



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO  
BIOLÓGICAS**



**“PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Rho Y Rac EN LA REACTIVIDAD  
VASCULAR RENAL EN RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II DURANTE LA  
HIPERTENSIÓN”**

**TESIS**

Para obtener el grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

**Q.F.B. ANDREA MARTÍNEZ CRUZ**

Asesor:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA: SALVADOR MANZO AVALOS**

Co.-asesor:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA: MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**

**MORELIA MICHOACÁN; JUNIO 2015**

Este trabajo fue asesorado por el Dr. Salvador Manzo Avalos en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La parte experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular de la Unidad de Biomedicina de la Universidad Nacional Autónoma de México *campus* Iztacala bajo la asesoría del Dr. Maximiliano Ibarra Barajas.

Tesis apoyada por la Coordinación de Investigación Científica UMSNH (proyecto de investigación 2.37) y por los proyectos 102022 de CONACYT, IN221615 de PAPIIT, DGAPA, UNAM, y FESI-DIP-PAPCA-2014-37, FES-Iztacala, UNAM.

## A. RESUMEN

La hipertensión induce aumento de sustancias vasoconstrictoras tales como la angiotensina II (Ang II), una hormona que participa en la homeostasis renal. Rho y Rac son proteínas G monoméricas que funcionan como activadores de una amplia variedad de vías de señalización, algunas de las cuales conducen a la contracción vascular, por lo que se ha sugerido que desempeñan un papel importante en la hipertensión. El objetivo de este estudio fue determinar la participación de las proteínas Rho y Rac en la reactividad vascular renal a la Ang II en la hipertensión inducida por óxido nítrico. Se realizaron ensayos de reactividad vascular mediante curvas de concentración-respuesta a la Ang II en presencia y ausencia de los inhibidores de la proteína Rho (C3) y la proteína Rac (NSC23766) en riñones aislados de ratas hipertensas inducidos por L-NAME. La Ang II causó vasoconstricción renal de una manera dependiente de la concentración en ambos grupos, aunque el efecto contráctil fue ligeramente menor en el grupo de ratas hipertensas que el grupo control. En presencia del inhibidor de la proteína Rho, la curva a la Ang II se desplazó hacia la izquierda; mientras la inhibición selectiva de Rac indujo la disminución de la respuesta presora a la Ang II de manera significativa en ratas hipertensas. Además, no se observaron diferencias significativas en la respuesta contráctil del grupo de control durante la inhibición de las proteínas Rho y Rac. Por lo tanto podemos concluir que durante la hipertensión inducida por L-NAME, la proteína Rho está mediando la respuesta vasodilatadora al estímulo vasoconstrictor, mientras que la proteína Rac contribuye al aumento de la presión de perfusión renal en ratas hipertensas estimuladas con Ang II.

**Palabras clave:** Hipertensión, proteínas G, Angiotensina II, riñón, L-NAME.

## B. ABSTRACT

Hypertension induces an increase in vasocontractile substances such as angiotensin II (Ang II) a hormone that mainly affects the kidneys homeostasis. Rho and Rac are monomeric G proteins that function as activators of a wide variety of signaling pathways that could lead to vascular contraction, so it has been suggested that Rho and Rac play an important role in hypertension. The aim of this study was to determine the role of Rho and Rac proteins in renal vascular reactivity to Ang II in hypertension induced by nitric oxide deficiency. Vascular reactivity assays have been developed through concentration-response curves to Ang II in the presence and absence of the inhibitors of Rho protein (C3) and the inhibitor of Rac protein (NSC23766) in isolated kidneys of L-NAME-induced hypertensive rats. The Ang II caused renal vasoconstriction in a concentration-dependent manner in both groups, although the contractile effect was slightly lower in the group of hypertensive rats than the control group. Renal vascular response to Ang II was left-shifted in presence of Rho-inhibitor in the hypertensive group. On the other hand, vascular response to Ang II was right-shifted in the presence of Rac selective inhibitor in hypertensive rats ( $p < 0.05$ ). However, no significant differences were observed in the contractile response of the control group during the inhibition of Rho and Rac proteins. Therefore, we can conclude that for L-NAME-induced hypertension, Rho protein is mediating vasorelaxant response to vasoconstrictor stimulus, whereas Rac protein contributes to increase renal perfusion pressure in hypertensive rats stimulated with Ang II.

**Key words:** Hypertension, protein G, Angiotensin II, kidney, L-NAME.

**C. ÍNDICE**

A. RESUMEN..... I

B. ABSTRACT..... II

C. ÍNDICE..... III

D. ÍNDICE DE FIGURAS..... VI

D. ÍNDICE DE TABLAS..... VII

E. LISTA DE ABREVIATURAS..... VIII

1. INTRODUCCIÓN..... 1

    1.1 Presión arterial..... 1

    1.2 Hipertensión arterial..... 2

    1.3 Anatomía y fisiología del riñón..... 5

    1.4 El Sistema Renina Angiotensina (RAS)..... 8

    1.5 La angiotensina II..... 9

    1.6 Proteínas G..... 12

        1.6.1 Proteínas G monoméricas..... 12

        1.6.2 Proteínas Rho..... 14

            1.6.2.1 Inhibidor de la proteína Rho: Exoenzima C3 transferasa..... 17

        1.6.3 Proteínas Rac..... 18

            1.6.3.1 Inhibidor de la proteína Rac: NSC23766..... 18

2. ANTECEDENTES..... 20

    2.1 Participación de la proteína Rho durante la hipertensión arterial..... 20

    2.2 Participación de la proteína Rac durante la hipertensión arterial..... 23

3. JUSTIFICACIÓN..... 25

4. HIPÓTESIS..... 25

5. OBJETIVOS..... 26

    5.1 Objetivo General..... 26

    5.2 Objetivos particulares..... 26

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Reactivos con grado analítico.....	27
6.2 Equipo.....	27
6.3 Metodología.....	27
6.3.1 Material biológico.....	27
6.3.2 Inducción de la hipertensión.....	28
6.3.3 Medición de la presión arterial.....	28
6.3.4 Reactividad vascular a la angiotensina II en el riñón.....	29
6.4 Análisis de los resultados.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Peso corporal de los animales.....	31
7.2 Presión arterial.....	33
7.2.1 Presión arterial sistólica.....	33
7.2.2 Presión arterial diastólica.....	34
7.3 Relación del peso del riñón con el peso de la rata.....	35
7.4 Ensayos de reactividad vascular renal.....	37
7.4.1 Efecto de la Ang II en la reactividad vascular renal en ratas hipertensas.....	37
7.4.2 Valores de la presión de perfusión basal en los riñones de ratas hipertensas inducidas por L-NAME y controles.....	38
7.4.3 Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la presión de perfusión basal.....	39
7.4.4 Participación de la proteína Rho en la reactividad vascular renal a la Ang II.....	41
7.4.5 Participación de la proteína Rac en la reactividad vascular renal a la Ang II.....	43
7.4.6 Efecto del KCl en la respuesta contráctil en el riñón de rata.....	45
8. DISCUSIÓN.....	48
8.1 Peso corporal.....	48
8.2 Presión arterial.....	49

8.3 Coeficiente de masa renal.....	49
8.4 Curva concentración-respuesta a la Angiotensina II.....	50
8.5 Participación de las proteínas Rho y Rac en la presión de perfusión basal.....	51
8.6 Ensayos de Reactividad vascular.....	53
8.6.1 Participación de la proteína Rho en la contracción vascular renal a la Angiotensina II.....	53
8.6.2 Participación de la proteína Rac en la contracción vascular renal a la Angiotensina II.....	55
8.7 Contracción inducida por el KCl en el lecho vascular renal.....	57
9. CONCLUSIÓN.....	59
10. PERSPECTIVAS.....	60
11. REFERENCIAS.....	61

**D. ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Prevalencia de la hipertensión arterial por sexo y años de encuesta..... 4

**Figura 2.** Anatomía del riñón..... 6

**Figura 3.** Sistema Renina Angiotensina Aldosterona..... 9

**Figura 4.** La vía de señalización de la Ang II..... 11

**Figura 5.** Regulación de la señalización de la proteína Rho..... 13

**Figura 6.** Vía de señalización de la proteína Rho..... 16

**Figura 7.** Mecanismo de inactivación de la proteína Rho..... 17

**Figura 8.** Modelo de acoplamiento simulado del NSC23766 en la proteína Rac.... 19

**Figura 9.** Expresión de la proteína RhoA en modelos de ratas hipertensas..... 21

**Figura 10.** Participación de la proteína Rho sobre la contracción vascular inducida por noradrenalina..... 22

**Figura 11.** Participación de la proteína Rac sobre la vasodilatación inducida por acetilcolina (ACh)..... 24

**Figura 12.** Registro de los valores de peso corporal (g) en animales control y tratados con Nω- Nitro, L-arginina metil éster (L-NAME)..... 32

**Figura 13.** Medición de presión arterial sistólica (mmHg) en animales control y tratados con Nω- Nitro, L-arginina metil éster (L-NAME)..... 34

**Figura 14.** Medición de presión arterial diastólica (mmHg) en animales control y tratados con Nω- Nitro, L-arginina metil éster (L-NAME)..... 35

**Figura 15.** Coeficiente de masa renal de ratas macho tratadas con L-NAME..... 36

**Figura 16.** Evaluación del efecto de la Ang II en la reactividad vascular renal de las ratas hipertensas..... 38

**Figura 17.** Evaluación de la participación de la proteína Rho en la reactividad vascular renal a la Ang II..... 42

**Figura 18.** Evaluación de la participación de la proteína Rac en la reactividad vascular renal a Ang II..... 44

**Figura 19.** Efecto de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación inducida por KCl (80 mM) en riñón de ratas macho Wistar

	posterior a la inhibición de la proteína Rho.....	46
<b>Figura 20.</b>	Efecto de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación inducida por KCl (80 mM) en el riñón de ratas macho Wistar posterior a la inhibición de la proteína Rac.....	47

### E. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de los niveles de presión arterial (mmHg) de acuerdo al Instituto de Corazón, Pulmones y Sangre.....	3
<b>Tabla 2.</b>	Principales funciones de los riñones.....	5
<b>Tabla 3.</b>	Clasificación de los miembros de la superfamilia Ras.....	13
<b>Tabla 4.</b>	Valores de presión de perfusión basal en riñones de ratas Wistar macho hipertensas inducidas por L-NAME y controles (mmHg).....	39
<b>Tabla 5.</b>	Efecto de la inhibición de las proteínas Rho y Rac sobre la presión de perfusión basal en riñones de ratas Wistar macho hipertensas inducidas por L-NAME y controles (mmHg).....	40

**F. LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Ach</b> .....	Acetilcolina
<b>Ang I</b> .....	Angiotensina I
<b>Ang II</b> .....	Angiotensina II
<b>AT1</b> .....	Receptor de Angiotensina tipo I
<b>AT2</b> .....	Receptor de Angiotensina tipo II
<b>DAG</b> .....	Diacilglicerol
<b>ECA</b> .....	Enzima convertidora de angiotensina
<b>ENSANUT</b> .....	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>GAP</b> .....	Proteína activadora de la actividad GTPasa
<b>GDI</b> .....	Inhibidor de la disociación de GDP
<b>GEF</b> .....	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
<b>GPCR</b> .....	Receptor acoplado a proteínas G
<b>IP3</b> .....	Inositol trifosfato
<b>L-NAME</b> .....	N-Nitro-L-Arginina metil éster
<b>MLCP</b> .....	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
<b>NHLBI</b> .....	Instituto Nacional de Corazón, Pulmones y Sangre
<b>NO</b> .....	Óxido nítrico
<b>NOS</b> .....	Sintasa de óxido nítrico
<b>OMS</b> .....	Organización Mundial de la Salud
<b>PAD</b> .....	Presión arterial diastólica.
<b>PAS</b> .....	Presión arterial sistólica
<b>PKC</b> .....	Proteína cinasa C
<b>PLC</b> .....	Fosfolipasa C
<b>RAS</b> .....	Sistema renina angiotensina
<b>ROCKs</b> .....	Rho cinasa
<b>ROS</b> .....	Especies reactivas del oxígeno
<b>SHR</b> .....	Ratas espontáneamente hipertensas

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Presión arterial

El término "presión arterial" se refiere a la fuerza hidrostática de la sangre sobre las paredes arteriales, que resulta de la función de bombeo del corazón, volumen sanguíneo, resistencia de las arterias al flujo y diámetro del lecho arterial (Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999).

La presión arterial es establecida por dos valores, el de la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD). El término presión arterial sistólica se refiere a la presión de la sangre cuando el corazón late al bombearla, mientras que el término presión arterial diastólica se refiere a la presión de la sangre cuando el corazón se relaja entre un latido y el siguiente (Padilla, 2011).

Si la presión arterial aumenta y permanece así bastante tiempo, puede causar daños a diferentes órganos, produciendo disfunción renal y endotelial que a su vez conduce a aterosclerosis e hipertensión arterial entre otras (Padilla, 2011).

## 1.2 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial es definida como un padecimiento crónico caracterizado por el aumento en la presión arterial por arriba de 140/90 mmHg y el aumento del tono vascular del sistema circulatorio (Cruz, 2001).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la hipertensión arterial afecta aproximadamente a 1,000 millones de personas en el mundo y se ha convertido en la enfermedad crónica más frecuente. Por lo tanto, los especialistas afirman que entre más alta sea la presión arterial, mayor será la probabilidad de sufrir un infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca y enfermedad renal.

Según los niveles de la presión arterial, el Instituto Nacional de Corazón, Pulmones y Sangre (NHLBI, por sus siglas en inglés) ha clasificado la presión arterial para adultos (mayores de 18 años) dentro de cuatro categorías principales: Normal, prehipertensión, hipertensión I e hipertensión II. Considerando la presión sanguínea normal como una presión sanguínea sistólica de <120 mmHg y una presión sanguínea diastólica de <80 mmHg. La prehipertensión ha sido definida como una presión sanguínea sistólica de 120-139 mmHg y una presión sanguínea diastólica de 80-90 mmHg. La etapa I de la hipertensión es definida como presión sanguínea sistólica de 140-159 mmHg y presión sanguínea diastólica de 90-99 mmHg, mientras que en la etapa II la presión sanguínea sistólica es mayor de 160

mmHg y presión sanguínea diastólica mayor de 100 mmHg (**Tabla 1**) (Lye *et al.*, 2009).

**Tabla 1. Clasificación de los niveles de presión arterial (mmHg) de acuerdo al Instituto de Corazón, Pulmones y Sangre (Lye *et al.*, 2009)**

<b>Categoría</b>	<b>Presión arterial sistólica (PAS)</b>	<b>Presión arterial diastólica (PAD)</b>
<b>Normal</b>	<120	<80
<b>Prehipertensión</b>	120-139	80-90
<b>Hipertensión I</b>	140-159	90-99
<b>Hipertensión II</b>	>160	>100

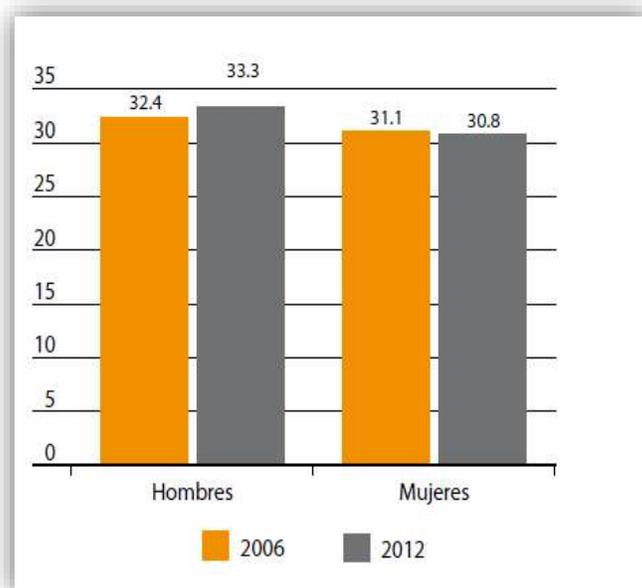
La hipertensión arterial según la causa que la origina se puede dividir en primaria (o esencial) y secundaria. La hipertensión primaria se diagnostica sin causa conocida y representa el 95% de todos los casos de hipertensión, mientras que la hipertensión secundaria puede resultar de embarazo, enfermedades tales como la apnea del sueño, síndrome de Cushing, disfunción renal, y como un efecto secundario de diversas drogas (Lye *et al.*, 2009).

Aunque las causas exactas de la hipertensión primaria no están claras, existen varios factores que aumentan los riesgos de la hipertensión primaria, entre los que se incluyen: hipercolesterolemia, diabetes, aumento de la producción de la renina y un desequilibrio en las hormonas sexuales (Lye *et al.*, 2009).

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, La hipertensión arterial es una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México. En

efecto, la prevalencia más baja se registró en el grupo de 20 a 29 años de edad y la más alta en el grupo de 80 o más años tanto en los hombres como en las mujeres (ENSANUT, 2012). Por otro lado, la OMS alertó que para el 2015 podrían morir 20 millones de personas por enfermedad cardiovascular, principalmente por infarto y accidentes cerebrovasculares.

Por otra parte, se observa que la prevalencia de la hipertensión en México se ha mantenido constante en los últimos años tanto en hombres (32.4 frente a 33.3%) como en mujeres (31.1 frente a 30.8%) (**Figura 1**) (ENSANUT, 2006; 2012).



**Figura 1.** Prevalencia de la hipertensión arterial por sexo y años de encuesta. (México ENSANUT, 2006; 2012)

### 1.3 Anatomía y fisiología del riñón

Los riñones realizan sus funciones más importantes filtrando el plasma y eliminando sustancias del filtrado según las necesidades del organismo, es decir, los riñones depuran o aclaran las sustancias de desecho del filtrado glomerular excretándolas a la orina, mientras devuelven a la sangre las sustancias que son necesarias. Sin embargo es importante conocer las numerosas funciones que realizan los riñones en el organismo, las cuales se resumen a continuación (**Tabla 2**) (Hemstreet, 1998; Guyton y Hall, 2001).

**Tabla 2. Principales funciones de los riñones (Guyton y Hall, 2001)**

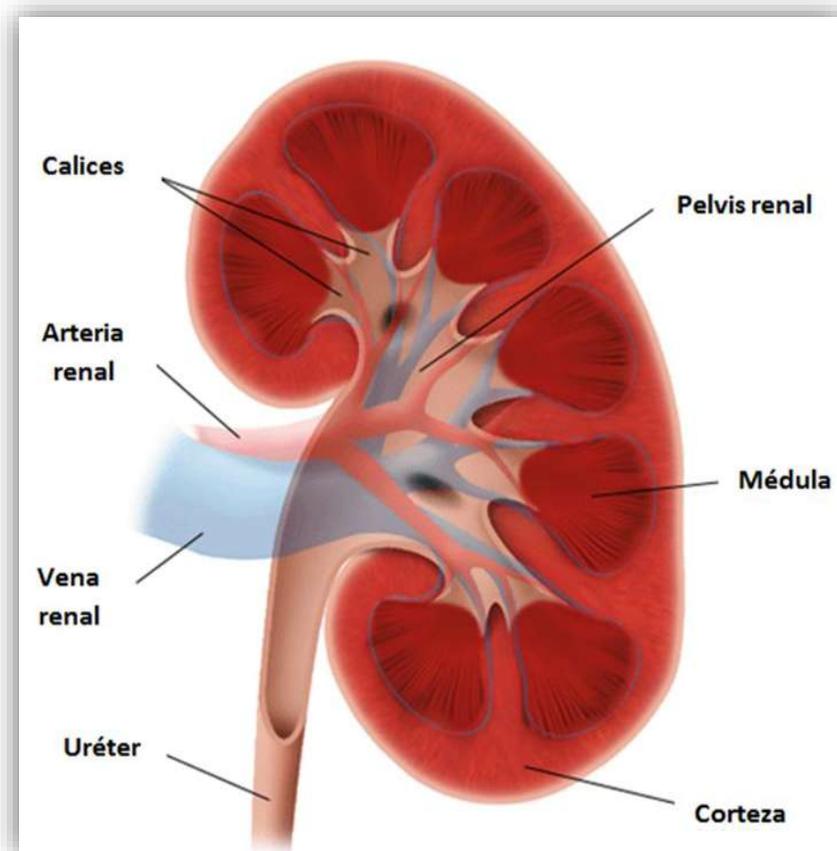
- ✚ Excreción de los productos metabólicos de desecho y las sustancias químicas exógenas
- ✚ Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico
- ✚ Regulación de la osmoralidad de los líquidos corporales y de las concentraciones de electrólitos
- ✚ Regulación del equilibrio ácido-básico
- ✚ Regulación de la presión arterial
- ✚ Secreción, metabolismo y excreción de las hormonas
- ✚ Gluconeogénesis

Los dos riñones están situados en la parte posterior del abdomen, por fuera de la cavidad peritoneal. En un ser humano adulto, cada riñón pesa unos 150 g y tiene el tamaño aproximado de un puño cerrado (Guyton y Hall, 2001).

El riñón consta de tres regiones principales: la corteza (capa exterior), la médula (región interna) y la pelvis renal (**Figura 2**). La sangre fluye a la corteza y la médula a través de la arteria renal, que se ramifica en arterias cada vez más

pequeñas (Hemstreet, 1998). La médula está dividida en numerosas masas de tejido de forma cónica llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide nace en el límite entre la corteza y la médula y termina en la papila que penetra en el espacio de la pelvis renal (Guyton y Hall, 2001).

Un riñón sano contiene aproximadamente 1,200,000 de nefronas, estratégicamente situadas dentro de la corteza y la médula (Hemstreet, 1998).



**Figura 2.** Anatomía del riñón. El riñón consta de tres regiones principales: la corteza, la médula y la pelvis renal (<http://www.childrenshospital.org>)

Los riñones tienen un papel importante en la regulación del sodio, el balance de agua y la presión sanguínea. Una disminución en el volumen plasmático y el flujo sanguíneo renal estimula la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares y activa el sistema renina angiotensina (RAS) (Ponnuchamy y Khalil, 2009).

Además, para el control renal de agua y electrolitos, la regulación de la resistencia vascular renal es crítica para mantener el flujo sanguíneo y la función renal. Un incremento en la presión de perfusión renal activa la autorregulación renal, llevando a la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo renal para mantener los niveles normales. Para mantener el flujo sanguíneo y la función renal, los vasos sanguíneos son constantemente ajustados en su diámetro y tono vascular. Además, la autorregulación renal, ajusta a corto tiempo el tono vascular renal, involucrando cambios en la función de las células endoteliales y sensibilidad del músculo liso vascular a los vasoconstrictores. Ajustes a largo tiempo involucran hipertrofia en la pared celular y cambios estructurales en la arquitectura de la pared de los vasos y la matriz extracelular (McClellan y Young, 2009; Ponnuchamy y Khalil, 2009).

Cambios en la función de las células endoteliales, en la función de las células del músculo liso vascular y en la composición de la matriz extracelular podrían llevar a una disfunción vascular renal o vasoconstricción. Un persistente aumento de vasoconstrictores lleva a un incremento en la resistencia vascular

renal y esto podría incrementar la presión sanguínea (Ponnuchamy y Khalil, 2009; Luft *et al.*, 1999).

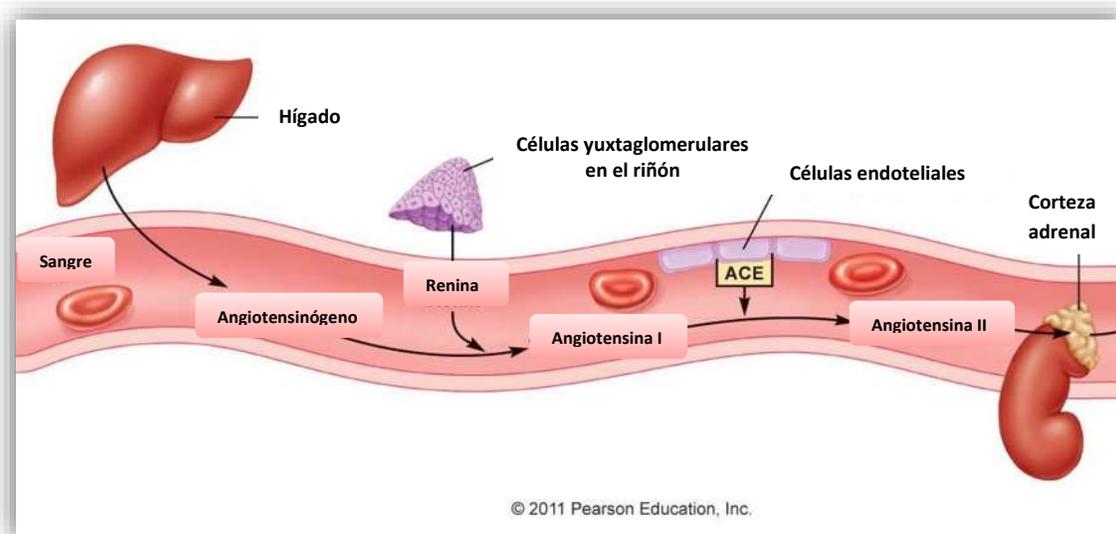
El incremento en la presión sanguínea a largo tiempo produce remodelación vascular renal incrementando la vasoconstricción y la resistencia vascular, (Ponnuchamy y Khalil, 2009).

#### **1.4 El Sistema Renina Angiotensina (RAS)**

La presión arterial está controlada por diferentes vías bioquímicas que interactúan entre sí. Una de las principales vías que intervienen en el control de la presión arterial es el sistema renina angiotensina (RAS) (Lye *et al.*, 2009), el cual ha demostrado jugar un papel importante en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos en el riñón (Sachse y Wolf, 2007) tales como el equilibrio de líquidos y electrolitos (Lye *et al.*, 2009).

La principal molécula del RAS 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 (Mehta y Griendling, 2007). Los mecanismos que controlan la formación y degradación de la Ang II son importantes en la determinación de su efecto fisiológico final. El octapéptido Ang II se forma por la conversión enzimática del angiotensinógeno a angiotensina I (Ang I) por la actividad de una aspartil proteasa, la renina, con la subsecuente

conversión de la Ang I a Ang II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Figura 3) (Mehta y Griendling, 2007).



**Figura 3.** Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. Síntesis de Angiotensina II a partir de Angiotensinógeno (Modificado de droualb.faculty.mjc.edu).

Se ha descrito que la Ang II es la responsable de regular el tono vascular al provocar respuestas contráctiles e induce la liberación de aldosterona, mecanismo por el cual contribuye a elevar la concentración de sodio aumentando así la presión sanguínea (Cavanagh *et al.*, 2011).

### 1.5 La angiotensina II

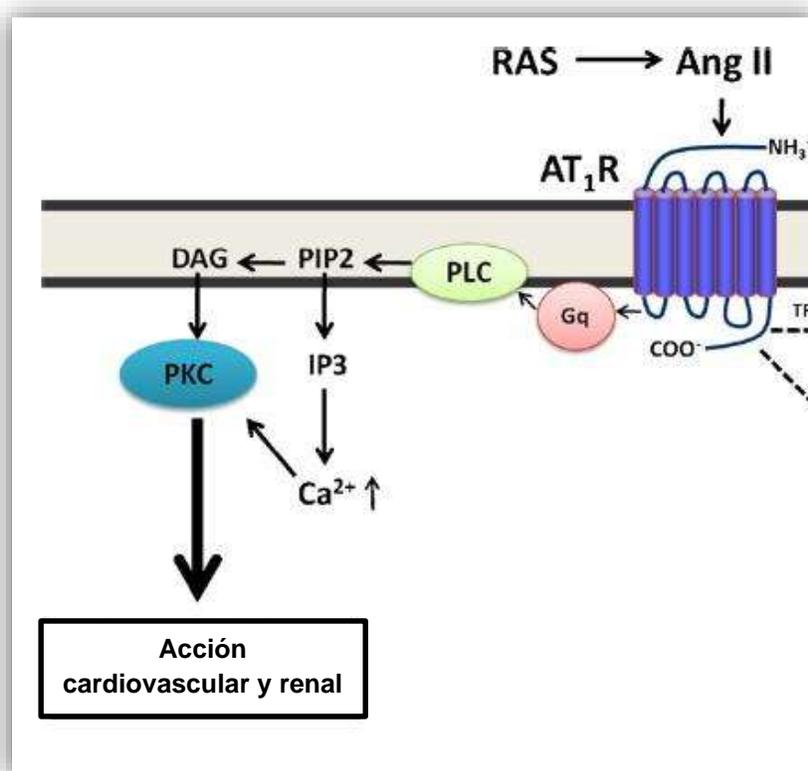
La angiotensina II (Ang II) es un péptido vasoconstrictor involucrado en la hipertensión, la disminución del flujo sanguíneo regional, insuficiencia renal, aterosclerosis y la hipertrofia cardíaca (Toda *et al.*, 2007).

La Ang II se une a receptores específicos para mediar sus efectos. Los receptores de Angiotensina tipo I (AT1) y tipo II (AT2) son los mejor caracterizados a nivel molecular, pero pueden existir otros tipos (Sachse y Wolf, 2007). La activación del receptor AT1 causa vasoconstricción, mientras que la activación del receptor AT2 induce la liberación de óxido nítrico (NO) y causa vasodilatación (Palm y Nordquist, 2011).

Los efectos fisiológicos y fisiopatológicos de la Ang II están relacionados principalmente con la activación del receptor AT1. Una vez que la Ang II se une al receptor AT1, activa una serie de cascadas de señalización, que a su vez regulan los diversos efectos fisiológicos de la Ang II. Tradicionalmente, las vías activadas por la Ang II se han dividido en dos: 1) vías de señalización dependientes de Proteínas G y 2) vías de señalización no dependientes de Proteínas G (Mehta y Griendling, 2007).

Como ya se mencionó, las principales acciones biológicas de la Ang II son mediadas a través del receptor AT1 (un receptor acoplado a la proteína Gq) que lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC) y promueve la subsecuente generación de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), ambos segundos mensajeros que desencadenan las vías de señalización río abajo mediadas por la Ang II (**Figura 4**). La activación de la proteína cinasa C (PKC) representa un paso crucial en la señalización de la Ang II ya que moviliza el

$\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares, controlando procesos críticos implicados en la regulación de la fisiología cardiovascular y renal (Olivares-Reyes *et al.*, 2009).



**Figura 4.** La vía de señalización de la Ang II. Unión de Ang II al receptor AT<sub>1</sub>R desencadenando la activación de segundos mensajeros promoviendo la regulación de procesos a nivel cardiovascular y renal (Modificado de Olivares-Reyes *et al.*, 2009).

En el estado basal de las células del músculo liso vascular, hay un equilibrio entre la vasoconstricción y la vasodilatación (Seasholtz y Brown, 2004). Las alteraciones en la producción de NO y Ang II han sido consideradas como los principales factores patológicos en las enfermedades cardiovasculares (Toda *et al.*, 2007).

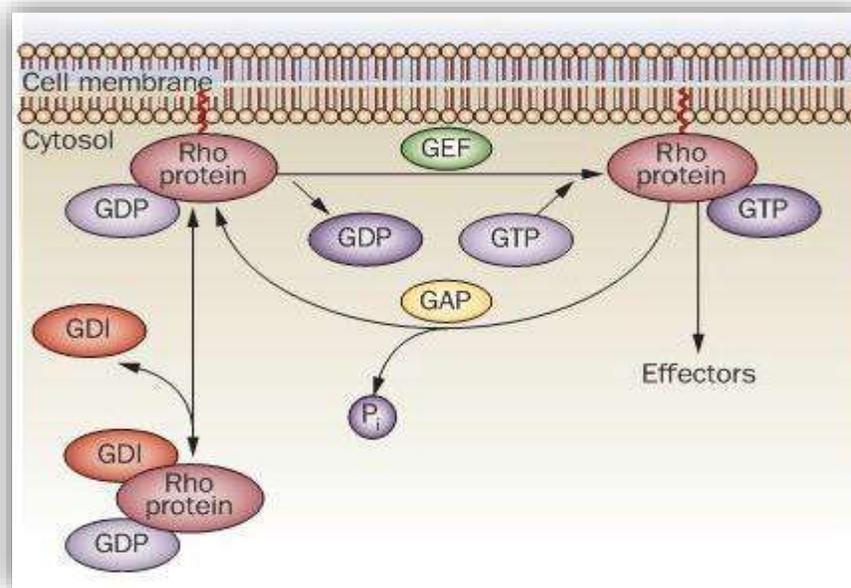
## 1.6 Proteínas G

Hay dos clases de proteínas G clasificadas en base a su peso molecular y estructura molecular. La primera comprende pequeñas GTPasas monoméricas, mientras que la segunda los complejos de proteínas G heterotriméricas compuestas por las subunidades de alfa, beta y gamma.

### 1.6.1 Proteínas G monoméricas

La superfamilia de las GTPasas pequeñas comprende más de 100 proteínas estructuralmente relacionadas, que experimentan cambios en su conformación espacial y su localización subcelular dependientes de factores que intercambian los nucleótidos de guanina (GEF), los cuales promueven la liberación de GDP por GTP (Seasholtz y Brown, 2004). Las GTPasa pequeñas son activas cuando tienen unido GTP e inactivas cuando contienen GDP. En su forma activa, estas GTPasa se unen a diferentes efectores que a su vez regulan un gran número de funciones biológicas (**Figura 5**) (Bishop y Hall, 2000).

Según sus relaciones estructurales y funcionales, la superfamilia de las GTPasas pequeñas se agrupan en las siguientes 5 subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran que se detallan a continuación (**Tabla 3**) (Jalil *et al.*, 2005; Lorenzano *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Regulación de la señalización de la proteína Rho. Los inhibidores de la disociación (GDI) “bloquean” las proteínas Rho unidas a GDP en el citosol, los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) median la activación de proteínas Rho promoviendo la liberación de GDP a cambio de GTP, y las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) estimulan la actividad intrínseca de GTPasa de proteínas Rho unidas a la membrana para hidrolizar GTP a GDP y así entonces apagar la activación (Loirand y Pacaud, 2010).

**Tabla 3. Clasificación de los miembros de la superfamilia Ras (Lorenzano *et al.*, 2010)**

Subfamilia	Principales Funciones	Miembros representativos
Ras	Control de la expresión génica, proliferación celular, diferenciación, supervivencia	Ras, Rap, R-Ras, Ral, Rheb (36 miembros)
Rho	Reorganización del citoesqueleto, progresión del ciclo celular, expresión génica	Rac, Rho, Cdc42 (20 miembros)
Rab	Tráfico vesicular, vías endocíticas y secretorias	Rab1, Rab5 (61 miembros)
Ran	Transporte nucleoplasmático de ARN y proteínas	Ran
Arf	Regulación de tráfico vesicular	Arf1, Arf6 (35 miembros)

### 1.6.2 Proteínas Rho

En los procesos fisiológicos, cada uno de los elementos de las vías de señalización está finamente regulado espacial y temporalmente, mientras que la desregulación de los mismos, lleva al desarrollo de numerosas enfermedades (Lorenzano *et al.*, 2010). Están en curso intensas investigaciones sobre los mecanismos moleculares de la patogénesis de la hipertensión y de los blancos terapéuticos potenciales identificados para el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas. Durante los últimos años, tales investigaciones han demostrado que la familia de las proteínas Rho son importantes reguladores de funciones cardiovasculares y se ha acumulado gran cantidad de evidencia, indicando que la activación de la proteína RhoA se encuentra implicada en la patogénesis de varios desordenes cardiovasculares, incluyendo la hipertensión (Loirand y Pacaud, 2010).

Las proteínas Rho son parte de una de la superfamilia de Ras de GTPasas. Estas proteínas tienen pesos moleculares semejantes (20-25 kDa) y se denominan genéricamente “GTPasas pequeñas” (Lorenzano *et al.*, 2010).

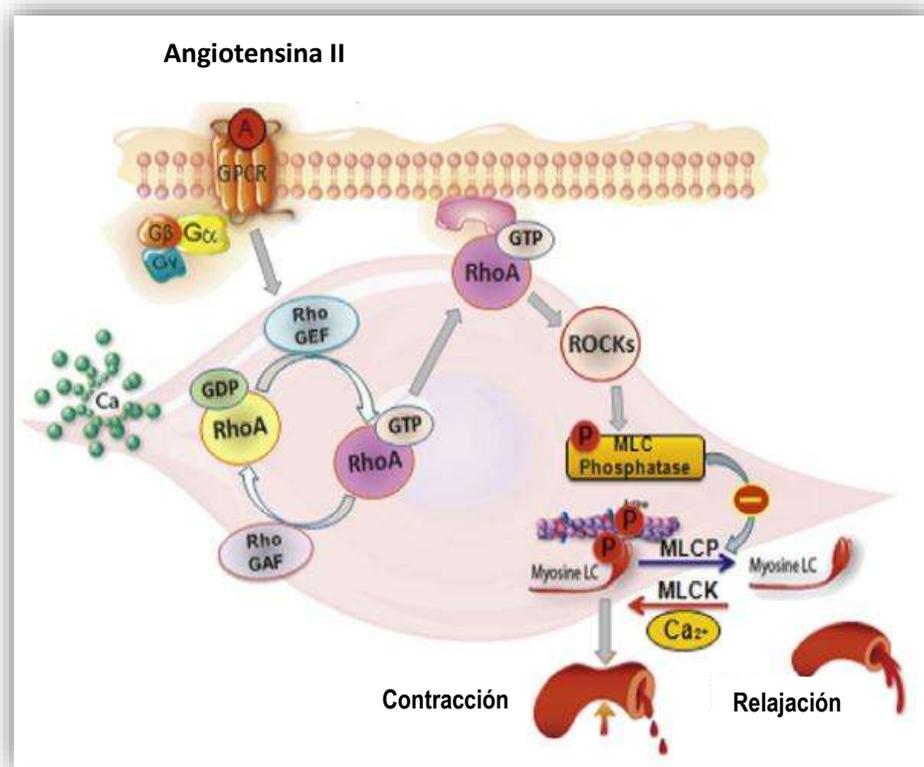
Los miembros de la subfamilia Rho (que incluye RhoA, RhoB, Rac1 y Cdc42), se ha encontrado que pueden regular muchas actividades celulares, entre ellas, la formación de las distintas estructuras que conforman el citoesqueleto de la actina (Jalil *et al.*, 2005), la polaridad celular, la endocitosis, el tráfico vesicular, la

progresión a través del ciclo celular, la diferenciación, la oncogénesis, y la transcripción de genes (Burrige y Wennerberg, 2004).

Las proteínas de la familia Rho son también un componente importante de las vías de señalización que regulan varios procesos y funciones celulares, tales como la vasoconstricción, reorganización del citoesqueleto de actina, trans migración de leucocitos y crecimiento celular (Rupérez *et al.*, 2005).

La capacidad de los agonistas de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) para efectuar la activación de RhoA vascular y sus vías de señalización también se altera en la hipertensión experimental. Se ha comprobado que la Ang II es uno de los agonistas más eficaz en causar la activación de la proteína Rho en las células del músculo liso vascular (Seasholtz y Brown, 2004).

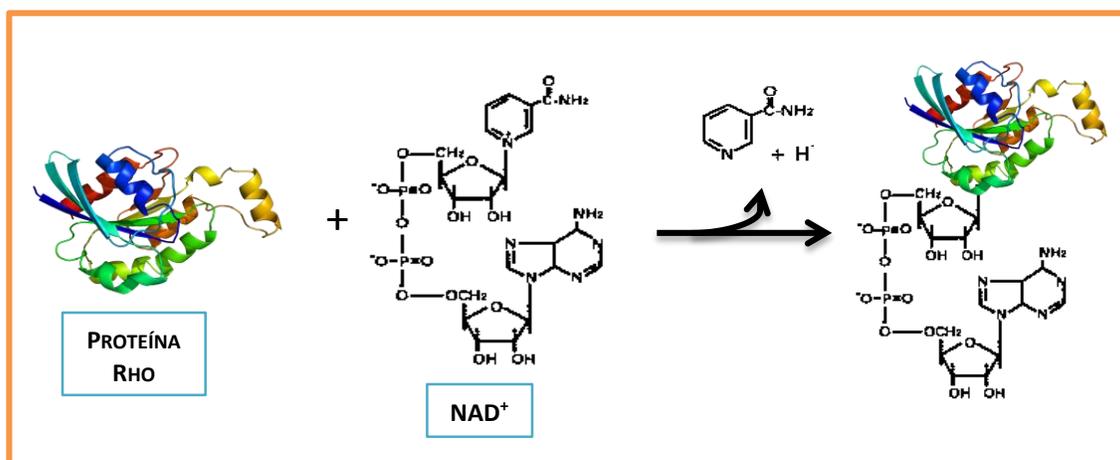
Cuando los agonistas de la proteína Rho se acoplan con el GPCR, convierten a Rho en su forma inactiva (Rho-GDP) a su forma activa (Rho-GTP). Esta última se trasloca por el citosol para activar a sus efectores, entre los que se incluye la Rho cinasa (ROCKs). La ROCKs aumenta la vasoconstricción mediante la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) a través de la fosforilación de esta enzima (Duong-Quy *et al.*, 2013). Al activarse la Rho-cinasa mediante Rho, se favorecen la contracción de las células musculares lisas vasculares, la formación de las fibras de estrés y la migración celular (**Figura 6**) (Jalil *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Vía de señalización de la proteína Rho. Al activarse la Rho-quinasa mediante RhoA se fosforila la fosfatasa de la MLCP, con lo cual esta fosfatasa es inhibida y, de esta manera, se favorecen la contracción de las células musculares lisas vasculares (Duong-Quy *et al.*, 2013).

### 1.6.2.1 Inhibidor de la proteína Rho: Exoenzima C3 transferasa

Las toxinas bacterianas se han utilizado ampliamente para dilucidar las funciones de las proteínas de la familia Rho. Estas incluyen las toxinas de la familia de exoenzimas C3, C3 transferasa ADP- ribosa de *Clostridium botulinum*, la cual inactiva específicamente a los miembros de la subfamilia Rho, Rho A, B, C transfiriendo un monómero de ADP-ribosa a partir del NAD<sup>+</sup> irreversiblemente en el aminoácido asparagina en la posición 41 (Asn 41) de la proteína Rho (**Figura 7**). Esta ADP ribosilación no bloquea la interacción de Rho con sus efectores, sino más bien impide su activación por GEF (Corda y Di Girolamo, 2003; Rolfe *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Mecanismo de inactivación de la proteína Rho. La exoenzima C3 cataliza la adición de ADP-ribosa de NAD a Asparagina 41 de la proteína RHO, causando un cambio conformacional, impidiendo que se active la proteína al no unirse al GEF (Corda y Di Girolamo, 2003).

### 1.6.3 Proteínas Rac

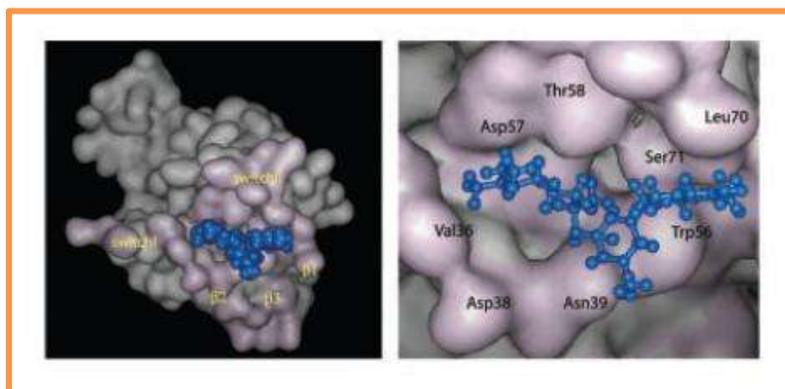
Rac es una proteína perteneciente a la familia de Rho, desempeña un papel central en la migración celular mediante la inducción de la extensión de lamellipodia (Higashi *et al.*, 2010).

Rac juega un papel clave en la comunicación de varios receptores de la célula regulando varias vías bioquímicas como motilidad celular y la expresión de genes. La familia Rac está conformada por 3 diferentes isoformas: Rac1, Rac2 y Rac3. Esas tres proteínas exhiben distintos patrones de expresión y están involucradas en la regulación de un amplio rango de funciones biológicas importantes. Rac1 es la isoforma más estudiada, participa en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y la expresión de genes (Tan *et al.*, 2008). Rac2 controla la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tanto en los leucocitos como en las células no hematopoyéticas. En estas últimas, estimula la producción de las ROS activando un complejo proteico como el sistema NADPH oxidasa (Jalil *et al.*, 2005). Por último, Rac3 es altamente expresada en el desarrollo del sistema nervioso central y cerebro en adultos (Tan *et al.*, 2008).

#### 1.6.3.1 Inhibidor de la proteína Rac: NSC23766

El NSC23766 es un compuesto químico de pirimidina capaz de inhibir específica y reversiblemente la activación de Rac al interferir con la interacción de los GEF (© Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La unión entre NSC23766 y Rac1

es de naturaleza hidrofóbica, los átomos de nitrógeno del NSC23766 forman tres enlaces de hidrógeno con los residuos de Rac1, así como la unión de NSC23766 con el Trp 56 del anillo indol, impidiendo así la unión del GEF con la proteína Rac1 (**Figura 8**) (Gao *et al.*, 2004).



**Figura 8.** Modelo de acoplamiento simulado del NSC23766 en la proteína Rac. (Izquierda) localización del sitio de unión de NSC23766 a Rac1. (Derecha) Contacto estructural de sitio de unión de NSC23766 con Triptófano 56 de Rac1. El modelo de acoplamiento se ha generado con el programa FLEXX y se visualizó con ViewerPro (Gao *et al.*, 2004)

## 2. ANTECEDENTES

La participación de las proteínas Rho y Rac durante la hipertensión ha sido reportada en diversos estudios (Seko *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2008), éstas han sido evaluadas en diferentes modelos de hipertensión de manera experimental. Sin embargo, poco se conoce acerca de su actividad en un modelo dependiente de NO.

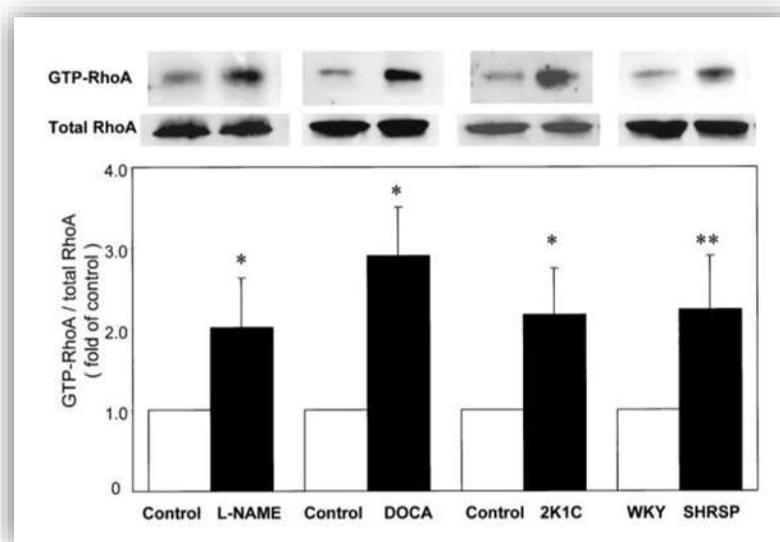
### 2.1 Participación de la proteína Rho durante la hipertensión arterial

Existen diferentes modelos de hipertensión que han sido ampliamente descritos y utilizados, como es el caso de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés); o modelos de hipertensión secundaria, como las ratas sensibles a la dieta de sal (Dahl), hipertensión renovascular (clip renal), hipertensión por infusión de Ang II (bomba osmótica) e hipertensión inducida por L-NAME.

Uno de los sistemas que resulta sobreactivado durante la hipertensión es el sistema transduccional de Rho/ ROCKS que es uno de los principales mecanismos mediadores de la vasoconstricción (Seko *et al.*, 2003).

Algunos autores, determinaron la expresión de la proteína RhoA (forma activa de la proteína Rho) en diferentes modelos de hipertensión, incluido el modelo de L-NAME; donde observaron un incremento significativo de la expresión

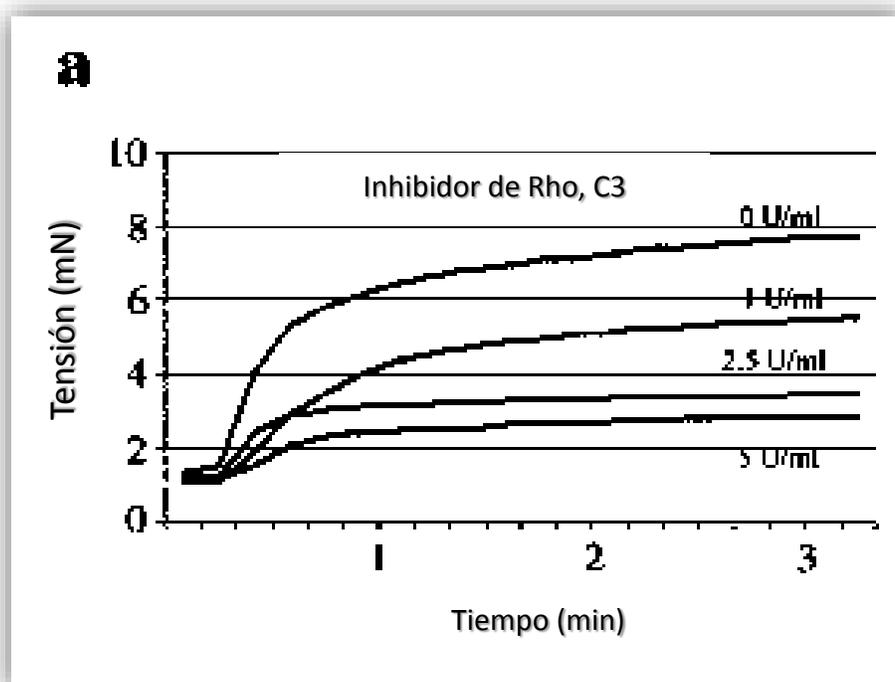
de esta proteína en todos los modelos de estudio comparados con condiciones de normotensión (**Figura 9**). Este dato sugiere que un aumento en la activación de la proteína RhoA se encuentra asociado con el desarrollo y/o establecimiento de la hipertensión de manera independiente del modelo experimental (Seko *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Expresión de la proteína RhoA en modelos de ratas hipertensas. La activación de RhoA fue examinada en las aortas de 4 modelos de ratas hipertensas, incluyendo el modelo inducida por L-NAME (L-NAME), modelo sal-DOCA (DOCA), 2-riñón, 1-clip modelo hipertensivo renal (2K1C) y SHRSP. En el panel superior y en medio, se muestra los análisis densitométricos de Western Blot representativas de la forma activa de RhoA (GTP-RhoA) y el total de RhoA, respectivamente, en aortas obtenidos a partir de los modelos indicados en el panel inferior. Para los controles se expresó como 1 unidad arbitraria media \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$  vs para cada control ( $n = 3$  a 4). (Seko *et al.*, 2003)

Por otra parte, algunos autores evaluaron la participación de Rho sobre la contracción vascular inducida por noradrenalina (**Figura 10**), para lo cual utilizaron diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Rho, la exoenzima C3 en

anillos de aorta de rata, donde observaron una disminución en la respuesta al estímulo de noradrenalina derivado de la inhibición de la proteína Rho, dicho efecto resultó dependiente de la concentración del inhibidor (Murakami *et al.*, 2009).



**Figura 10.** Participación de la proteína Rho sobre la contracción vascular inducida por noradrenalina. Contracción de anillos arteriales después de la exposición 2  $\mu\text{mol/l}$  de noradrenalina, la gráfica muestra la tensión promedio en el tiempo en cada grupo tratado con varias dosis de inhibidor de Rho, C3 ( $n = 6$ ). (Murakami *et al.*, 2009)

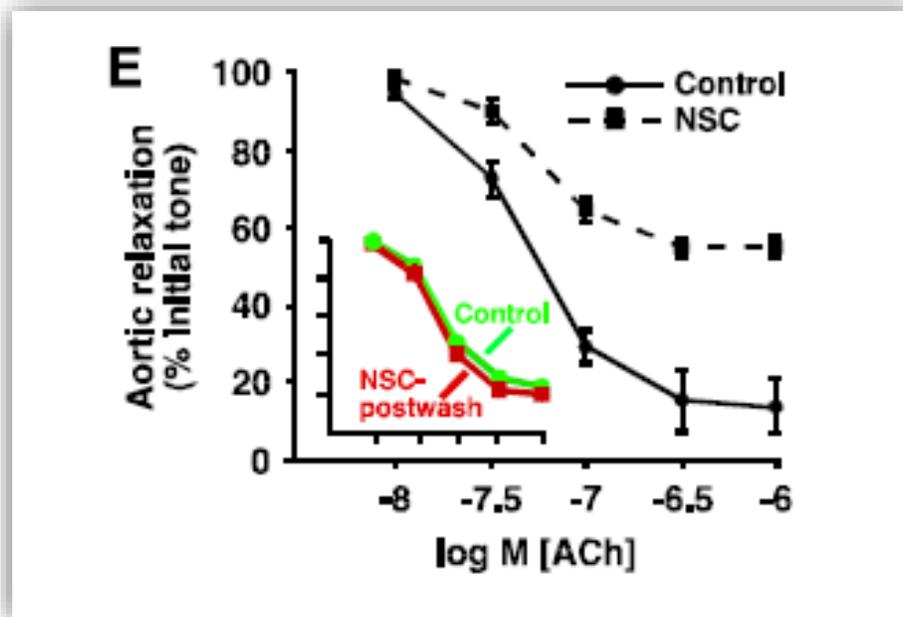
Aunado a estos datos, existe una fuerte evidencia de que la proteína Rho regula negativamente la sintasa de óxido nítrico (NOS), ya que un aumento en la señalización de Rho podría contribuir a la disminución de la NOS, y la disminución

de los niveles de NO aumentan la señalización Rho de manera que las vías transduccionales reguladas por los miembros de la familia Rho desempeñan un papel importante en varias condiciones patológicas, entre las que se encuentran la hipertensión arterial (Seasholtz y Brown, 2004).

## 2.2 Participación de la proteína Rac durante la hipertensión arterial

La función de la proteína Rac en el músculo liso es menos clara. Bajo ciertas condiciones, la proteína Rac es antagonista de la proteína Rho. La proteína Rac es parte del complejo NADPH oxidasa (Puetz *et al.*, 2009), siendo este el principal mecanismo mediante el cual la proteína Rac influye en la biodisponibilidad del NO mediante la producción del anión superóxido. En general, se ha descrito que la alteración de la actividad de Rac concomitantemente puede aumentar o disminuir los niveles tanto del NO como del anión superóxido (Selvakumar *et al.*, 2008).

Por otra parte, existen reportes acerca de la participación de Rac en el tejido vascular, particularmente en aortas de rata se observó que al realizar una curva concentración-respuesta a acetilcolina (Ach) en presencia de la inhibición selectiva de la proteína Rac, la vasorrelajación disminuyó significativamente; dicho efecto es revertido al retirar el inhibidor de la proteína Rac, NSC23766 (**Figura 11**) (Selvakumar *et al.*, 2008). Este reporte es un indicio de que la proteína Rac podría participar también en el mantenimiento del tono vascular al regular la síntesis de óxido nítrico en las células endoteliales de arterias de conductancia como la aorta.



**Figura 11.** Participación de la proteína Rac sobre la vasodilatación inducida por acetilcolina (ACh). Anillos arteriales de aorta torácica de conejo fueron incubados con 100  $\mu$ M del inhibidor de la proteína Rac (NSC) por una hora. El tratamiento de la aorta intacta con el inhibidor de la proteína Rac (NSC) significativamente inhibe la vasodilatación inducida por ACh ( $n = 3$ ). El efecto del inhibidor de la proteína Rac (NSC) es reversible cuando es lavado el tejido (recuadro) (Selvakumar *et al.*, 2008)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La hipertensión arterial cursa con un aumento de sustancias vasoconstrictoras como la Angiotensina II, misma que a su vez desencadena la activación de diferentes vías de señalización como la de Rho y Rac. Debido a que el riñón es uno de los principales órganos afectados por la hipertensión y dada la ausencia de reportes que indiquen cual es el papel de dichas proteínas en la reactividad vascular a la angiotensina II en el riñón aislado, resulta importante estudiarla en procesos hipertensivos.

### **4. HIPÓTESIS**

La activación de las proteínas Rho y Rac influyen de forma distinta al aumento en la contracción vascular renal a la Ang II en la hipertensión inducida por L-NAME.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de las proteínas Rho y Rac en la reactividad vascular renal a la angiotensina II durante la hipertensión inducida por L-NAME.

### 5.2 Objetivos particulares

✚ Evaluar la reactividad vascular a la Angiotensina II en el riñón de ratas hipertensas por L-NAME.

✚ Analizar la participación de las proteínas Rho y Rac en respuesta a la Angiotensina II en la hipertensión por L-NAME.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Reactivos con grado analítico**

Los reactivos con grado analítico empleados en este trabajo fueron obtenidos de: Sigma Aldrich, N-Nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME); Cytoskeleton, C3 transferasa (inhibidor de las proteínas Rho); Calbiochem, Rac1 inhibidor (NSC23766; inhibidor de las proteínas Rac).

### **6.2 Equipo**

Balanza para animales, equipo para ensayos funcionales en sistema de órgano aislado (Biopac Systems), transductor de presión acoplado a un sistema LETICA (pletismógrafo), sistemas de adquisición de datos MP100 Biopac Systems.

### **6.3 Metodología**

#### **6.3.1 Material biológico**

Para el estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-250 g. de 8 semanas de edad. Los animales fueron pesados y marcados para su distribución en 2 grupos (control e hipertenso), los cuales se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento. Todos los procedimientos se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el manejo y cuidado de animales de laboratorio.

### **6.3.2 Inducción de la hipertensión**

Se indujo la hipertensión en los animales mediante la administración de un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, el fármaco N $\omega$ - Nitro, L-arginina metil éster (L- NAME) (Sigma Aldrich) en una dosis de 75 mg/kg/día durante 15 días vía oral en el agua de beber. Se corroboró la hipertensión de cada uno de los animales en estudio, al medir la presión arterial sistólica y diastólica por pletismografía semanalmente, igualmente, se ajustó la dosis del fármaco de acuerdo al peso de los animales.

### **6.3.3 Medición de la presión arterial**

Se realizó mediante pletismografía en la cola del animal, empleando un transductor de presión acoplado a un sistema de captación de datos (Leticia Sytem) y temperatura controlada (37 °C). Previo a la medición, los animales fueron entrenados para adaptarse al proceso de medición. Las ratas fueron introducidas dentro de un cepo de acrílico adecuado para su peso y/o tamaño; posteriormente, se colocaron a 37 °C; una vez que se dilató la arteria caudal, se procedió a colocar un transductor de presión en la cola del animal. Las lecturas se obtuvieron mediante el uso de un equipo computarizado con un software especializado (Chart, versión 4.2). Se consideró el promedio de al menos tres mediciones similares por animal en cada determinación.

### 6.3.4 Reactividad vascular a la angiotensina II en el riñón

Los ensayos de reactividad vascular se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Castro-Moreno *et al.*, (2012). Al cabo de las dos semanas de tratamiento, los animales fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico (65 mg/kg i.p). Posteriormente se realizó una laparotomía en la cavidad abdominal, se localizó el riñón derecho. Se ocluyó el flujo sanguíneo de la aorta y la arteria mesentérica superior, así mismo, se retiró la cápsula de Gilson al riñón para evitar interferencias de las hormonas liberadas por las glándulas suprarrenales. Se procedió a canular la arteria renal, a través de la arteria mesentérica superior, para enseguida realizar la perfusión *in situ* con solución Krebs, la cual tiene la siguiente composición (mM) (composición en mM: NaCl, 118.069; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.516; MgSO<sub>4</sub>, 1.176; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.75; NaHCO<sub>3</sub>, 25; EDTA, 0.0267 y glucosa, 5.5; a 37°C y pH 7.4; Bourgoin *et al.*, 2007) Una vez perfundido el riñón, fue diseccionado y colocado en una preparación tipo Langendorf donde se perfundió *in vitro* a 37 °C, con circulación constante de solución Krebs (10 ml/min) y oxigenación constante (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>).

Una vez colocados los riñones en la preparación tipo Langendorf, se permitió un periodo de estabilización de una hora, durante el cual, los tejidos fueron sensibilizados cada 20 minutos con “*bolus*” de fenilefrina (1x10<sup>-4</sup> M). Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ang II (1x10<sup>-9</sup> M hasta 1x10<sup>-4</sup> M) en presencia y ausencia de los inhibidores de las proteínas Rho (C3) y Rac (NSC23766).

#### 6.4 Análisis de los resultados

Para los ensayos funcionales en órgano aislado, los resultados se expresan como delta de presión de perfusión y se muestran como la media  $\pm$  error estándar de 5-8 animales. Se empleó un software especializado para construir las gráficas de concentración-respuesta y para realizar el análisis estadístico (Sigma Plot, versión 11.0). Se aplicó una ANOVA de dos vías, así como el análisis de Tukey como prueba de contraste, se consideró como estadísticamente significativos los datos con un valor de  $P < 0.05$ .

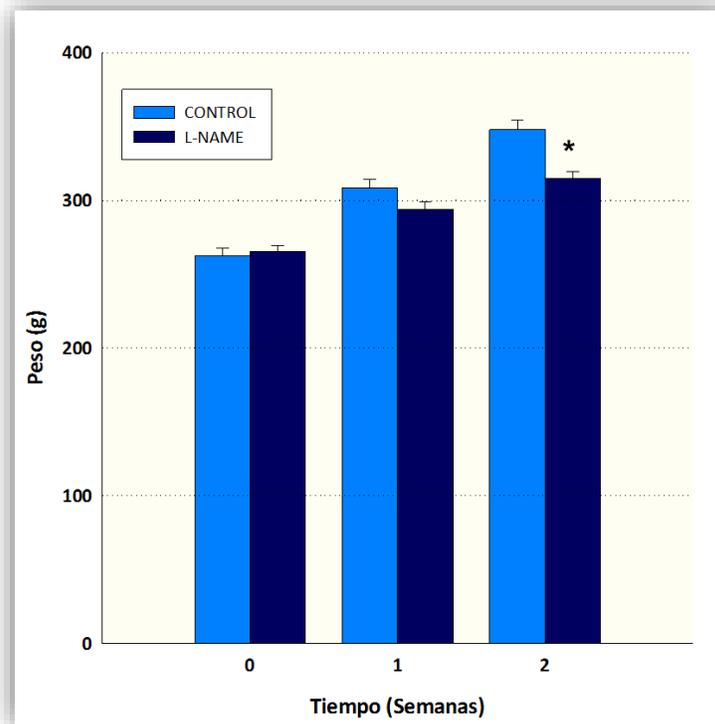
En el caso de los datos obtenidos de la contracción con KCl y la relación peso renal/peso de la rata, se realizó una ANOVA de una vía para analizar la significancia de los datos así como la prueba Tukey post hoc, de igual modo, se consideró estadísticamente significativo un valor de  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Peso corporal de los animales

Durante el periodo de tratamiento, se monitoreó el peso corporal de los animales semanalmente, lo cual permitió ajustar la dosis de L-NAME como se mencionó anteriormente, así mismo, fue posible determinar los cambios en el peso corporal debido al tratamiento con L-NAME.

Al analizar los datos del peso corporal, se observó un aumento en ambos grupos durante el tiempo de tratamiento. Sin embargo, las ratas tratadas con el L-NAME presentaron peso corporal estadísticamente menor en comparación con los animales control ( $315.01 \pm 4.26$  g vs  $347.11 \pm 14.7$  g;  $P < 0.05$  vs CONTROL) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Registro de los valores de peso corporal (g) en animales control y tratados con N $\omega$ - Nitro, L-arginina metil éster (L-NAME). Se pesó a los animales semanalmente por un periodo de 15 días. Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 15-18$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

## 7.2 Presión arterial

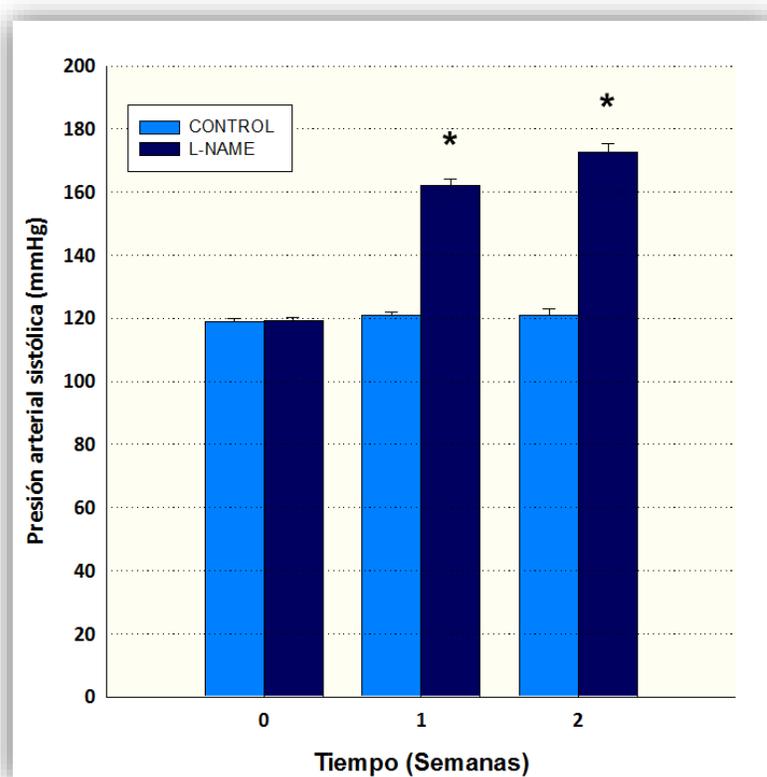
Con la finalidad de mostrar el desarrollo de la hipertensión inducido por el L-NAME, se midió la presión arterial semanalmente, mediante el método de pletismografía. A continuación se muestran los datos obtenidos del registro de la presión arterial sistólica y diastólica en los animales controles y tratados con L-NAME (**Figura 13; Figura 14**).

### 7.2.1 Presión arterial sistólica

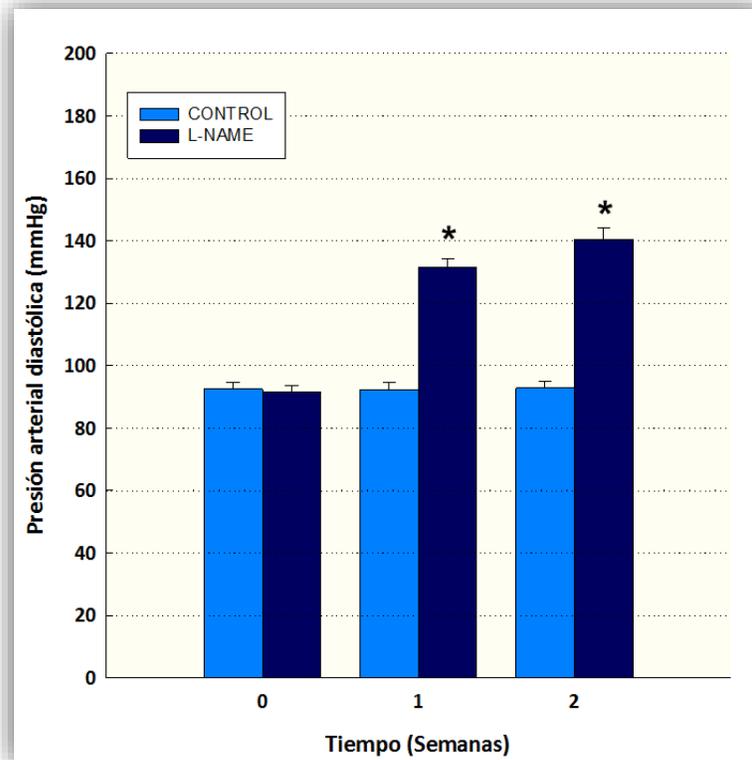
Al inicio del tratamiento, la presión arterial sistólica en ambos grupos mostraron valores de normotensión, siendo de  $119.22 \pm 1.02$  mmHg vs  $118.80 \pm 1.16$  mmHg para el grupo tratado con L-NAME y CONTROL, respectivamente. Después de 8 días de tratamiento con L-NAME, se presentó un incremento significativo de la presión arterial sistólica en comparación con el grupo CONTROL ( $121.05 \pm 0.95$  mmHg vs  $*161.92 \pm 2.21$  mmHg;  $*P < 0.05$  vs CONTROL); dicho incremento, se mantuvo hasta el final del tratamiento ( $121.09 \pm 1.97$  mmHg vs  $*172.66 \pm 2.59$  mmHg;  $*P < 0.05$  vs CONTROL), indicando que el L-NAME produjo una elevación importante de la presión arterial (**Figura 13**).

### 7.2.2 Presión arterial diastólica

De igual manera la presión arterial diastólica presentó un aumento a los 8 días de tratamiento ( $92.17 \pm 2.42$  mmHg vs  $*131.35 \pm 2.77$  mmHg;  $*P<0.05$  vs CONTROL), manteniéndose elevada al final del tratamiento con L-NAME en comparación al control ( $92.76 \pm 2.17$  mmHg vs  $*140.37 \pm 3.66$  mmHg;  $*P<0.05$  vs CONTROL) (Figura 14).



**Figura 13.** Medición de presión arterial sistólica (mmHg) en animales control y tratados con N $\omega$ - Nitro, L-arginina metil éster (L-NAME). Se midió la presión arterial sistólica semanalmente por pletismografía. El grupo hipertenso fue tratado con L-NAME durante 2 semanas. Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 15-18$ ).  $*P<0.05$  vs CONTROL por tiempo ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

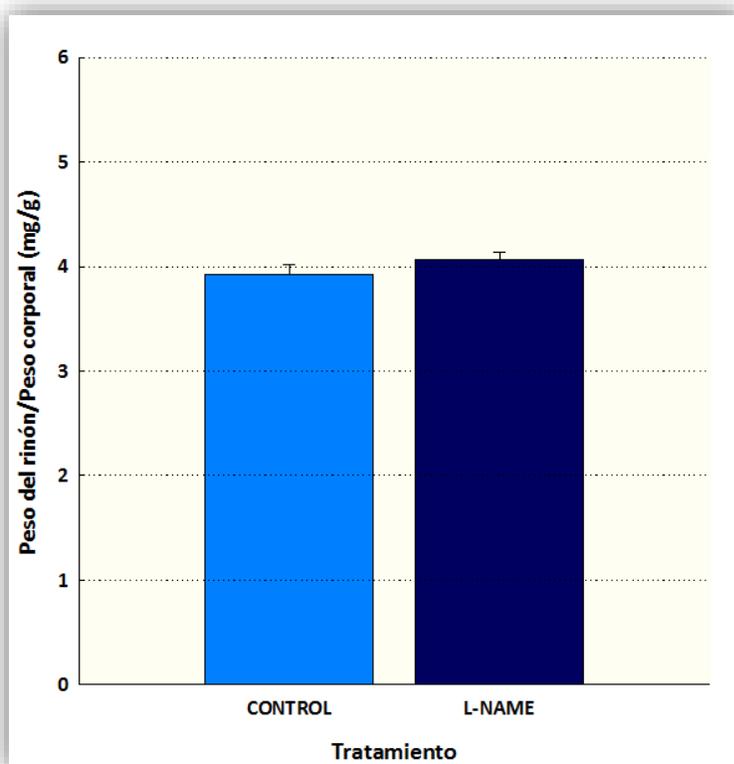


**Figura 14.** Medición de presión arterial diastólica (mmHg) en animales control y tratados con N $\omega$ - Nitro, L-arginina metil éster (L-NAME). Se midió la presión arterial sistólica semanalmente por pletismografía. El grupo hipertenso fue tratado con L-NAME durante 2 semanas. Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error estándar ( $n = 15-18$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL por tiempo ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc

### 7.3 Relación del peso del riñón con el peso de la rata

Con la finalidad de observar un incremento en la masa renal del animal debida al tratamiento con el L-NAME, los riñones de los animales de ambos grupos fueron colectados, secados y pesados para posteriormente hacer un análisis en base al peso corporal de cada animal y el peso renal (coeficiente de masa renal).

Los datos de la relación peso renal/peso corporal para los grupo CONTROL y L-NAME se muestran a continuación, donde se observa que no existen diferencias significativas en el coeficiente de masa renal entre ambos grupos, derivadas del tratamiento con L-NAME durante 2 semanas ( $3.92 \pm 0.10$  mg/g vs  $4.06 \pm 0.08$  mg/g) (**Figura 15**). Este hallazgo resulta de interés dado que en muchos reportes se ha observado hipertrofia renal durante la evolución crónica de la hipertensión arterial tanto a nivel experimental como clínico.



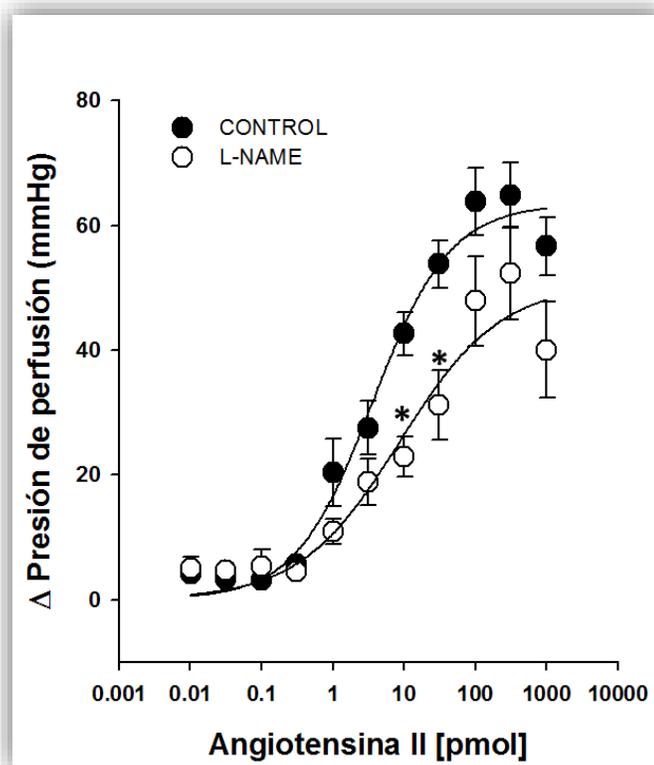
**Figura 15.** Coeficiente de masa renal de ratas macho tratadas con L-NAME. Se tomó el peso del final del tratamiento de los animales. Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 27$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de una vía, Tukey Post hoc.

## 7.4 Ensayos de reactividad vascular renal

### 7.4.1 Efecto de la Ang II en la reactividad vascular renal en ratas hipertensas

Al terminar el tratamiento con el L-NAME, los animales fueron sacrificados para extraer el riñón derecho que se perfundi6 para realizar los ensayos funcionales de 6rgano aislado. Se realizaron curvas concentraci6n–respuesta a la Ang II en ambos grupos.

En la respuesta a la Ang II, se observ6 una disminuci6n en la respuesta contr6ctil en los ri6ones de las ratas tratadas con L-NAME (**Figura 16**), esto podr3a indicar que la hipertensi6n inducida por deficiencia de 6xido n3trico disminuye la sensibilidad a la Ang II y por lo tanto, disminuye la respuesta vascular renal.



**Figura 16.** Evaluación del efecto de la Ang II en la reactividad vascular renal de las ratas hipertensas. Curva concentración–respuesta a la Ang II en el riñón de ratas macho Wistar. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de grupo control ( $n = 7$ ); grupo hipertenso tratado con L-NAME (75mg/kg/día) ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

#### 7.4.2 Valores de la presión de perfusión basal en los riñones de ratas hipertensas inducidas por L-NAME y controles

Una vez que se estabilizó el riñón, previo a la utilización del inhibidor, se midió la presión de perfusión basal, es decir, cuando el riñón no está bajo ningún estímulo químico y la presión de perfusión se ha estabilizado.

Como se puede observar, la presión de perfusión inicial de los riñones fue similar entre el grupo tratado con L-NAME en comparación con el grupo

CONTROL ( $106.1 \pm 5.8$  mmHg vs  $110.9 \pm 5.6$  mmHg) para el caso de los experimentos en donde se evaluó el papel de la proteína Rho (**Tabla 4**). Por otra parte, no se observaron cambios en los valores de presión de perfusión en los riñones de las ratas que fueron tratadas con L-NAME en comparación con el grupo CONTROL ( $99.2 \pm 8.8$  mmHg vs  $114.7 \pm 15.7$  mmHg) (**Tabla 4**) para el caso de la proteína Rac.

**Tabla 4. Valores de presión de perfusión basal en riñones de ratas Wistar macho hipertensas inducidas por L-NAME y controles (mmHg)**

	Rho	Rac
<b>CONTROL</b>	$106.1 \pm 5.8$	$99.2 \pm 8.8$
<b>L-NAME</b>	$110.9 \pm 5.6$	$114.7 \pm 15.7$

#### **7.4.3 Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la presión de perfusión basal**

Los valores de presión de perfusión alcanzados tras la inhibición las proteínas Rho y Rac, previo al inicio de la curva concentración-respuesta, se resumen a continuación.

Se observa que en el grupo L-NAME+C3 incrementó la presión de perfusión de manera significativa en comparación con el grupo L-NAME ( $3.1 \pm 2.4$  mmHg vs  $*13.8 \pm 5.1$  mmHg;  $*P < 0.05$  vs L-NAME) (**Tabla 5**). El incremento en la presión de perfusión basal en animales tratados con L-NAME tras la inhibición de la proteína

Rho, indican que es posible que la actividad de la proteína Rho es responsable del mantenimiento del tono vasodilatador en la vasculatura renal.

Por otra parte, en la inhibición selectiva de la proteína Rac con el fármaco NSC23766, la presión de perfusión no sufrió cambios en el grupo normotenso (CONTROL). Sin embargo, el grupo L-NAME+NSC, se observó una disminución estadísticamente significativa de la presión de perfusión comparado con el grupo L-NAME (\*\*11.6 ± 6.5 mmHg vs 4.5 ± 6.5 mmHg; \*\*P<0.05 vs CONTROL) (Tabla 5). Estos datos sugieren que la actividad de la proteína Rac es dependiente de un estímulo vasoconstrictor.

**Tabla 5. Efecto de la inhibición de las proteínas Rho y Rac sobre la presión de perfusión basal en riñones de ratas Wistar macho hipertensas inducidas por L-NAME y controles (mmHg)**

	CONTROL		L-NAME	
	Vehículo	Inhibidor	Vehículo	Inhibidor
<b>Rho</b>	2.3 ± 1.8	2.3 ± 1.8	3.3 ± 2.7	13.8 ± 5.1 *
<b>Rac</b>	2.8 ± 1.4	3.2 ± 4.4	11.6±6.5 **	4.5±6.5

\*P<0.05 vs L-NAME ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

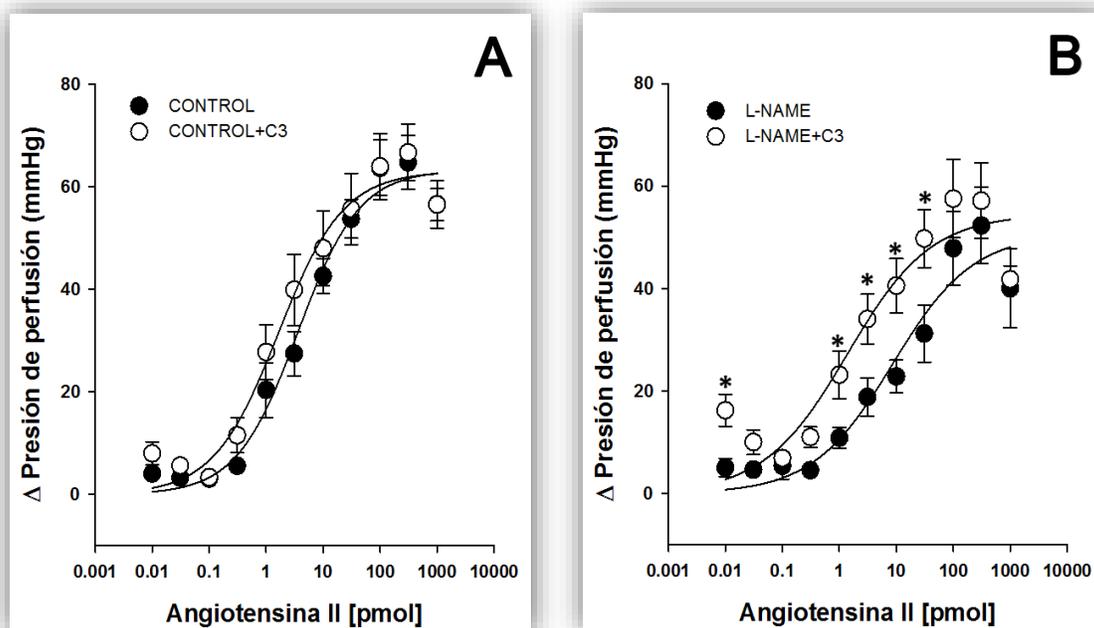
\*\*P<0.05 vs CONTROL ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

#### 7.4.4 Participación de la proteína Rho en la reactividad vascular renal a la Ang II

Para evaluar la participación de la proteína Rho en la reactividad vascular renal en respuesta a la Ang II, se realizaron curvas concentración-respuesta en el grupo CONTROL y en el grupo tratado con L-NAME en ausencia y presencia del inhibidor de la proteína Rho (exoenzima C3 transferasa).

Al analizar la respuesta a la Ang II en el grupo CONTROL y en el CONTROL+C3 con el inhibidor de la proteína Rho (exoenzima C3 transferasa), no se observan diferencias significativas en la respuesta a los estímulos vasoconstrictores (**Figura 17A**), por lo tanto, la inhibición de la proteína Rho no modifica la vasoconstricción renal a la Ang II en los animales normotensos.

Por otra parte, se muestra la respuesta a la Ang II en el riñón de ratas tratadas con L-NAME, se observó que en presencia del inhibidor C3 (L-NAME+C3) se incrementó significativamente la respuesta contráctil (\* $P < 0.05$  vs L-NAME) en comparación al grupo que no tenía el inhibidor de la proteína Rho (**Figura 17B**), indicándonos que en la hipertensión inducida por deficiencia de óxido nítrico. La proteína Rho parece estar asociada a vías de transducción que inhiben la contracción renal a la Ang II.

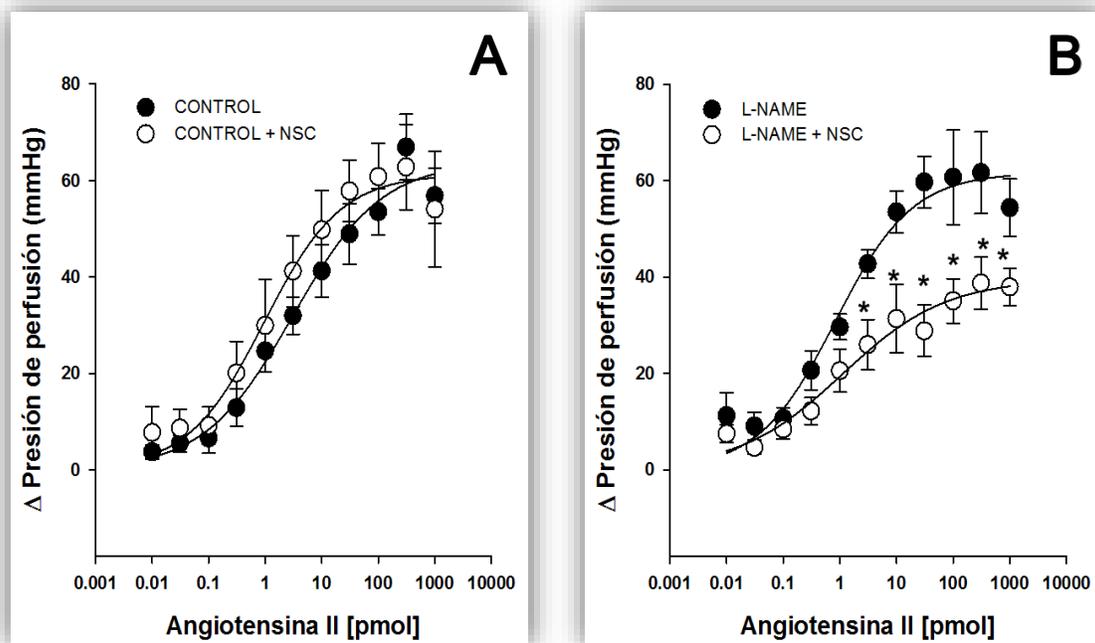


**Figura 17.** Evaluación de la participación de la proteína Rho en la reactividad vascular renal a la Ang II. Curva concentración–respuesta a la Ang II en el riñón de ratas macho Wistar en presencia del inhibidor de la proteína Rho con C3 en **A)** CONTROL y **B)** L-NAME. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar del grupo CONTROL ( $n = 7$ ); grupo CONTROL+C3 ( $n = 8$ ); grupo L-NAME ( $n = 5$ ); grupo L-NAME+C3 ( $n = 7$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

#### 7.4.5 Participación de la proteína Rac en la reactividad vascular renal a la Ang II

Para evaluar la participación de la proteína Rac en la vasoconstricción renal en respuesta a la Ang II, se realizaron curvas concentración-respuesta en el grupo control y el grupo tratado con L-NAME en ausencia y presencia del inhibidor de la proteína Rac (NSC23766). En el grupo CONTROL no se observaron diferencias significativas en respuesta al estímulo vasoconstrictor a la Ang II (**Figura 18A**), lo cual nos sugiere que la inhibición de la proteína Rac no modifica la vasoconstricción renal a la Ang II en los animales normotensos.

Por otra parte, se muestra la respuesta a la Ang II en el grupo tratado con L-NAME en ausencia y presencia de la inhibición de la proteína Rac. En presencia del NSC23766 disminuye la respuesta contráctil respecto la curva a Ang II en el grupo tratado con L-NAME (**Figura 18B**), indicativo de que en la hipertensión inducida por L-NAME, la proteína Rac participa en la respuesta contráctil a Ang II.



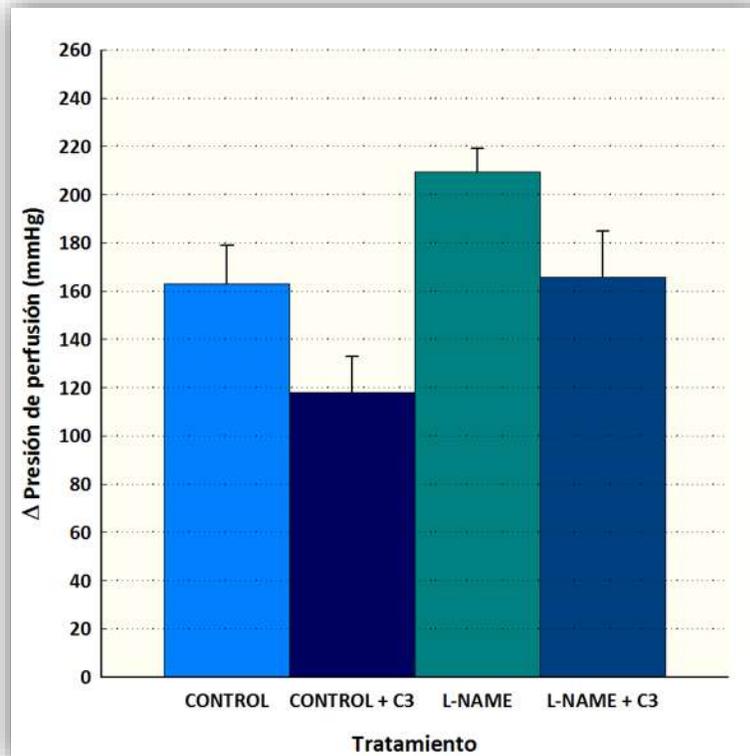
**Figura 18.** Evaluación de la participación de la proteína Rac en la reactividad vascular renal a Ang II. Curva concentración–respuesta a la Ang II en el riñón de ratas macho Wistar en presencia del inhibidor de la proteína Rac con NSC23766 en **A)** CONTROL y **B)** L-NAME. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de grupo CONTROL ( $n = 5$ ); grupo CONTROL+NSC ( $n = 4$ ); grupo L-NAME ( $n = 4$ ); grupo L-NAME+NSC ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de dos vías, Tukey Post hoc.

#### 7.4.6 Efecto del KCl en la respuesta contráctil en el riñón de rata

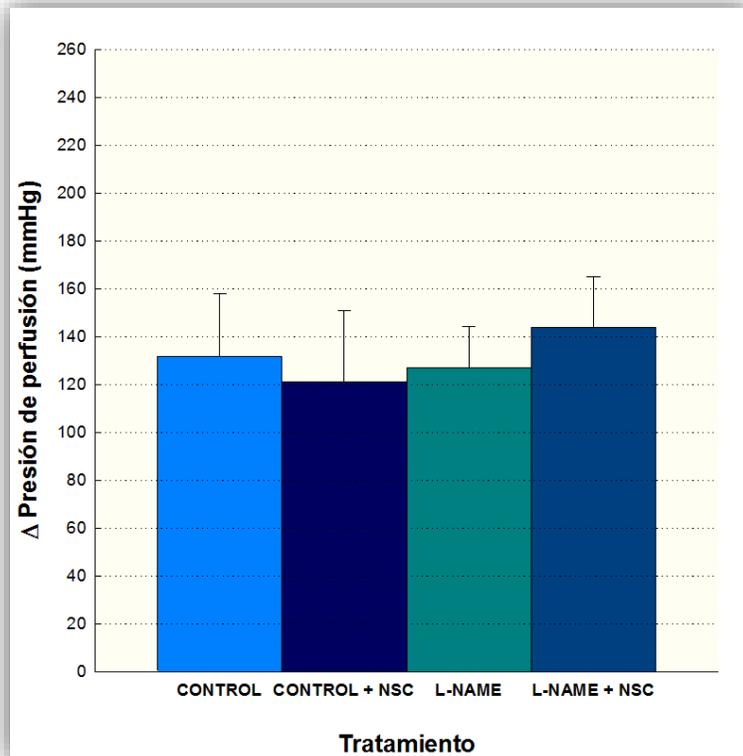
Con la finalidad de determinar si la reactividad vascular renal a la Ang II se asocia con cambios en la entrada del calcio extracelular, se contrajeron los riñones con una solución KCl 80 mM, un agente despolarizante de la membrana que permite la apertura de los canales de calcio e induce contracción independiente de los receptores. Este ensayo permite observar el funcionamiento de la maquinaria contráctil de las células del músculo liso vascular en órgano aislado

Para el caso de la proteína Rho, se muestra el efecto máximo de la contracción a KCl (80 mM), donde se puede observar que no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales (**Figura 19**), lo cual sugiere que, la maquinaria contráctil no se vio alterada ni por la hipertensión, ni por el uso del inhibidor selectivo de la proteína Rho C3.

De la misma manera que cuando se usó el inhibidor de Rho, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta contráctil a KCl en los riñones que fueron perfundidos con el inhibidor de la proteína Rac (**Figura 20**).



**Figura 19.** Efecto de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación inducida por KCl (80 mM) en riñón de ratas macho Wistar posterior a la inhibición de la proteína Rho. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de grupo CONTROL ( $n = 8$ ); grupo CONTROL+C3 ( $n = 7$ ); grupo L-NAME ( $n = 5$ ); grupo L-NAME+C3 ( $n = 7$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de una vía, Tukey Post hoc.



**Figura 20.** Efecto de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación inducida por KCl (80 mM) en el riñón de ratas macho Wistar posterior a la inhibición de la proteína Rac. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de grupo CONTROL ( $n = 5$ ); grupo CONTROL+NSC ( $n = 4$ ); grupo L-NAME ( $n = 4$ ); grupo L-NAME+NSC ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  vs CONTROL ANOVA de una vía, Tukey Post hoc.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Peso corporal

Tal como se esperaba, el peso de las ratas de ambos grupos se incrementó respecto al tiempo de tratamiento (**Figura 12**), siendo significativamente menor para el grupo tratado con L-NAME respecto al control, al término de la segunda semana de tratamiento. Este efecto del L-NAME sobre el peso corporal se ha observado a partir de la primera semana de tratamiento con L-NAME en diferentes trabajos (Ribeiro *et al.*, 1992; Pechánova *et al.*, 2004).

Esta disminución de peso, se ha asociado principalmente con el consumo de agua, puesto que no se han observado diferencias en el consumo de alimento ya que en promedio fue del 26% menor para las ratas tratadas con L-NAME (Ribeiro *et al.*, 1992). Este efecto sobre el consumo de agua en el modelo de L-NAME ha sido evaluado por otros autores, quienes observaron que la excreción de agua en los animales tratados con L-NAME se incrementó significativamente en comparación al control (Pollock *et al.*, 1993). Esto podría sugerir que las ratas tratadas con L-NAME podrían estar cursando con deshidratación dado que no beben la misma cantidad de agua y excretan mayor cantidad de fluidos que las ratas controles.

## 8.2 Presión arterial

En la literatura se describen diferentes dosis y periodos de administración del L-NAME para la generación de la hipertensión arterial (Ribeiro *et al.*, 1992; Pecháňová *et al.*, 2004), una de ellas fue la que se utilizó en este trabajo (75 mg/kg/día) que se considera como una dosis relativamente alta pero que permite el mantenimiento de una hipertensión sostenida durante la primera semana de tratamiento (**Figura 13; Figura 14**), hecho que se había reportado previamente por otros autores, quienes describen que la administración de L-NAME produce un aumento del 20% al 40% de la PAS y la PAD en ratas a partir de los primeros 7 días (Ramírez *et al.*, 2006).

## 8.3 Coeficiente de masa renal

Por otra parte, los resultados de la presente investigación muestran que la hipertensión arterial no produjo un aumento en la masa renal durante el tiempo de tratamiento (**Figura 15**), esto resulta de interés debido a que en la hipertensión arterial se ha observado el desarrollo de hipertrofia renal a largo plazo. Se ha reportado, en el modelo de L-NAME, en un periodo de 4-6 semanas, la hipertensión producida por éste, se asocia con alteraciones morfológicas renales generalizadas, entre ellas, un marcado engrosamiento de la pared de arterias y arteriolas, así como una disminución de la tasa de filtración glomerular y un aumento del flujo plasmático renal, acompañado al aumento en la resistencia vascular renal en las ratas tratadas (Ribeiro *et al.*, 1992).

#### 8.4 Curva concentración-respuesta a la Angiotensina II

En los ensayos de reactividad vascular, la Ang II causó un aumento dependiente de la concentración en la presión de perfusión renal tanto en el control como en las ratas tratadas con L-NAME. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una disminución de la respuesta presora a la Ang II en las ratas que fueron tratadas con el L-NAME (**Figura 16**), lo cual es contrastante a lo reportado anteriormente por otros autores, quienes observaron una respuesta estadísticamente mayor a la Ang II en los riñones provenientes de ratas tratadas con L-NAME (Rivera-Jardón *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen diferentes reportes en donde se menciona que la administración de L-NAME bloquea la síntesis del NO, trayendo por consecuencia, la sobreexpresión de la NOS renal (Pecháňová *et al.*, 2004; Kopincová *et al.*, 2012), la consecuencia de esto es un incremento en la producción de NO, contrario a lo que se podría pensar, por la regulación a la baja de la sintasa. Este hecho podría explicar el por qué se encontró disminuida la respuesta a la Ang II, en los animales con hipertensión inducida por L-NAME.

Algunos autores se han centrado en determinar la sobreexpresión de la NOS en este modelo de hipertensión (Pecháňová *et al.*, 2004), quienes observaron que la PA de las ratas con hipertensión es mantenida principalmente por el tono del sistema nervioso simpático, pero se propone que el NO producido

por la sobre expresión de la iNOS participa en la regulación de la PA bajo estas circunstancias.

Tales reportes podrían estar relacionados con los resultados obtenidos en este experimento, sugiriendo que la expresión o la actividad de la NOS pudieran estar sobre regulada como un mecanismo contrarregulador activado para compensar el incremento de la presión sanguínea, lo que parece contrarrestar el estímulo producido por la Ang II en los riñones de las ratas tratadas con L-NAME.

### **8.5 Participación de las proteínas Rho y Rac en la presión de perfusión basal**

Cuando hablamos de la presión de perfusión basal, nos referimos a la fuerza que ejerce la solución fisiológica sobre las paredes arteriales en un flujo constante y donde el riñón se encuentra en equilibrio teniendo como único estímulo el flujo de perfusión.

Un número de herramientas farmacológicas han sido empleadas para estudiar la función de la proteína Rho, éstas incluyen toxinas bacterianas entre las que se encuentra la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, la cual inactiva específicamente a los miembros de la subfamilia Rho, transfiriendo un monómero de ADP-ribosa a partir del NAD<sup>+</sup> irreversiblemente en el aminoácido asparagina en la posición 41 (Seasholtz y Brown, 2004).

Los resultados de los riñones de las ratas que recibieron tratamiento con el fármaco L-NAME y el inhibidor de la proteína Rho, presentaron una presión de perfusión basal mayor (**Tabla 5**), lo que podría indicar que la proteína Rho contribuye al tono vasodilatador en ausencia de estímulos químicos en la vasculatura renal.

Las vías de señalización en las que participa la proteína Rho, tienen funciones homeostáticas en condiciones fisiológicas. La activación de Rho en el músculo liso vascular es suficiente para producir vasoconstricción y de este modo aumentar la presión arterial; Rho también interactúa con las vías de señalización pro-inflamatorias desencadenando la activación de factores de crecimiento que producen cambios a nivel celular (Seasholtz y Brown, 2004).

Por otra parte, los efectos de las proteínas Rac sobre las células cardiovasculares son principalmente mediadas a través de la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina y la actividad del complejo NADPH oxidasa (Sawada *et al.*, 2010).

En la actualidad, el desarrollo del inhibidor específico de la proteína Rac1, NSC23766, ha impulsado la investigación del papel de Rac1. El avance técnico realizado con estas nuevas herramientas para inhibir específicamente la función de Rac1 *in vivo* ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento sobre el

papel de Rac1 en la fisiopatología vascular (Lorenzano *et al.*, 2010; Sawada *et al.*, 2010).

A diferencia del efecto observado de la inhibición de la proteína Rho sobre la presión de perfusión basal, la inhibición de Rac no induce un incremento de ésta (**Tabla 5**). Algunos autores han descrito que es necesaria la activación de Rac 1 para la expresión y actividad de la eNOS, de manera que hay una comunicación entre Rac1 y la eNOS que es independiente de las ROS (Sawada *et al.*, 2010). La ausencia de efecto sobre presiones basales se ha reportado también en arterias cerebrales (Loirand y Pacaud, 2010), lo que estaría sugiriendo que la proteína Rac1 no modula el mantenimiento del tono vascular basal.

## **8.6 Ensayos de Reactividad vascular**

### **8.6.1 Participación de la proteína Rho en la contracción vascular renal a la Angiotensina II**

Existen diferentes trabajos, donde investigaron el efecto del inhibidor de la proteína Rho (exoenzima C3 transferasa) en la contracción del músculo liso vascular, para lo cual utilizaron diferentes concentraciones del inhibidor en anillos arteriales de ratas normotensas, observando un efecto vasodilatador debido a la inhibición de la proteína, el cual fue dependiente de la concentración del inhibidor (Murakami *et al.*, 2009). En contraste con esta información, nosotros observamos un efecto diferente al inhibir la proteína Rho en el lecho vascular renal, lo cual

podría estar relacionado a la activación de otras vías de señalización dependientes de la Ang II (Olivares-Reyes *et al.*, 2009; Satoh *et al.*, 2011).

El aumento en la respuesta contráctil a la Ang II observado en el grupo L-NAME +C3 (**Figura 17B**), se atribuye al efecto producido por la hipertensión inducida por el L-NAME aunado a la inhibición de la proteína Rho, de acuerdo a lo ya reportado por Seasholtz y Brown (2004), donde se tiene que, en las células endoteliales, la señalización de Rho en su forma activa regula negativamente la producción del NO a través de la disminución de los niveles de la NOS. De tal manera que al estar activada esta proteína, se estaría disminuyendo la producción del NO, lo cual se observa como un aumento de la respuesta contráctil a la Ang II.

Se encuentra ampliamente descrita la participación de la proteína Rho mediando la contracción de las fibras de miosina, tal vía de señalización lleva a la vasoconstricción (Duong-Quy *et al.*, 2013). En teoría, al inhibir dicha proteína observaríamos una disminución en la respuesta a la Ang II, sin embargo, los resultados sugieren que el NO que se libera al inhibir dicha proteína aunado a la sobre-expersión de la NOS, debido a su inhibición crónica, actúe sobre otras vías de señalización como es el caso de la vía que se activa por la proteína Rac y el complejo NADPH oxidasa.

Estudios previos han demostrado que la producción de NO en las células endoteliales, así como en la señalización mediada por las células del músculo liso

vascular, son blancos y efectores de la señalización de Rho y Rac. En las células endoteliales, la señalización de RhoA y Rho cinasa regula negativamente la producción de NO a través de múltiples mecanismos. La activación de RhoA y Rho cinasa disminuyen la expresión de la eNOS debido a que reducen la estabilidad del mRNA de la eNOS. La proteína Rac tiene un efecto opuesto, promueve la transcripción del gen que codifica para la eNOS a través de la PKA incrementando la estabilidad del mRNA de la eNOS y aumentando la actividad de la eNOS (Loirand y Pacaud, 2010).

### **8.6.2 Participación de la proteína Rac en la contracción vascular renal a la Angiotensina II**

Aun cuando se ha reportado la activación de Rac por la Ang II, se desconoce mucha información acerca de su papel mediando la contracción de las células del músculo liso vascular (Loirand y Pacaud, 2010).

La proteína Rac es parte del complejo NADPH oxidasa, lo que se ha demostrado que juega un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia en el músculo liso vascular, así como en la función de la barrera endotelial por medio de la formación del anión superóxido entre otros radicales libres (Puetz *et al.*, 2009).

La disminución observada en la respuesta a la Ang II durante la inhibición de la proteína Rac (**Figura 18B**), se relaciona con la disminución del estrés

oxidativo. En trabajos previos, se ha reportado que la inhibición selectiva de Rac, reduce significativamente la actividad de la NADPH oxidasa y el estrés oxidativo, lo que contribuye a la disminución de la reactividad a la Ang II en los animales hipertensos (Loirand y Pacaud, 2010) De este modo, la disminución en la respuesta a la Ang II en ausencia de la proteína Rac es debida a que ya que no se activa el complejo NADPH oxidasa, por lo tanto, la producción de especies reactivas de oxígeno se encuentra disminuida y el NO liberado no interacciona con radicales libres ejerciendo un efecto vasodilatador.

Otros autores, realizaron experimentos donde colocaron segmentos de aorta expuestos al inhibidor NSC, observando que al inhibir la proteína Rac, disminuye significativamente la respuesta a la acetilcolina (ACh), tal efecto fue revertido al retirar del medio el NSC, lo que sugirió que la proteína Rac produce un incremento de la actividad de la NOS y la NADPH oxidasa (Selvakumar *et al.*, 2008)

Sin embargo, ahora se sabe que dependiendo del tipo de célula y estímulo arriba, la proteína Rac tiene efectos aparentemente opuestos. Es más probable, por lo tanto, que el efecto combinado de la inhibición de Rac sobre las enzimas eNOS y NADPH oxidasa altera la biodisponibilidad de NO, ya sea en una forma positiva o negativa (Sawada *et al.*, 2010).

## 8.7 Contracción inducida por el KCl en el lecho vascular renal

El KCl es frecuentemente usado como una herramienta para activar la contracción del músculo liso vascular independiente de la estimulación de receptores acoplados a las proteínas G, mediante la despolarización de la membrana, lo cual permite la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Ratz *et al.*, 2005; Puetz *et al.*, 2009).

Previamente, se ha reportado en tejidos como la aorta de rata, que el C3 ocasiona la inhibición de la contracción a KCl (Stähli *et al.*, 2011), tal efecto, resulta contrastante con nuestros datos, puesto que en el tejido renal no se modifica la respuesta al KCl en los tejidos que estuvieron expuestos a C3 comparados con aquellos que no lo estuvieron (**Figura 19**). Quizás esto podría sugerir que en el lecho vascular renal, la participación de la proteína Rho no es tan importante mediando la contracción a KCl como lo es en arterias de conductancia como la aorta.

Debido a que no hubo diferencias significativas entre los grupos evaluados, podemos concluir que el efecto observado no se debe a cambios en la maquinaria contráctil en la vasculatura renal la hipertensión inducida por L-NAME.

Por otra parte, en nuestros resultados no se observan diferencias significativas entre los grupos evaluados, en presencia del inhibidor de la proteína Rac (**Figura 20**), estos datos están de acuerdo a lo reportado en la literatura del

efecto del NSC sobre la contracción con KCl en anillos de aorta, en los cuales no se observó cambio en la contracción a KCl (Selvakumar *et al.*, 2008).

De manera que esto nos permite aseverar que el tratamiento con L-NAME, así como la inhibición selectiva de estas proteínas y la estimulación con la Ang II no alteran la maquinaria contráctil de la vasculatura renal en las ratas hipertensas ni en los controles.

## 9 CONCLUSIÓN

La hipertensión inducida por L-NAME disminuye la respuesta presora a la Ang II, fenómeno en el que se encuentran implicadas las proteínas G monoméricas.

Particularmente, la proteína Rho se encuentra mediando una respuesta inhibitoria ante el estímulo vasoconstrictor, mientras que la proteína Rac contribuye al incremento de la presión de perfusión tras el estímulo con Ang II; de modo que nuestros datos sugieren que la hipertensión inducida con L-NAME cursa con un aumento en la producción de ROS, lo que contribuye al mantenimiento de la presión arterial elevada.

## 10 PERSPECTIVAS

- ✚ Determinar la liberación de NO renal en este modelo, así como los cambios en la actividad de la NOS durante la inhibición de las proteínas Rho y Rac.
- ✚ Determinar el efecto de las proteínas Rho y Rac en el efecto vasopresor a la Ang II en un modelo de hipertensión esencial.
- ✚ Determinar el efecto de las proteínas Rho y Rac sobre el efecto vasopresor a la Ang II en el modelo de hipertensión inducido por L-NAME en un periodo de tratamiento más largo.
- ✚ Cuantificar la expresión de las proteínas Rho y Rac por Western Blot así como de la sintasa de óxido nítrico (NOS).

## 11 REFERENCIAS

- Barquera S., Campos-Nonato I., Hernández-Barrera L., Villalpando, S., Rodríguez-Gilabert C., Durazo-Arvizú R., Aguilar-Salinas C.A. (2010). Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex.* **52**: S63–S71.
- Bishop A.L., Hall A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* **348**: 241–255.
- Bourgoin F., Bachelard H., Badeau M., Mélançon S., Pitre M., Larivière R., Nadeau A. (2008) Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol.* **295**: H1044–H1055.
- Burridge K., Wennerberg K. (2004). Rho and Rac Take Center Stage. *Cell Press.* **116**: 167–179.
- Castro-Moreno P., Pardo J.P., Hernández-Muñoz R., López-Guerrero J.J., Del Valle-Mondragón L., Pastelín-Hernández G., Ibarra-Barajas M., Villalobos-Molina R. (2012). Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1–7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Autonomic and Autocoid Pharmacology.* **32**: 61–69.
- Cavanagh EMV, Inserra F, Ferder L. (2011). Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria?. *Circ Res.* **89**: 31–40.
- Corda D., Di Girolamo M. (2003). Funcional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* **22**: 1953–1958.

- Cruz M.C. (2001). Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México. *Arch Cardiol Mex.* **71**: S192–S197.
- Droual R. Chapter 19: Sistema renina angiotensina aldosterona (en línea). Disponible: [droualb.faculty.mjc.edu](http://droualb.faculty.mjc.edu). Consultado marzo del 2013.
- Duong-Quy S., Bei Y., Liu Z., Dinh-Xuan A.T. (2013). Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics.* **137**: 352–364.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT). (2012). Resultados nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública, México. Primera edición.
- Gao Y., Dickerson B., Guo F., Zheng J., Zheng Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *PNAS.* **101**: 7618–7623.
- Guyton A., Hall J. (2001). Formación de los riñones: filtración glomerular, flujo sanguíneo renal y su control. Fisiología médica. Mc Graw Hill. 10ª edición. Capítulo 26: 339–357.
- Hemstreet G.P. (1998). Sistemas renal y urinario. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo.* Capítulo 8 (1): 8.2–8.11.
- Higashi M., Yu J., Tsuchiya H., Saito T., Oyama T., Kawana H., Kitagawa M., Tamaru J., Harigaya K. (2010). Visualization of the Activity of Rac1 Small GTPase in a Cell. *Acta Histochem Cytochem.* **43** (6): 163–168.
- Ibarra M., Pardo J.P., López-Guerrero J.J., Villalobos-Molina R. (2000). Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and

spontaneously hypertensive rats: role of  $\alpha_{1D}$  and  $\alpha_{1A}$  adrenoreceptors in contraction. *Brit J of Pharm.* **129**: 653–660.

Jalil J., Lavandero S., Chiong M., Ocaranza M.P. (2005). La vía de señalización Rho/Rho-cinasa en la enfermedad y el remodelado cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* **58**(8): 951–961.

Kopincová J., Púzserová A., Bernátová I. (2012). L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator?. *Pharmacological Reports.* **64**: 511–520.

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680–685.

Loirand G., Pacaud P. (2010). The role of protein signaling in hypertension. *Nat Rev Cardiol.* **7**: 637–647.

Lorenzano P.M., Cardama G.A., Comin M.J., Alonso D.F., Gomez D.E. (2010). Rho GTPasas como blancos terapeuticos relevantes en cáncer y otras enfermedades humanas. *Medicina.* **70**: 555–564.

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

Luft F.C., Mervaala E., Müller D.N., Gross V., Schmidt F., Park J.K., Schmitz C., Lippoldt A., Breu V., Dechend R., Dragun D., Schneider W., Ganten D., Haller H. (1999). Hypertension-Induced End-Organ Damage: A New Transgenic Approach to an Old Problem. *American Heart Association.* **33**: 212–218.

- Lye H., Kuan C., Ewe J., Fung W., Liong M. (2009). The Improvement of Hypertension by Probiotics: Effects on Cholesterol, Diabetes, Renin, and Phytoestrogens. *Int J Mol. Sci.* **10**: 3755–3775.
- McClellan W., Young B. (2009). Los riñones y cómo funcionan (The Kidneys and How They Work). *National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse.* 1–16.
- Mehta P., Griendling k. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**: C82–C97.
- Murakami E., Iwata H., Imaizumi M., Takemura H. (2009). Prevention of arterial graft spasm by botulinum toxin: an in-vitro experiment. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery.* **9**: 395–398.
- Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009 (2011). Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. *Rev Mex Cardiol.* **22** (3): 115–144.
- Olivares-Reyes J.A., Arellano-Plancarte A., Castillo-Hernandez J.R. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **302**: 128–139.
- Padilla Salcedo S.I. (2011). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Semana: Hipertensión Arterial En México. *Secretaría de Salud.* **22**.
- Palm F., Nordquist L. (2011). Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **301**: R1229–R1241.

- Pecháňová O., Dobešová Z., Čejka J., Kuneš J., Zicha J. (2004). Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Hypertension*. **22 (1)**: 167–173.
- Pollock D.M., Polakowski J.S., Divish B.J., Opgenorth T.J. (1993). Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension*. **21**: 660–666.
- Ponnuchamy B., Khalil R.A. (2009). Cellular mediators of renal vascular dysfunction in hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **296**: R1001–R1018.
- Puetz S., Lubomirov L.T., Pfitzer G. (2009). Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology*. **24**: 342–356.
- Ramírez J.B., Palacios M., Gutiérrez O. (2006). Estudio del efecto antihipertensivo de *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Médica*. **37 (1)**.
- Ratz P.H., Berg K.M., Urban N.H, Miner A.S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calciumsensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C769–C783.
- Ribeiro M.O., Antunes E., Nucci G. de, Lovisolo S. M. and Zatz R. (1992). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. **20**: 298–303.
- Rivera-Jardón F.F., Castro-Moreno P., Figueroa-Guillén E.S., Gallardo-Ortíz I.A., Godínez-Hernández D., Ibarra-Barajas M. (2009). Angiotensin II Augments Renal Vasoconstriction *via* AT1 Receptors in L-NAME-induced Hypertensive Rats. *Proc West Pharmacol. Soc.* **52**: 47–49.

- Rolfe B.E., Worth N.F., World C.J., Campbell J.H., Campbell G.R. (2005). Rho and vascular disease. *Atherosclerosis*. **183**: 1–16.
- Rupérez M., Sánchez-López E., Blanco-Colio L.M., Esteban V., Rodríguez-Vita J., Plaza J.J., Egido J., Ruiz-Ortega M. (2005). The Rho-kinase pathway regulates angiotensin II-induced renal damage. *Kidney International*. **68**: S39–S45.
- Sachse A., Wolf G.(2007). Angiotensin II–Induced Reactive Oxygen Species and the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. **18**: 2439–2446.
- Satoh K., Fukumoto Y., Shimokawa H. (2011). Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **301**: H287–H296.
- Sawada N., Li Y., Liao J.K. (2010). Novel aspects of the roles of Rac1 GTPase in the cardiovascular system. *Current Opinion in Pharmacology*. **10**: 116–121.
- Sawada N., Salomone S., Kim H-H., Kwiatkowski D.J., Liao J.K. (2008). Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Postnatal Angiogenesis by Rac1. *Circ Res*. **103**: 360–368.
- Seasholtz T.M., Brown J.H. (2004). Rho Signaling in vascular diseases. *Mol Interv*. **6**: 348–357.
- Seasholtz T.M., Majumdar M., Brown J.H. (1999). Rho as a Mediator of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Molecular Pharmacology*. **55**: 949–956.
- Seko T., Ito M., Kureishi Y., Okamoto R., Moriki N., Onishi K., Isaka N., Hartshorne D.J., Nakano T. (2003). Activation of RhoA and Inhibition of Myosin

---

Phosphatase as Important Components in Hypertension in Vascular Smooth Muscle. *Circ Res.* **92**: 411–418

Selvakumar B., Douglas T., Hess D.T., Goldschmidt-Clermont P.J., Stamler J.S. (2008). Co-regulation of constitutive nitric oxide synthases and NADPH oxidase by the small GTPase Rac. *FEBS Letters.* **582**: 2195–2202.

Stähli B.E., Altwegg L., Lüscher T.F., Corti R. (2011). Acute myocardial infarction after botulinum toxin injection. *Q J Med.* **104**: 615–616.

Tan W., Palmby T.R., Gavard J., Amornphimoltham P., Zheng Y., Gutkind J.S. (2008). An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *The FASEB Journal.* **22**: 1829–1838.

Tobwin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**: 4350–4354.

Toda N., Ayajiki K., Okamura T. (2007). Interaction of Endothelial Nitric Oxide and Angiotensin in the Circulation. *Pharmacol Rev.* **59**: 54–87.