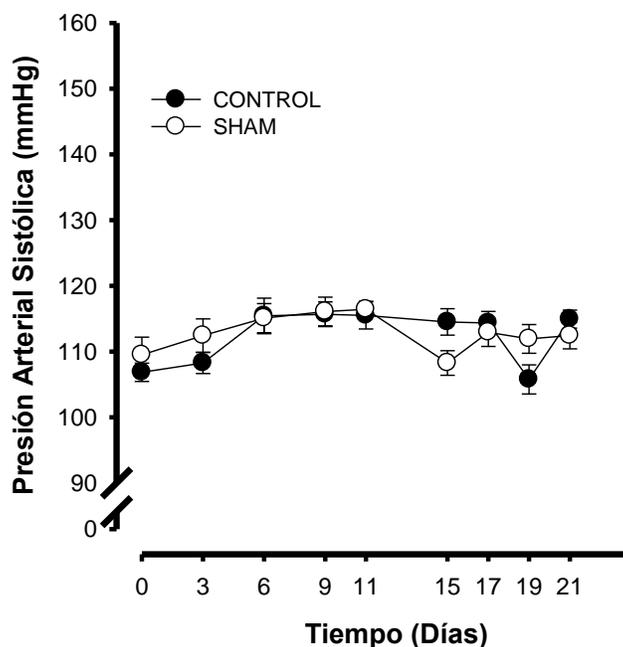


Figura 6. Efecto del procedimiento quirúrgico en la presión arterial. Las ratas fueron sometidas a una cirugía y se registró la presión arterial sistólica en mm Hg en función del tiempo en ratas control y sham (cirugía).

### **6.2 Efecto del procedimiento quirúrgico sobre la reactividad vascular**

Las ratas control y sham, a las cuales se les registró la presión arterial, se sacrificaron y se extrajeron las arterias aorta y caudal, para construir curvas dosis-respuesta a fenilefrina. Se puede observar que la respuesta a fenilefrina en aorta de las ratas control y sham es similar, lo que indica que el procedimiento quirúrgico no modifica la reactividad vascular de la arteria (Fig. 7A).

Asimismo, se aprecia que la respuesta a la fenilefrina es similar en la arteria caudal de ambos grupos de ratas y que no se modificó la reactividad de esta arteria con el procedimiento (Fig. 7B). Posteriormente se evaluó la maquinaria contráctil de las arterias, mediante la contracción por despolarización con KCl 80 mM. Se observa que no hay diferencia en la respuesta contráctil de la aorta en ninguno de los dos grupos (Fig. 7C).

De manera similar, en la arteria caudal no hay diferencia en la respuesta contráctil de ninguno de los grupos (Fig. 7D), por lo que el procedimiento quirúrgico no causó ninguna modificación en la reactividad vascular de la aorta y la caudal.

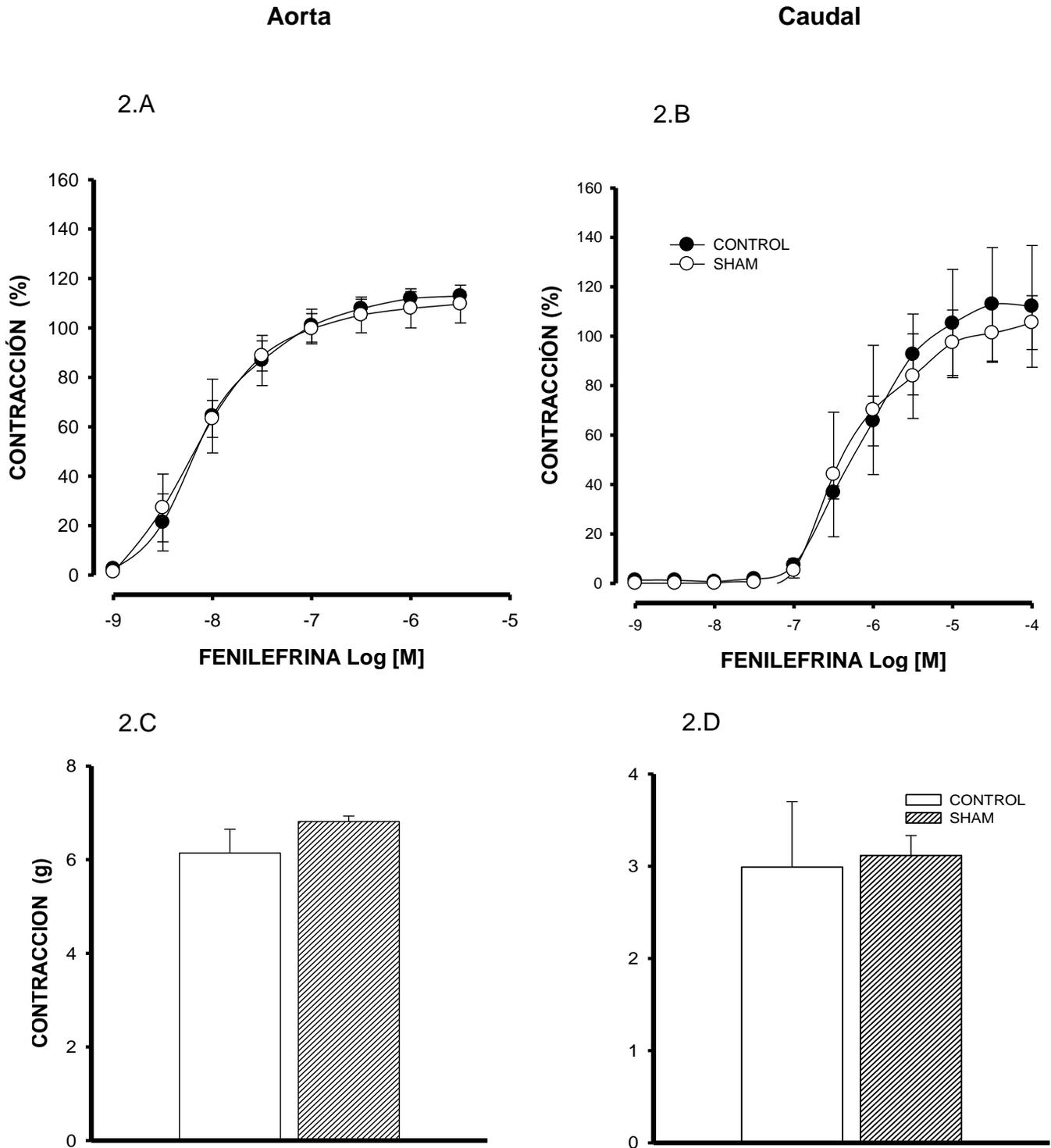


Figura 7. Efecto del procedimiento quirúrgico en la respuesta contráctil. Las ratas fueron sometidas a una cirugía (sham) y sin cirugía (control), se obtuvieron anillos de las arterias aorta y caudal. Paneles 7A y 7B muestran la curva dosis respuesta a fenilefrina; paneles 2C y 2D, la contracción a KCl 80 mM.

### 6.3 Efecto de la infusión continua de Ang II sobre la presión arterial sistólica

Los valores basales de presión arterial sistólica, en las ratas Wistar fueron: ratas control,  $113.6 \pm 1.5$  mmHg, ratas con Ang II,  $112.8 \pm 2.2$  mmHg; ratas con Ang II + BMY 7378,  $110.3 \pm 3.1$  mmHg; y ratas con Ang II con losartán,  $113.3 \pm 1.7$  mmHg. Los valores de presión arterial se incrementaron de manera dependiente del tiempo por acción de la Ang II, con aumento significativo a partir del cuarto día de la infusión continua de Ang II (200 ng/kg/min); además este efecto se mantuvo durante las 4 semanas de la infusión, con excepción del grupo Ang II con Losartán.

Se observa que la Ang II incrementó la presión arterial ( $112.8 \pm 2.15$  a  $220 \pm 8$  mmHg). Sin embargo, el losartán (antagonista  $AT_1$ -R), revirtió parcialmente la hipertensión por Ang II ( $142 \pm 2$  mmHg), mientras que el BMY 7378 (antagonista  $\alpha_{1D}$ -AR) no la revirtió ( $204 \pm 9$  mmHg) (Figura 8).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos control vs Ang II, vs Ang II con BMY 7378 o vs Ang II con Losartán (ANOVA 2 vías, Tukey  $P \leq 0.05$ ).

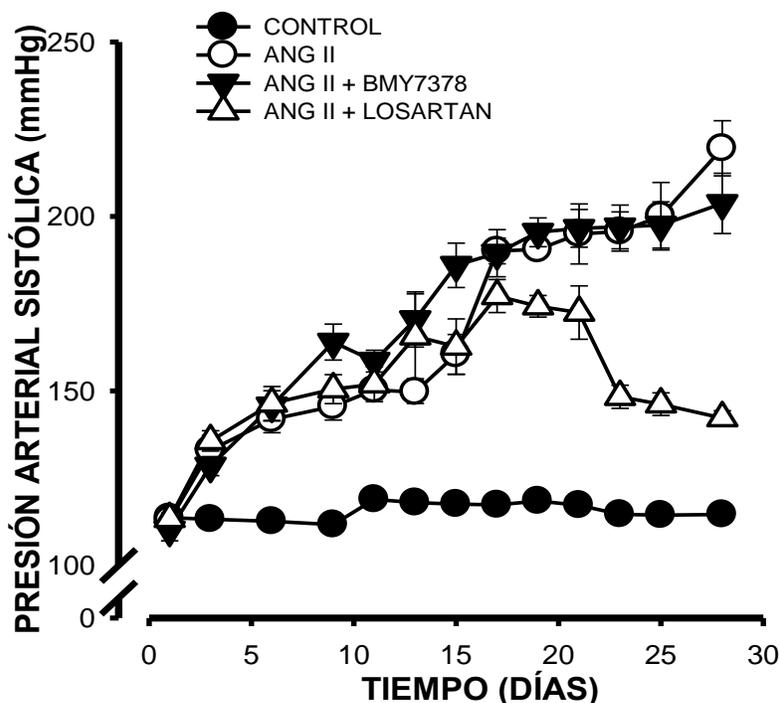


Figura 8. Curso temporal de la infusión continua con Ang II sobre la presión arterial sistólica en ratas control y en ratas con Ang II y tratamientos. Ratas control (●), tratadas con angiotensina II (○), angiotensina + losartán (△), angiotensina + BMY7378 (▼). Efecto de los antagonistas losartán (antagonista AT<sub>1</sub>-R) y BMY 7378 (antagonista α<sub>1D</sub>-AR) sobre el efecto presor de la Ang II. Los datos son el promedio de 5-6 ratas ± el error estándar.

#### 6.4 Efecto contráctil de los agonistas α<sub>1</sub>-adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas control y ratas tratadas con Ang II y tratamientos

Al terminar el tratamiento de cada condición experimental, se extrajo el segmento torácico de la aorta y el segmento de la caudal, y se cortaron en anillos de 4-5 mm de longitud para los ensayos funcionales de órgano aislado. Los anillos arteriales se sometieron a una tensión inicial de 3g (aorta), 2g (caudal) y se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina. Las curvas se

realizaron en presencia de rauwolscina ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) y propranolol ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ), antagonistas  $\alpha_2$ -AR y  $\beta$ -AR, respectivamente.

El análisis de la respuesta al agonista fenilefrina muestra que esta catecolamina provocó contracción, de manera dependiente de la concentración, en las arterias aorta y caudal de ratas control y tratadas con Ang II (Figura 9 y 10). Sin embargo, se observó que la sensibilidad a la fenilefrina fue diferente entre los grupos experimentales.

En la figura 9 se muestran las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina de la arteria aorta de los diferentes grupos experimentales.

Se observó que el grupo control tuvo una respuesta dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo; sin embargo, en el grupo de Ang II, se incrementó la respuesta contráctil a la fenilefrina con respecto al control, es decir hay hiperreactividad al agente adrenérgico. Pero en el grupo de Ang II con Losartán la respuesta es similar a la del grupo control, y de igual manera el grupo Ang II con BMY7378, presentó respuesta similar, lo cual indica que en los grupos con infusión de Ang II por 14 días y tratados durante 14 días más con los diferentes antagonistas, se presentan una clara reversión de la hiperreactividad causada por la Ang II.

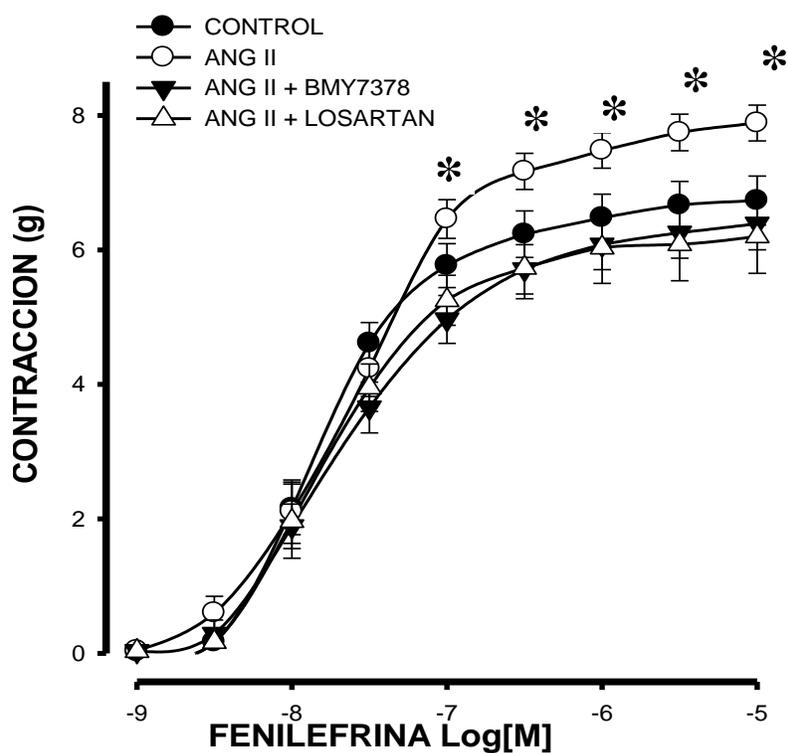


Figura 9. Efecto contráctil de los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos en arteria aorta de ratas control y tratadas. Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta de ratas control y tratadas con Ang II (200 ng/kg/min/28 días) y tratamiento con BMY7378 (10 mg/kg/día) o losartán (1 mg/kg/día). Los datos representan el valor promedio de 5 ratas  $\pm$  el error estándar. ANOVA 2 vías, \*  $P < 0.05$  Tukey vs. Control.

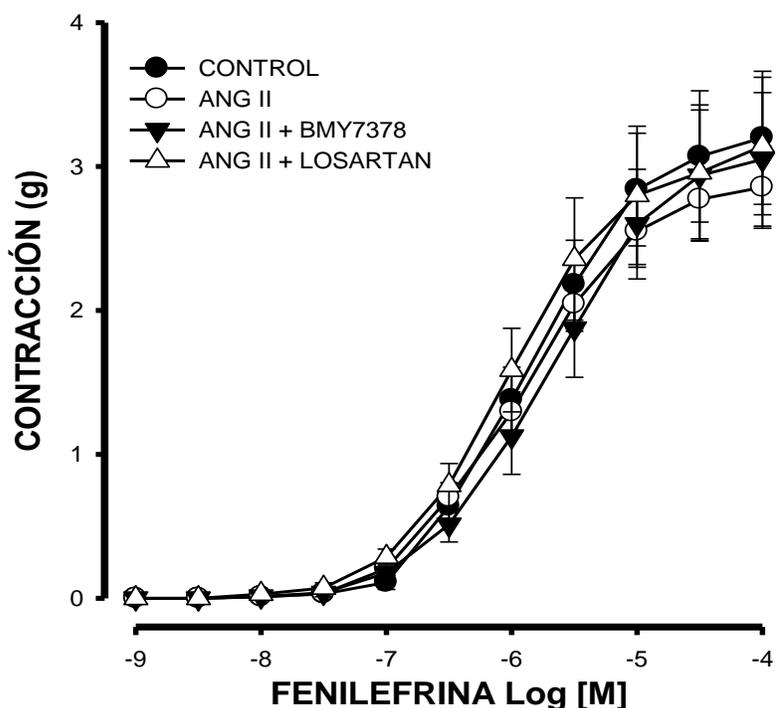


Figura 10. Efecto contráctil de los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos en arteria caudal de ratas control y tratadas. Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta de ratas control y tratadas con Ang II (200 ng/kg/min/28 días) y tratamiento con BMY7378 (10 mg/kg/día) o losartán (1 mg/kg/día). Los datos representan el valor promedio de 5 ratas  $\pm$  el error estándar.

## 6.5 Evaluación de la reactividad vascular durante la contracción producida con KCl 80 mM en las arterias aorta y caudal

El efecto de hiperreactividad vascular observado solo en la aorta de ratas tratadas con Ang II durante la contracción inducida por fenilefrina, se obtuvo también con la contracción producida con KCl 80mM (un agente despolarizante de la membrana que permite la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  e induce contracción independiente de receptores). Indica que este aumento en la reactividad no se debe a eventos a través de receptor, ya que la despolarización con KCl también

evidencia el aumento en la contracción máxima solo en la aorta de ratas tratadas con Ang II. Además, se aprecia que los tratamientos con losartán y BMY 7378, revirtieron la hiperreactividad vascular en aorta de ratas con Ang II con losartán, o Ang II con BMY 7378, a pesar de que el BMY 7378 no fue capaz de revertir la hipertensión producida por la Ang II (Figura 11A). Por otro lado, en la arteria caudal, no hubo cambios significativos en la contracción inducida por el KCl 80 mM, en ninguno de los grupos con Ang II, ni por la administración de los antagonistas losartán o BMY 7378 (Figura 11B).

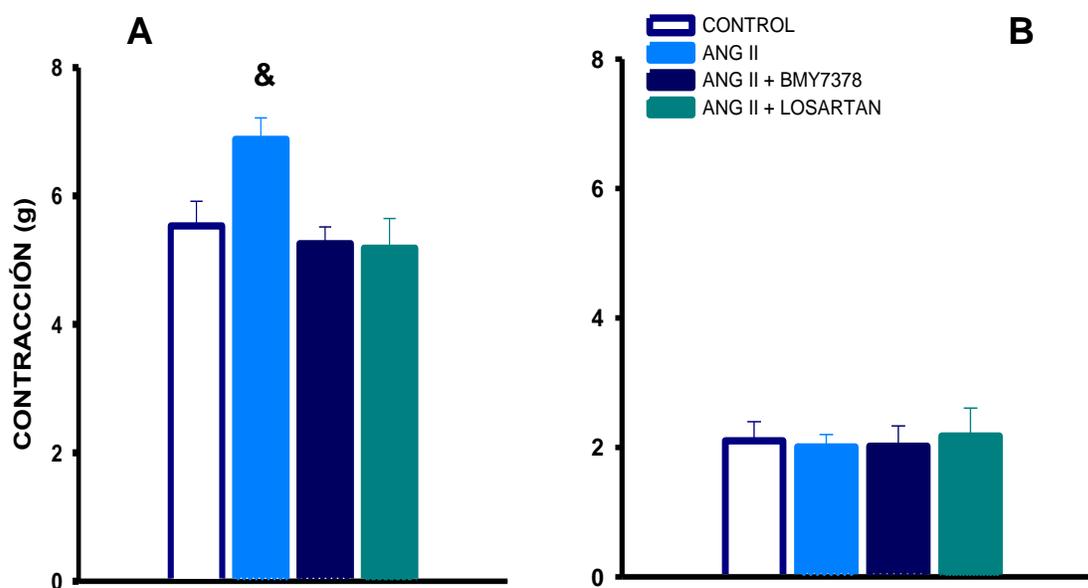


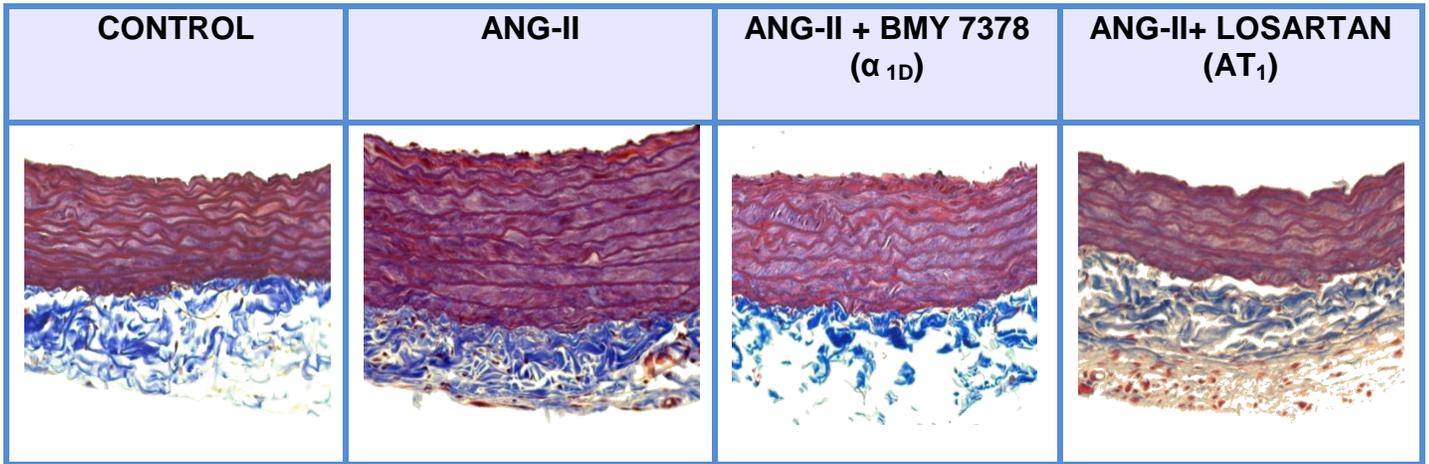
Figura 11. Evaluación de la función contráctil del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación inducida por KCl 80 mM en arterias aorta y caudal. Anillos de arterias aorta (panel A) y caudal (panel B), de ratas controles y tratadas con angiotensina II y con el tratamiento losartán y BMY7378. Los datos mostrados son el promedio de 5 ratas  $\pm$  el error estándar. ANOVA 2 vías, &  $P < 0.05$  Tukey vs. Control.

### 6.6 Análisis histológico de las arterias aorta torácica y caudal

Los datos mostrados en las arterias aorta y caudal en la contracción al agonista adrenérgico (fenilefrina), así como la respuesta contráctil al KCl, en la arteria aorta, muestran que la Ang II incrementa esta reactividad. Esto sugiere que en los lechos vasculares donde la contracción es mediada por el  $\alpha_{1D}$ -AR (aorta), el receptor está involucrado en la hiperreactividad observada.

Para lo cual hicimos cortes histológicos de las arterias aorta y caudal de los cuatro grupos experimentales (Control, Ang II, Ang II con BMY7378 y Ang II con Losartán). Se observó el aumento en la túnica media de la arteria, aunque este fenómeno solo se presentó en el grupo de Ang II. Sin embargo, algo muy interesante, es que los grupos Ang II con BMY7378 y Ang II con Losartán, en ambos el tratamiento se administró cuando la hipertrofia ya estaba establecida, y aun en presencia del estímulo de Ang II, se observó la reversión de la hipertrofia inducida por la Ang II (Figura 12). En cambio, en la arteria caudal de los diferentes grupos experimentales (Control, Ang II, Ang II con BMY7378 y Ang II con Losartán), no hubo ninguna diferencia en el grosor de la túnica media de la arteria (Figura 13), por lo cual se puede decir que en esta arteria no hubo efecto hipertrófico por la Ang II, ya que es un lecho vascular en el que predomina el  $\alpha_{1A}$ -AR, y éste no se asocia con la hipertrofia.

A



B

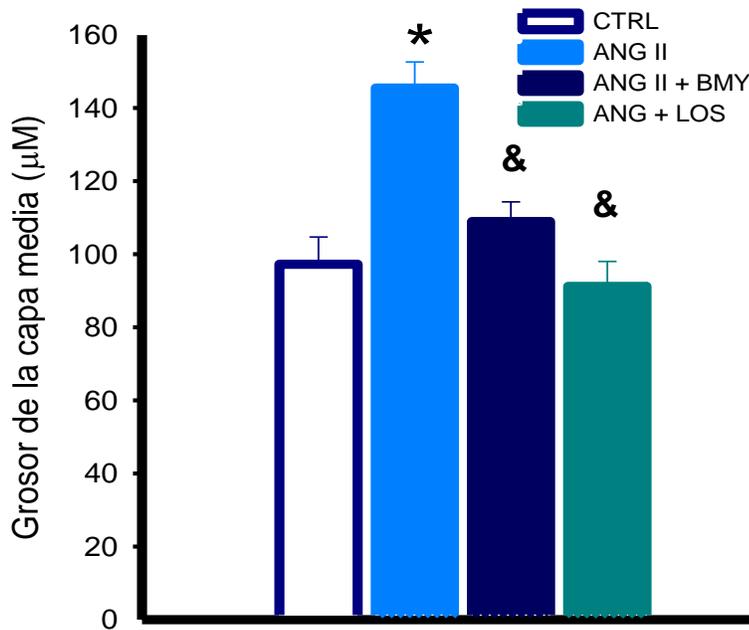
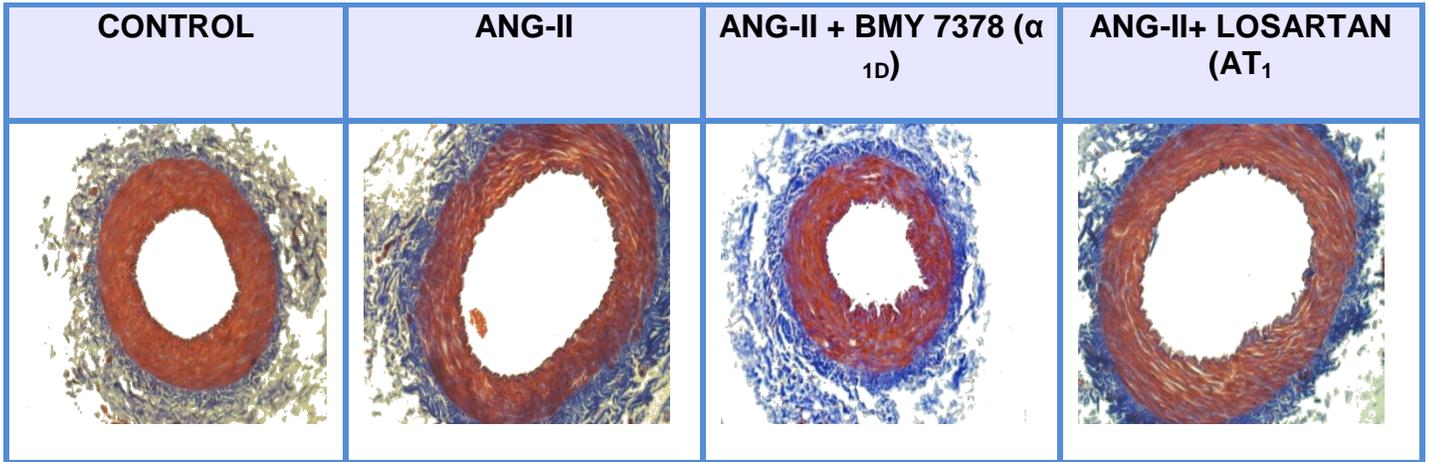


Figura 12. Análisis histológico de la aorta torácica. Análisis de ratas control y tratadas con angiotensina II, angiotensina II y los diferentes tratamientos. A) Sección de arterias de 4 ratas para cada grupo (Control, Ang II, Ang II + Losartán y Ang II + BMY7378), teñidas por tinción tricromica de Masson. B) Las barras representan el valor promedio de la medición del grosor de la capa media  $\pm$  el error estándar. Anova; Tukey.  $P < 0.05$ , & vs. Ang II, \*vs. Control.

A



B

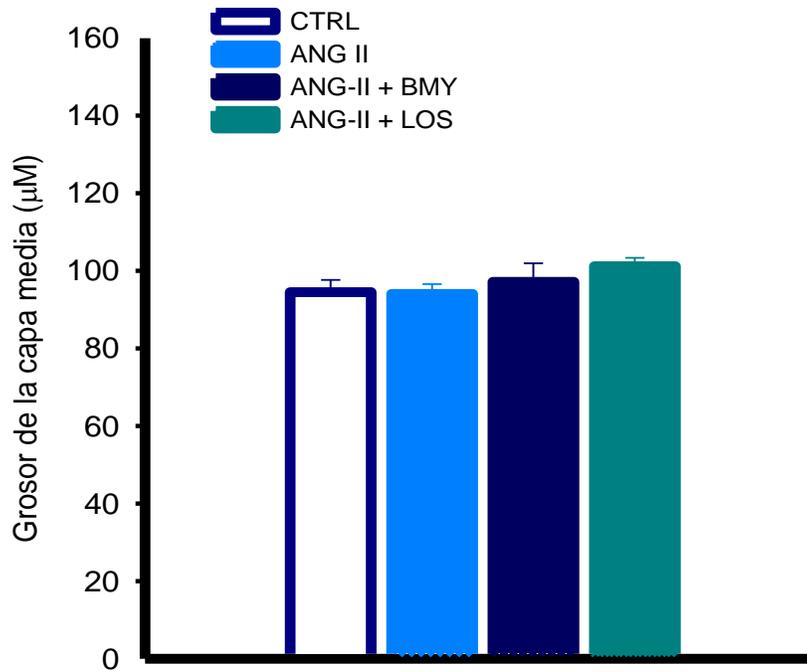


Figura 13. Análisis histológico de la arteria caudal. Análisis de ratas control y tratadas con angiotensina II, angiotensina II y los diferentes tratamientos. A) Sección de arterias de 4 ratas para cada grupo (Control, Ang II, Ang II + Losartán y Ang II + BMY7378), teñidas por tinción tricromica de Masson. B) Las barras representan el valor promedio de la medición del grosor de la capa media  $\pm$  el error estándar.

### 7. Discusión

Los hallazgos del presente trabajo muestran una comunicación entre el sistema renina-angiotensina (SRA) y los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos vasculares.

En primer lugar, se confirmó que la Ang II favorece el desarrollo de hipertensión arterial, que aumenta la hiperreactividad vascular y el desarrollo de hipertrofia, siendo estos efectos mediados por la activación de su receptor  $AT_1$  (Figuras 8,9 y 10).

En segundo lugar, la hiperreactividad fue observada únicamente en la arteria aorta de rata producida por la infusión continua de Ang II, la cual se revirtió con el tratamiento con BMY7378 (antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico) y con losartán (antagonista  $AT_1$ ), administrados cuando ya existe hiperreactividad en la arteria generada por 2 semanas de infusión con Ang II. Esto hace evidente la clara participación de estos dos receptores ( $\alpha_{1D}$ -adrenérgico y  $AT_1$ ) en el desarrollo de la hiperreactividad vascular, destacando que al bloquear los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos se revierte esta alteración vascular y sugiere la comunicación cruzada con el SRA.

Una tercera observación, fue que el bloqueo de los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos no afecta la presión arterial; es decir, el bloqueo de esos receptores no influyó en el incremento de la presión arterial producido por la Ang II. Sin embargo, los cambios vasculares y la hipertrofia, producidos por la infusión de Ang II, se revirtieron por completo con el tratamiento de BMY 7378 y aun cuando el antagonista se administró una vez establecida la hipertrofia y la hiperreactividad

vascular, y aún cuando el tratamiento se administró en conjunto con la infusión de Ang II; es decir, el BMY 7378 revirtió los cambios y al mismo tiempo evitó que estos siguieran ocurriendo.

Estos hallazgos hacen evidente la comunicación cruzada entre el sistema renina-angiotensina y los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos: este efecto, que se presenta en la arteria aorta, lecho vascular en la que predomina el receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico, nos permite sugerir que algo similar puede ocurrir en todas las arterias donde ese receptor predomina para la contracción.

La Ang II tiene un papel importante sobre la remodelación vascular durante la hipertensión (Touyz, 2000). El SRA ejerce sus efectos en la vasculatura al unirse y activar los receptores  $AT_1$ , los cuales se localizan en las tres capas del vaso sanguíneo. La activación del receptor  $AT_1$ , en las células de músculo liso vascular, conduce a la contracción muscular vía la generación de  $IP_3$  y la liberación de  $Ca^{+2}$ , este ión se une a la calmodulina para establecer la interacción de actina-miosina, dando así la contracción de las fibras musculares y como resultado la vasoconstricción (Touyz, 2005). En este sentido, nuestros datos muestran que la infusión continua con Ang II produce aumento en la presión arterial y de manera dependiente del tiempo. A partir del segundo día (Figura 8) de infusión se observan incrementos significativos en la presión arterial sistólica. Además, el receptor involucrado con el desarrollo de la hipertensión es el  $AT_1$ , pues el tratamiento con losartán disminuyó la presión arterial. Datos similares han sido reportados por otro grupo de trabajo (Daigle y col., 2004).

Sin embargo, algo importante que se observó fue que el tratamiento con BMY 7378, no revirtió el aumento de la presión arterial inducido por la infusión continua de Ang II. Este compuesto ha sido descrito como antihipertensivo; es un antagonista selectivo de los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos. Algunos trabajos muestran que aunque se usó una dosis del doble en un experimento agudo sobre ratas SHR y no se descarta su acción como agonista de los receptores centrales  $5HT_{1A}$  que modulan la presión arterial (Villalobos-Molina e Ibarra, 1999).

Adicionalmente, se han reportado datos similares donde el cotratamiento con prazosina (antagonista selectivo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), no disminuyó el aumento de la presión arterial inducida por la infusión de Ang II (Van Kleef y col., 1992).

Con la finalidad de investigar el efecto que ejerce la Ang II en la vasculatura, en cuanto a la sensibilidad al agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina se realizaron estudios funcionales *in vitro*, en las arterias aorta y caudal de ratas. Es importante hacer notar que en el presente estudio se eliminó la participación del endotelio vascular, y que se bloquearon los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y  $\alpha_2$ -adrenérgicos, con la finalidad de determinar el efecto de la Ang II sobre la contracción producida por la estimulación  $\alpha_1$ -adrenergica, a nivel vascular.

Los datos obtenidos muestran que la contracción inducida por la fenilefrina en la arteria aorta, generó hiperreactividad en el grupo tratado con Ang II ( $E_{max}$   $7.89 \pm 0.27$  g) y, sorprendentemente, en los grupos que fueron tratados con losartán y BMY 7378, aun cuando el tratamiento se administró ya establecida la

hipertensión, de manera similar a los hallazgos de Gallardo-Ortiz (2011), se sabía previamente que existía hiperreactividad a los 14 días de infusión continua con Ang II, y esta hiperreactividad fue revertida completamente con los dos tratamientos, losartán ( $E_{\max}$  6.20±0.55 g) y el BMY 7378 ( $E_{\max}$  6.39±0.39 g), al compararlo con el control ( $E_{\max}$  6.67±0.35 g). Este efecto solo fue observado en la arteria aorta. En cambio, en la arteria caudal no se observó esta hiperreactividad en ninguno de los grupos: control ( $E_{\max}$  3.07 ±0.46 g), Ang II ( $E_{\max}$  2.86±0.28 g), Ang II + losartán ( $E_{\max}$  2.96±0.47 g), Ang II + BMY7378 ( $E_{\max}$  2.94±0.46 g); por lo tanto, la Ang II no causó ninguna modificación en la respuesta contráctil en este lecho vascular.

Estos datos confirman que la diversidad de la respuesta fisiológica, por la estimulación de agonistas adrenérgicos, es un proceso que se ve diferenciado justo por la expresión diferencial de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos conocidos, que se encuentran funcionalmente distribuidos en la variedad de arterias.

Por otro lado, se ha reportado que uno o dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos parecen expresarse y predominar en el músculo liso vascular, mediando la contracción a agentes adrenérgicos; lo anterior se ha propuesto por resultados con el uso de ligandos radiactivos, anticuerpos específicos contra los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y estudios funcionales (Piascik y col., 1994; Piascik y col., 1997; Villalobos-Molina y col., 1997). En este sentido, se ha reportado que la aorta de rata adulta expresa funcionalmente el receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico, en la arteria

mesentérica expresa una mezcla de los receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$  y la arteria caudal expresa el  $\alpha_{1A}$  (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996).

De manera que si en nuestros datos la sensibilidad a la fenilefrina se ve aumentada en la respuesta contráctil en la arteria aorta y solo en el grupo de Ang II, ésta parece estar mediada por los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos, se puede decir que la Ang II favorece la expresión en el número de receptores  $\alpha_{1D}$  -adrenérgicos lo que aumenta la hiperreactividad vascular. En este sentido se reportó también que el tratamiento con captopril, un inhibidor de la ECA del SRA, disminuyó la expresión del receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico, además de que este receptor se encuentra en mayor cantidad respecto a los otros dos, en la arteria aorta de ratas SHR ( Godínez-Hernández y col., 2006).

Sin embargo, para determinar si el aumento en el efecto contráctil, es decir, la reactividad vascular en la arteria aorta producido por la Ang II, es un efecto mediado por receptores, se llevaron a cabo experimentos de contracción a KCl (80 mM), lo que permite ver la respuesta de la maquinaria contráctil del vaso, independiente de receptor, debido a que la alta concentración de  $K^+$  en las células de músculo liso inducen despolarización de la membrana, lo cual da lugar a la activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, produciendo así la contracción del vaso (Rang y Dale., 2008).

Se observó en nuestros datos que el KCl en aorta de rata con infusión continua de Ang II, incrementó la contracción, y también se observó cuando se indujo la contracción por estimulación de receptores. En estos mismos

experimentos, los tratamientos con losartán y con BMY 7378, revirtieron la hiperreactividad en las ratas tratadas con Ang II, al provocar la contracción con KCl (80 mM) en la aortas, que fue similar a la del grupo control. Pero no es sorprendente ver esto en las ratas tratadas con losartán, pues el antagonista revierte la hiperreactividad en la arteria aorta, debido a la alta afinidad del compuesto por el receptor  $AT_1$  (García-Sáinz y col., 1997). Este efecto solo se observó en la arteria aorta, ya que en la arteria caudal no hay ninguna diferencia en la contracción inducida por KCl, de la misma manera que cuando se indujo por la estimulación de receptores.

Es importante destacar que en esta arteria predomina el receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico, a nivel de RNAm, aunque también se encuentran los otros dos receptores. Los tres receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se encuentran en la arteria caudal: 61.7% para el receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico, 27.2% para el receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico y 11.1% para el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Martí y col., 2005); sin embargo, aunque el receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico está presente en la arteria, parece no ser funcional, así como también se reportó que este receptor no participa en la hipertensión arterial inducida por la Ang II (Sparks y col., 2011).

En el presente estudio observó que la infusión continua de Ang II conduce a cambios estructurales en la vasculatura, y se ha reportado que la Ang II induce el crecimiento de la pared vascular, aumentando la relación media/lumen (Touyz, 2005). Además, la aparición de hipertrofia en arteria femoral en ratas (arteria con el receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico) con Ang II se reportó anteriormente (Brede y col., 2001). Sin embargo, en este estudio mostramos los cambios estructurales

producidos por la infusión de Ang II, observando que los cambios vasculares son diferenciales, pues no se desarrollan de manera generalizada en todos los vasos del mismo animal; por ejemplo, la arteria caudal no desarrolló hipertrofia a pesar de que las ratas se hicieron hipertensas y presentaron hipertrofia en la arteria aorta.

De manera muy interesante se observa, por análisis histológico de las arterias, que los antagonistas losartán y el BMY 7378 revirtieron la hipertrofia vascular producida por la Ang II en la arteria aorta, sin producir cambios estructurales en la arteria caudal de los mismos animales. Estos resultados demuestran que en este modelo, la Ang II, a través de su receptor AT<sub>1</sub>, inicia los eventos que llevan al desarrollo de la remodelación vascular; esto no es sorprendente pues no solo es el efecto contráctil en músculo liso, sino que la Ang II promueve diversos procesos a nivel cardiovascular (Touyz, 2005; Hunyady y Catt, 2006). Se conoce que la Ang II influye en la integridad de la pared vascular, por modulación del crecimiento de las células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos (Schiffrin y col., 1984).

La Ang II induce también el crecimiento celular, la migración y la diferenciación celular (Touyz, 2000). Se describe como un agente pro-inflamatorio, debido a la estimulación de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión, a través de factores de transcripción nuclear como: NFκB, AP-1 y Ref-1 (Touyz, 2005); estimula la generación de especies reactivas de oxígeno relacionadas con la inflamación, disfunción endotelial y remodelación vascular (Ohtsu y col., 2006). Asimismo, la Ang II activa a la proteína Cdc42, la cual regula la formación de

filopodios en la reorganización del citoesqueleto de actina. Los filopodios participan en la motilidad celular, la Ang II activa a la proteína al unirse a su receptor AT<sub>1</sub>, lo cual conlleva a migración celular (Bilsen, 1997).

La hipertrofia que se observa claramente en la arteria aorta de ratas tratadas con Ang II, vía la estimulación del receptor AT<sub>1</sub>, da lugar a la activación de otras cascadas de señalización que promueven la síntesis de proteínas. Se ha reportado que la Ang II estimula el crecimiento vía la fosforilación de la tirosina cinasa, la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos, la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la producción de las especies reactivas de oxígeno. Se conoce también que en células de músculo liso vascular induce la fosforilación de múltiples tirosina cinasas (Touyz, 2000). Asimismo, Wang y colaboradores reportaron que la señalización del receptor AT<sub>1</sub> induce la transcripción, translocación y activación de metaloproteasas de la matriz tipo II, así como la activación de TGF-β1 y la deposición de colágeno que conducen al engrosamiento de las tunicas media e íntima en la arteria carótida (Chen y Minneman, 2005; Wang y col., 2005).

En el análisis histológico del presente trabajo, el resultado más importante fue observar que el BMY 7378 fue capaz de revertir el proceso de hipertrofia vascular en la arteria aorta de rata con infusión continua de Ang II, y teniendo en cuenta que aún y cuando se continuó con el estímulo del péptido, el antagonista fue capaz de revertir la hipertrofia y al mismo tiempo evitarla, a pesar de que la dosis utilizada de este fármaco no revirtió la hipertensión. Estos resultados

sugieren que al menos en el proceso de remodelación vascular, hay una participación indirecta del receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico.

Sin embargo, desde hace tiempo se ha sugerido que parte de los efectos tróficos de la Ang II pueden ser reforzados por activación del sistema nervioso simpático. En este sentido, Parenti y colaboradores encontraron que los agentes vasoactivos Ang II y norepinefrina son mitógenos endógenos, involucrados en la remodelación vascular; experimentos en células de músculo liso vascular muestran que la Ang II potencia el efecto mitógeno de la norepinefrina (Parenti y col., 2001). En este mismo sentido, en cultivo de células de músculo liso vascular, la norepinefrina y la fenilefrina inducen efectos mitógenos asociados con la estimulación de la proteína cinasa, con acumulación de protooncogenes como *c-fos*, *c-jun* y *c-myc* (Yu y col., 1996).

En experimentos en células de músculo liso vascular de aorta de rata adulta, demostraron que el crecimiento inducido por la norepinefrina es mediado por los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos, que están acoplados a la activación de la cascada de la proteína cinasa C, la cual conduce al aumento en la síntesis de proteínas (Xin y col., 1997; Li y col., 2004).

Así, nuestros datos permiten sugerir que la hipertrofia vascular producida por la Ang II en la arteria aorta, puede ser mediada en gran parte por la activación nerviosa simpática o bien por alguna otra vía que promueva la activación de los receptores adrenérgicos, específicamente el  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico, los cuales participan en el desarrollo de hipertrofia. Es decir, estos datos evidencian una

clara interacción entre el SRA y los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos. Datos similares habían sido reportados por otros autores (Van Kleef y col., 1992), donde la infusión con Ang II producía un aumento en la síntesis de ADN, al medir la incorporación de timidina marcada radiactivamente. Además, la prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) evitó el efecto mitógeno de la Ang II, sin modificar el desarrollo de hipertensión.

Con esta información se puede sugerir que la hipertrofia observada en la arteria aorta de ratas tratadas con Ang II es resultado de los efectos pleiotrópicos que produce este péptido en las capas que conforman a las arterias. Sin embargo, algo muy importante llama la atención: la reversión de la hipertrofia con el tratamiento tanto de losartán como con el de BMY 7378, efecto que solo se visualiza en la arteria aorta, debido a que en la caudal no hubo hipertrofia. Para poder explicar este fenómeno, por lo menos en parte, es importante considerar que en la arteria aorta el receptor que se encuentra en mayor proporción es el  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico, así como también se conoce que éste es responsable de la contracción a estímulos adrenérgicos, mientras que en la arteria caudal el receptor que predomina en la contracción es el  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico.

Los datos de este trabajo sugieren que la hipertrofia vascular producida por la Ang II en la arteria aorta puede ser mediada por la activación nerviosa simpática o por alguna otra vía que active los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos. Además el tratamiento con losartán (antagonista  $AT_1$ ) o con BMY 7378 (antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico) revirtieron el proceso de hipertrofia y la reactividad vascular producidas por la Ang II, lo cual es muy importante pues aun cuando ya se

encontraba establecida la hipertrofia e hiperreactividad vascular, ésta fue susceptible de revertirse con el tratamiento.

Una posible explicación es que, al antagonizar alguno de los sistemas el otro deje de ejercer sus efectos tróficos. Esta reversión de la hipertrofia podría considerarse como atrofia muscular, la cual podría presentarse debido a que el estímulo deja de ejercer su efecto así como que la hipertrofia es debida al aumento en la síntesis de proteínas, y se puede activar alguna vía de degradación de proteínas. Un mecanismo hipotético para dicho efecto podría ser la ubiquitinización (Dinh y Touyz, 2011).

### 8. Resumen de resultados

1. La Ang II incrementó de manera sostenida la presión arterial
2. La hipertensión inducida por Ang II está mediada por los AT<sub>1</sub>R, este efecto puede ser disociado por la administración del losartán.
3. El efecto máximo ( $E_{max}$ ) en respuesta a fenilefrina y la contracción a KCl (80 mM), son eventos que solo se incrementaron en la arteria aorta y no en la arteria caudal de ratas tratadas con Ang II.
4. Los tratamientos con losartán o BMY 7378 revirtieron la hiperreactividad vascular en la arteria aorta.
5. Los tratamientos con losartán o BMY 7378 revirtieron la hipertrofia vascular causada por la angiotensina II en la arteria aorta.
6. Se confirma una comunicación cruzada entre la Ang II y los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos vasculares.

### 9. Conclusión

El antagonismo del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  y  $AT_1$  revierte la hiperreactividad vascular así como la hipertrofia causada por la angiotensina II.

### 10. Perspectivas

En el presente trabajo se hace evidente la interacción del SRA con los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos; sin embargo, sería interesante identificar la vía de señalización de Ang II asociada con los fenómenos de hipertrofia e hiperreactividad vascular, y su relación con los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos en células aisladas de aortas de ratas Wistar, así como identificar si se alteran las posibles proteínas de señalización involucradas en la hipertrofia celular, como son Akt, S6K-1, 4EBP1 y MAPK.

Por otro lado, en ratas tratadas con Ang II se podría analizar de manera más específica el incremento en la síntesis de proteínas, así como determinar cuál es la posible vía involucrada en la reversibilidad del proceso hipertrófico producido por la Ang II.

### 11. Bibliografía

Baker KM, Booz GW, Dostal DE. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 54: 227-241.

Bell L and Madri JA. (1990). Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol.* 137: 7-12.

Bilsen VM, (1997). Signal transduction revisited: recent developments in angiotensin II signaling in the cardiovascular system. *Cardiovascular Res.* 36: 310-322.

Bracho -Valdés I, Godínez-Hernández D, Arroyo -Vicelis B, Bobadila-Lugo RA, López-Sánchez P. (2009). Increased alpha-1 adrenoreceptor expression in pregnant rats with subrenal aortic coarctation. *J Hypert.* 28: 402-416.

Brede M, Hadamek K, Meinel L, Wiesmann F, Peters J, Engelhardt S, Simm A, Haase A, Lohse MJ. Vascular hypertrophy and increased P70S6 kinase in mice lacking the angiotensin II AT 2 Receptor. (2001). *Circulation* 104:2602-2607

Brokk RD, Julius S. (2000). Autonomic imbalance, Hypertension and cardiovascular risk. *Am J Hyper.* 13: 112S-122S.

Chen L, Xin X, Eckhart AD, Yang N, Faber JE. (1995). Regulation of vascular smooth muscle growth by alpha 1-adrenoreceptor subtypes in vitro and in situ. *J Biol Chem* 270: 30980-30988.

Chen ZJ, Minneman KP. (2005). Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacol Sin* 26:1281-1287.

Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. (1994). Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res.* 74: 727-739.

Daemen MJMP, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. (1991). Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ. Res.* 68:450-456.

Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P. (2004). Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord.* 4: 6-10.

Danser AH. (1996). Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem.* 157:211-216.

Dinh NA, Touyz RM. (2011). Cell Signaling of Angiotensin II on Vascular Tone: Novel Mechanisms. *Curr Hypertens*. 13:122-128.

Dubey RK, Jackson EK., Luscher TF. (1995). Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell: Role of cyclic nucleotides and angiotensin<sub>1</sub> receptors. *J Clin Invest*. 96: 141-149.

Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB. (1997). Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 6:88-105.

Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. (2001). Activation of MAPKs by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol* .11 :7957-7962.

Engberding N and Griendling KK. (2008). Angiotensin II signaling in vascular physiology and pathophysiology. *Advances in biochemistry in health and disease. Signal Transduction in the Cardiovascular System in Health and Disease*. Springer, 89-113.

Escobar E, Rodríguez TS, Arrieta O, Sotelo J. (2004). Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr Vasc Pharmacol*. 2: 1-15.

Finch A, Graham R. (2006). The  $\alpha_{1D}$ -Adrenergic Receptor: Cinderella or Ugly Stepsister. *Mol Pharmacol*. 69: 1-4.

Gallardo-Ortiz IA. (2011). Comunicación cruzada (cross talk) entre receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y el sistema renina angiotensina en el músculo liso vascular. En *Departamento de Farmacología*. CINVESTAV, México, Tesis Doctoral.

García-Sáinz JA, Martínez-Alfaro M, Romero-Avila MT, González-Espinosa C. (1997). Characterization of the AT1 angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver. *J Endocrinol* .154:133-138.

García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R. (1999). Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 30, 449-458.

García-Sáinz JA, Vázquez-Cuevas FG, Romero-Avila MT. (2001). Phosphorylation and desensitization of alpha 1d-adrenergic receptors. *J Biochem*. 353: 603-610.

García-Sáinz JA, Villalobos-Molina R. (2004). The elusive  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *Eur J Pharm*. 500: 113-120.

Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, 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 MA, Ivorra MD, Anselmi E, D'Ocon P. (2002). Pathological role of a constitutively active population of alpha (1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol* .135: 206-216.

Godínez-Hernández D, Gallardo-Ortiz IA, Lopez-Sanchez 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.

Goodman & Gilman. (2007). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Mc Graw Hill Interamericana. p. 789-819.

González-Hernández ML, Godínez-Hernández D, Bobadilla-Lugo RA, López-Sánchez P. (2010). Angiotensin-II type 1 receptor (ATR) and alpha-1D adrenoceptor form a heterodimer during pregnancy-induced hypertension. *Auton Autacoid Pharmacol*.30:167-172.

Guimaraes S, Moura D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* .53: 319-356.

Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.

Guyton AC, Hall JE. (2000). Tratado de Fisiología Médica. Décima edición. Mc Graw Hill Interamericana.p. 175,-183,223-234, 235-250.

Grassi G. (1998). Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hyper*. 16: 1979-1987.

Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. (1996). Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 36:281-306.

Hague C, Lee SE, Chen Z, Prinster SC, Hall RA, Minneman K. (2006). Heterodimers of  $\alpha$ -<sub>1D</sub>-adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol Pharmacol*. 69: 45-55.

Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* .145: 927-932

Hall RA, Lefkowitz RJ. (2002). Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res* .91:672-680.

.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 :H1006-1014.

Hunyady L, Catt KJ. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molec Endocrinol* .20 :953-970.

Ibarra M, Pardo JP, López JJ, Villalobos-Molina R. (2000). Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors in contraction. *J Pharmacol* .129: 653-660.

Iermoli Roberto H. (2001). Bases fisiológicas de la práctica médica; El órgano endotelial. 13ra; Editorial Médica Panamericana. p.54-62.

Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE., Gibbons GH, Dzau VJ. (1993). Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 91: 2268-2274.

Izzo JL SD, Black HR. (2008). *Hypertension Primer: The essential of high blood pressure*. American Heart Association, Lippicott Williams & Wilkins, Dallas, Texas, USA.

Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson L and Loscalzo J. (2006). *Harrison Principios de Medicina Interna*. Cuarta edición, editorial Mac Graw-Hill. p.324-589.

Kumar R, Baker KM, Pan J. (2000). Cardiac and Vascular Renin-Angiotensin Systems. Contemporary Endocrinology: *Hypertension and Hormone Mechanisms*. Editorial R.M.Carey . Human Press Inc. p.23-41.

Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1998). Chimeric alpha2-, beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*. 240: 1310-6.

Lemarié CA, Paradis P, Schiffrin EL. (2008). New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone. *J Mol Med*. 82: 673-678.

Lévy BI. (2004). Can Angiotensin II Type “ Receptors Have Deleterious Effects in Cardiovascular Disease?: Implications for Therapeutic Blockade of the Renin-Angiotensin System. *J Circulation*. 109: 8-13.

Li N, Wu K, Wang X, Xie L, Xu CS, Wang H. (2004). Angiotensin II stimulates phosphorylation of 4E-binding protein 1 and p70 S6 kinase in cultured vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Scie*. 5: 593-596.

Lyssand JS, DeFino MC, Tang X, Hertz AL, Faller DB, Wacker JL, Adam ME, Hague C. (2008). Blood pressure is regulated by an  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor/dystrophin signalsome. *J Biol Chem*. 27: 18792-18800.

Marín, J. (1993). Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol*. 13: 127-176.

Mark AL. (1996). The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens*. 5: S159-65.

Marti D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, Barettino D, D'Ocon P. (2005). Correlation between mRNA levels and functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of alpha1L as a functional isoform of the alpha1A-adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* .289:H1923-1932.

Mehta PK, Griendling KK. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* .292: C82-97.

Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, Malik KU. (2009). Angiotensin II-Induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Pharmacol Exp Ther*. 332: 116-124.

Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension*.28: 505-506.

Mulvany MJ. (2008). Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput* .46: 461-467.

Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima D , Frank G., Motley E , Eguchi E. (2006). Angiotensin II signals transduction through small GTP-Binding proteins. *Hypertension* .48: 534-540.

Ostrom RS, Naugle JE, Hase M.(2003). Angiotensin II enhances adenylyl cyclase signaling via  $Ca^{++}$ / calmodulin:  $G_q$ - $G_s$  cross-talk regulates collagen production in cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* 278: 24461-24468.

Parenti A, Brogelli L, Donnini S, Ziche M, Ledda F. (2001). Ang II potentiates mitogenic effect of norepinephrine in vascular muscle cells: role of FGF-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H99-H107.

Phillipp M, Brede M, Hein L. (2002). Physiological significance of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul.* 283: R287-R295.

Piascik MT, Smith MS, Soltis EE, Pérez DM. (1994). Identification of the mRNA for the novel alpha 1D-adrenoceptor and two other alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 46:30-40.

Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW, Brown RD. (1997). 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.* 283:854-868.

Quesada T, Carbonell LF. (1999). Regulación de la presión arterial. En: Tresguerres JAF et al. *Fisiología Humana*, segunda ed. Madrid. Mc Graw Hill Interamericana.p.579-589.

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. y Flower R. J. (2008). Farmacología. Sexta edición. Editorial *El Sevier*. p.298-316.

Saino A, Pomidossi G, Perondi R. (1997). Intracoronary angiotensin II potentiates coronary sympathetic vasoconstriction in humans. *Circulation.* 96:148-153.

Saxena PR. (1992). Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6: S80-88.

Schiffirin EL, Thome FS, Genest J. (1984). Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension.* 6: 682-688.

Schiffirin EL, Touyz RM. (2004). From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287: H435-446.

Scofield MA, Liu F, Abel PW, Jeffries WB. (1995). Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther* .275:1035-1042.

Scott-Burden T, Hahn AW, Resink TJ, Böhler FR.(1990).Modulation of extracellular matrix by angiotensina II: Stimulated glycoconjugate synthesis and growth in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*.4: S36-S41.

Shanmugam S, Corvol P, Gasc JM. (1996). Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension*. 28:97-107.

Sparks MA, Parsons KK, Stegbauer J, Gurley SB, Anuradha VG, Fortner C, Snouwaert J, Raasch E, Griffiths AJ, Le HT, Pennathur S, Koller B, Coffman T. (2011). Angiotensin II Type 1A Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells Do Not Influence Aortic Remodeling in Hypertension. *Hypertension*. 57:577-585.

Tanoune A, Nasa Y, Koshimizu T, Shiomura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tujimoto G.(2002).The  $\alpha_{1D}$ - adrenergic receptor directly regulates arterial pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest*. 109: 755-765.

Thomas WG, Qian H. (2003). Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends Endocrinol Metab* .14:130-136.

Touyz RM, Schiffrin EL. (2000).Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 52: 639-672.

Touyz RM. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* .90: 449-455.

Touyz RM. (2007). Vascular remodeling, retinal arteries, and hypertension. *Hypertension* .50: 603-604.

Van Kleef EM, Smits JF, De Mey JG, Cleutjens JP, Lombardi DM, Schwartz SM, Daemen MJ. (1992). Alpha 1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ Res* .70: 1122-1127.

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, López-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 R, Ibarra M. (1999). Vascular alpha 1D-adrenoceptors: are they related to hypertension? *Arch Med Res* .30: 347-352.

Waldrop BA, Mastalerz D, Piascik MT, Post GR.(2002)  $\alpha_{-1B}$  and  $\alpha_{-1D}$ -adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*. 300: 83-90.

Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G ,Lakatta EG. (2005). Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol* .167: 1429-1442

Watanabe T, Barker TA, Bradford CB. (2005). Angiotensin II and the Endothelium: Diverse Signals and Effects. *Hypertension*. 45:163-169.

Weir MR , Dzau VJ. (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* .12: 205S-213S.

Williams GB. (1994). *Medicina Interna Harrison*. Octava edición. Editorial Mac Graw-Hill.

Xin X, Yang N, Eckhart AD, Faber JE. (1997). Alpha1D-adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol Pharmacol* .51: 764-775.

Yu SM, Tsai SY, Guh JH, Ko FN, Teng CM, Ou JT. (1996). Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 94: 547–554.

Zhong H ,Minneman KP. (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* .375: 261-276.

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: H475-481.

Zimmerman JB, Robertson D, Jackson EK. (1987). Angiotenin II-noradrenergic interactions in renovascular hypertensive rats. *J Clinic Invest*. 80: 443-457.

