



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES A LA ANGIOTENSINA II
RENALES EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN LA RATA”**

Tesis que presenta

Lilia López Castillo

Para obtener el Grado de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Directores de la Tesis:

D.C. Daniel Godínez Hernández
Instituto de Investigaciones Químicas-Biológicas

M.C. Héctor Urquiza Marín
Instituto de Investigaciones Químicas-Biológicas

Morelia.Mich.

Noviembre de 2008.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Hipertensión arterial: definición y perspectiva actual.....	3
2. El sistema renina angiotensina en el control de la presión arterial	4
3. Receptores de la angiotensina II	5
3.1. El receptor AT ₁	6
3.2. El receptor AT ₂	7
3.3. Síntesis de Ang II.....	8
4. El desarrollo de la hipertensión genética	10
5. El sistema renina-angotensina en la hipertensión arterial.....	11
6. Efectos de la hipertensión en el riñon.....	12
7. Justificación	14
II. HIPÓTESIS.....	15
III. OBJETIVOS.....	15
1. Objetivo general	15
2. Objetivos particulares	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Protocolo experimental	16

2. Aislamiento del riñon de rata.....	16
3. Preparación de las muestras.....	17
4. Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry modificado.....	17
5. Análisis por Western Blot de los receptores AT ₁ Y AT ₂	18
5.1 Electroforesis.....	18
5.2 Transferencia.....	19
5.3 Bloqueo de las membranas e incubación con anticuerpos.....	19
5.4 Reacción quimioluminiscente.....	19
6. Mecanismos de acción de los fármacos.....	20
6.1. Efectos del L-NAME.....	20
6.2. Captopril.....	21
V. RESULTADOS.....	22
1. Peso de los animales.....	22
2. Detreminación de la concentración de proteínas.....	23
3. Determinación de la expresión de los receptores.....	24
3.1 Expresión del receptor AT ₁ y AT ₂ en corteza renal.....	24
3.2 Expresión del receptor AT ₁ y AT ₂ en medula renal.....	27
VI. DISCUSIÓN.....	29
VII. CONCLUSIONES.....	34
VIII. REFERENCIAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURA

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
HA	Hipertensión arterial
IP ₃	Trifosfato de inositol
k _i	Constante de inhibición
k _m	Constante de Michaelis
L-NAME	L-Arginina-N-Nitro-Metil Ester
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SRA	Sistema renina angiotensina
TFG	Tasa de filtración glomerular
U.A.	Unidades arbitrarias

RESUMEN

La presión arterial es un notable elemento de predicción de futuras afecciones cardiovasculares y se ha demostrado que el tratamiento de la hipertensión disminuye el riesgo de sucesos cardiovasculares patológicos.

La hipertensión arterial (HA) presenta una etiología poligénica y multifactorial aún sin definir de forma completa. En su génesis y progresión intervienen diversos sistemas y mediadores neurohormonales que determinan, en una fase inicial, un incremento del gasto cardíaco y posteriormente cambios estructurales y funcionales en las arterias de resistencia, responsables del establecimiento del proceso hipertensivo.

Dentro de los factores involucrados en el establecimiento de la HA, el sistema renina angiotensina (SRA) desempeña una participación preponderante. Se conoce que la angiotensina II (Ang II) es un potente vasoconstrictor que produce hipertrofia e hiperplasia en células del músculo liso vascular.

En el presente trabajo se analizó el efecto de inhibir o prolongar la síntesis de Ang II. Utilizando L-NAME (Inhibidor competitivo de la óxido nítrico síntasa (NOS)), captopril (Un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA)) y la combinación de ambos fármacos, en ratas de 5 semanas de edad, con tratamiento con L-NAME ($20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ durante 15 días), captopril ($5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ durante 15 días) Y Captopril-L-NAME ($5\text{-}20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ durante 15 días, respectivamente). Se identificó el receptor AT_1 y AT_2 . El captopril disminuye la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 , el L-NAME prolonga la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 , y la combinación de ambos produce una estimulación y al mismo tiempo una inhibición de la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 en el riñón.

I. INTRODUCCIÓN

1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL: DEFINICIÓN Y PERSPECTIVA ACTUAL

Se considera hipertensión cuando la presión arterial diastólica es superior a 90 mm Hg y la sistólica es mayor a 140 mm Hg, como promedio de dos o más mediciones de la presión arterial en cada una de dos o más visitas de oficina (The JNC 7 report, 2003). Este padecimiento es un factor de riesgo, y probablemente el principal, para padecer otras enfermedades cardiovasculares. A partir de 115/75 mm Hg, el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular se duplica con cada incremento de 20/10 mm Hg.

Las enfermedades cardiovasculares son el problema de salud pública más importante en las naciones industrializadas (Williams y Braunwald, 1994) y actualmente, en México, ocupan el primer lugar de las causas de morbilidad y mortalidad del paciente adulto. Se estima que existen en el mundo 600 millones de personas que padecen hipertensión arterial (HA), de éstas, 470 millones corresponden a los países en vías de desarrollo (Rosas, 2003) y se estima que 15 millones de mexicanos padecen HA y más de la mitad de los pacientes lo ignora (ENSA 2000, Velázquez et al., 2002).

Una de las causas más importantes de la hipertensión son las enfermedades renales y vasculares. Sin embargo, la HA presenta una etiología poligénica y multifactorial aún sin definir de forma completa. En su génesis y progresión intervienen diversos sistemas y mediadores neurohormonales que determinan, en una primera fase, un incremento del gasto cardíaco y posteriormente cambios estructurales y funcionales en las arterias de resistencia,

responsables del establecimiento del proceso hipertensivo (González y González, 2002).

La HA sistémica se caracteriza por un incremento variable de la carga mecánica (hemodinámica) y de la función neurohumoral sobre el sistema cardiovascular, este incremento es el responsable de diversos procesos degenerativos, agudos y crónicos, que afectan al corazón y a las arterias (González y González, 2002).

Uno de los sistemas más importantes en la regulación de la presión arterial es el sistema renina angiotensina (SRA), cuyo principal mediador es la angiotensina II (Ang II) está implicado de manera directa en el control de la HA y una alteración en la síntesis de la Ang II, puede implicar ya sea un aumento o una disminución de la presión arterial.

2. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL

El SRA posee importancia en la regulación de la presión arterial a plazos tanto cortos como largos. Los factores que disminuyen la presión arterial, los decrementos de volumen sanguíneo efectivo o la disminución de las resistencias periféricas totales, activan la liberación de renina en los riñones. El angiotensinogeno de origen hepático es degradado por la renina, una enzima producida en el riñón, para dar origen a la angiotensina I (Ang I), la cual se emplea para producir a la Ang II por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Además, el SRA se reconoce como un mecanismo para estimular la síntesis de aldosterona y secreción de la misma, y como un importante

mecanismo fisiológico en la regulación homeostática de la presión arterial y la composición de electrolitos de los líquidos corporales.

Directamente, la Ang II es un agente vasoconstrictor potente en células de músculo liso vascular; estimula a las células de la zona glomérulos de la corteza adrenal para sintetizar y secretar aldosterona que, a su vez, aumenta la reabsorción de sodio y agua en el riñón. También produce polidipsia e incrementa la secreción de hormona antidiurética, aumentando por ambos mecanismos los fluidos corporales. Indirectamente, la Ang II incrementa la frecuencia y la contractilidad del corazón a través de un aumento en el tono del sistema nervioso simpático (SNS), es decir, presinápticamente facilita la liberación de noradrenalina (Weir y Dzau, 1999).

Entre los mecanismos que regulan la presión arterial sistémica, el SRA desempeña una participación de crucial importancia, siendo la Ang II la principal responsable de los efectos cardiovasculares, a través de la estimulación del receptor AT_1 y AT_2 . La Ang II actúa por medio de mecanismos diversos, pero coordinados para aumentar la presión arterial normal. La Ang II regula procesos inmediatos, tempranos y tardíos.

3. RECEPTORES A LA ANGIOTENSINA II

Se han caracterizado dos subtipos del receptor para Ang II, tales subtipos se designan AT_1 y AT_2 (Bumpus y col., 1991). La disponibilidad de ligandos específicos, peptídicos y no peptídicos, permitió la caracterización de estos dos subtipos de receptores a la Ang II. Los receptores AT_1 y AT_2 presentan poca homología y sólo tienen 32 % de identidad en su secuencia de aminoácidos (Edwin et al., 1996).

3.1 El receptor AT₁

El receptor AT₁ es un miembro de la familia de los receptores acoplados a proteínas G, con siete regiones transmembranales y tiene 359 aminoácidos de longitud. El subtipo de receptor AT₁ se expresa de manera predominante en el tejido vascular y miocárdico, así como en cerebro, riñones y células glomerulosas suprarrenales, que secretan aldosterona.

En ratas y ratones, el receptor AT₁ presenta 2 isoformas, AT_{1a} y AT_{1b}, que presentan entre sí un 94% de homología en la secuencia de aminoácidos y tienen propiedades farmacológicas y un patrón de distribución tisular similares. La unión entre la Ang II y el receptor AT₁ induce un cambio conformacional en la molécula del receptor que promueve su interacción con la proteína G_{q/11}, que a su vez regulan la transducción de la señal a través de varios sistemas efectores en la membrana plasmática (Edwin et al., 1996).

La estimulación de los receptores AT₁ genera activación por medio de la proteína G, de tipo G_{q/11}, que está acoplada positivamente a la fosfolipasa C-β. Esta última es una enzima membranal que hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-difosfato para generar inositol-1,4,5-trifosfato y diacilglicerol. El inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) se une a receptores específicos y promueve la liberación intracelular de Ca⁺⁺, de las reservas de Ca⁺⁺ sensibles a IP₃, este fenómeno junto con el diacilglicerol activan a la proteína cinasa C, que entre otras cosas aumenta la entrada Ca⁺⁺ en la célula desde el exterior, debido a abertura de canales del Ca⁺⁺ localizados en la membrana celular. El Ca⁺⁺ se une a la calmodulina, y el complejo de Ca⁺⁺/calmodulina activa diversas enzimas intracelulares, como ATPasa y cinasas que contribuyen a la respuesta celular final (Edwin et al., 1996).

Las respuestas celulares a la activación del receptor AT_1 incluyen: contracción del músculo liso, síntesis de esteroides adrenales y secreción de aldosterona, activación y secreción neuronal, transporte iónico, crecimiento celular y proliferación. Además de estar acoplado a las vías de señalización reguladas por proteínas G, el ion Ca^{++} y la proteína cinasa C, el receptor AT_1 también se acopla a cascadas de señalización intracelulares que se extienden hasta el propio núcleo de la célula. Estas vías regulan la transcripción genética y la expresión de proteínas que controlan respuestas de crecimiento y proliferación celulares en varios tejidos blanco de la Ang II (De Gasparo et al., 2000).

El receptor AT_1 regula todos los efectos clásicos conocidos de la Ang II, tales como aumento en la presión sanguínea, vasoconstricción, incremento en la contractilidad cardíaca, liberación de aldosterona de la glándula adrenal, facilitación de la liberación de catecolaminas de las terminales nerviosas y reabsorción de sodio y agua en el riñón (Timmermans et al., 1993).

3.2 El receptor AT_2

La segunda isoforma de los receptores a la Ang II, son los receptores AT_2 , que tienen 363 aminoácidos de longitud y siete regiones transmembranales, se ha sugerido que este receptor se puede acoplar a más de una proteína G, sin existir hasta ahora consenso al respecto. Este receptor se expresa normalmente en tejidos fetales y disminuye su expresión rápidamente después del nacimiento.

En adultos, la expresión del receptor AT_2 es detectable en el páncreas, corazón, riñón, glándulas adrenales, miometrio, ovario, cerebro y vasculatura (Nahmias y Strosberg, 1995). El receptor AT_2 se expresa en animales después de daño cardíaco y vascular, así como durante la cicatrización y obstrucción renal, sugiriendo una participación de este tipo de receptor en el remodelamiento, el

crecimiento y/o el desarrollo. La participación funcional del receptor AT_2 es incierta. Bajo condiciones fisiológicas estos receptores pueden antagonizar efectos mediados por el receptor AT_1 y, por lo tanto, producir efectos como la vasodilatación, la inhibición del crecimiento y la diferenciación celular. Los receptores AT_2 median sus efectos cardiovasculares a través de 4 cascadas: 1) activación de fosfatasa y desfosforilación de proteínas, 2) regulación del sistema ON-GMPc, 3) estimulación de fosfolipasa A_2 y liberación de ácido araquidónico y 4) liberación de ceramidas derivadas de esfingolípidos (De Gasparo et al., 2000).

3.3 Síntesis de Angiotensina II

El descubrimiento de la sustancia presora en el extracto salino bruto del riñón, tuvo un vínculo obvio con la HA y su relación con la nefropatía. En este sentido, se informó que la renina era una enzima que actuaba sobre un sustrato de proteínas plasmáticas para catalizar la formación de un agente vasopresor, posteriormente se encontró que este sustrato plasmático es un péptido llamado angiotensinógeno. La renina es sintetizada, almacenada y secretada hacia la circulación renal por las células yuxtglomerulares granulares que yacen en las paredes de las arteriolas eferentes del riñón. Más tarde se reconocieron dos formas de angiotensina: el primero es un decapeptido (Ang I) y el segundo un octapeptido (Ang II), éste último es formado por el desdoblamiento enzimático de la Ang I por parte de la ECA (Edwin et al., 1996)

Se demostró que el riñón es importante en la regulación y que la angiotensina sintética, en volúmenes diminutos, estimula la producción de aldosterona en seres humanos. La renina es una enzima que actúa sobre el angiotensinogeno (sustrato de renina) rompe el enlace entre los residuos 10 y 11 en el amino terminal de esta proteína para catalizar la formación del decapeptido Ang I. Los incrementos de la presión arterial bloquean la liberación de renina. A continuación, este decapeptido

se desdobra mediante la ECA para dar como resultado el octapéptido Ang II (Imai y col., 1983; Sielecki y col., 1989).

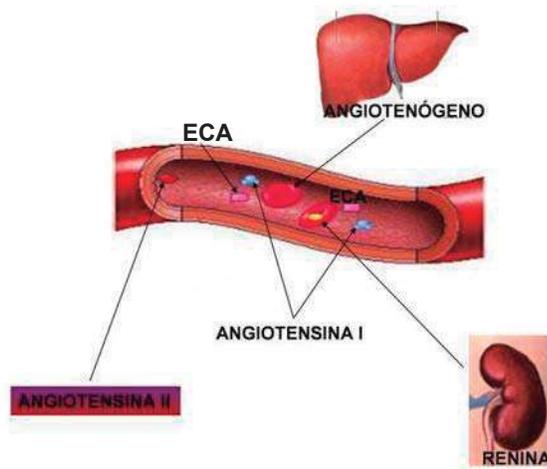


Figura 1. Sistema renina-angiotensina. El angiotensinógeno, sintetizado en el hígado, se corta por la renina para formar a la angiotensina I que por acción de la ECA se transforma en angiotensina II.

El angiotensinogeno se sintetiza de manera primaria en el hígado, aunque el RNAm que codifica para la proteína también es abundante en la grasa, en algunas regiones del sistema nervioso central (SNC) y en el riñón (Campbell y Habener, 1986; Cassis et al., 1988). Las concentraciones circulantes de angiotensinógeno son casi iguales a la constante de Michaelis (K_m) para el sustrato de la renina (alrededor de $1 \mu\text{M}$), las concentraciones de angiotensinógeno se relacionan con hipertensión (Jeunemaitre et al., 1992). La ECA se descubrió en el plasma, como el factor del cual depende la conversión de angiotensina I en Ang II (Skeggs, 1984).

En resumen la renina circulante de origen renal actúa sobre el angiotensinogeno circulante de origen hepático para producir Ang I en el plasma; la ECA plasmática y la del endotelio pulmonar convierte a la angiotensina I

circulante en Ang II; esta última se libera hacia sus órganos blancos por medio del torrente sanguíneo, donde induce la respuesta fisiológica.

4. EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN GENÉTICA

No hay duda de que la hipertensión arterial en humanos o en animales es causada por un aumento en las resistencias sistémicas, y una gran parte de éstas, se debe a cambios en la pared de los vasos de resistencia. Sin embargo, la interacción entre la estructura y la función de la pared arterial junto con la importancia de la presión de distensión, tanto para la regulación a corto término así como para la adaptación a largo plazo, de la pared de los vasos pueden enmascarar mecanismos vasoactivos importantes, como el SRA, que contribuyen a un aumento en las resistencias vasculares en ratas hipertensas.

De hecho, el bloqueo crónico de tal sistema vasoconstrictor, que realmente está encendido en el estado prehipertensivo, atenúa el desarrollo de hipertensión y previene de la hipertrofia vascular no sólo por la eliminación de efectos específicos promotores del crecimiento, sino también por la ausencia de presión de distensión elevada. Una vez establecida la hipertensión, el bloqueo de estos sistemas disminuye el tono vascular, pero no afecta los cambios en la reactividad vascular relacionados con la hipertrofia de la pared vascular inducida por la influencia a largo plazo del sistema involucrado (Zicha y Kuneš, 1999).

El aumento en la resistencia vascular sistémica es parcialmente causado por una disminución en el lumen arteriolar, debido al engrosamiento de la túnica media o remodelamiento. En animales con hipertensión, la hipertrofia de las paredes de los vasos sanguíneos es paralela al aumento de la presión arterial y de la resistencia sistémica, que alcanzan su pico máximo entre la tercera y la décima semana de edad (periodo crítico juvenil). Por otra parte, la disminución relativa del tamaño del lumen arteriolar parece ser independiente de la edad (Borkowski, 1991; Prewitt et al., 1982).

Se ha reportado la presencia de cambios funcionales basados en alteraciones estructurales en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 4-5 semanas, como son un aumento en la sensibilidad, una respuesta contráctil mayor y una disminución en la distensibilidad de la pared de los vasos (Folkow y Karlstrom, 1984; Kong et al., 1991; Mueller, 1983; Rizzoni et al., 1994), que se desarrollaron paralelamente con la progresión de la hipertensión y se han asociado con el remodelamiento de los vasos (Folkow, 1990; Korner et al., 1991; Mulvany y Aalkjaer, 1990). Por otra parte, la sensibilidad aumentada de la contracción vascular al Ca^{2+} extracelular y una mayor sensibilidad a la noradrenalina son anormalidades características de los animales SHR, incluso desde estadios prehipertensivos y permanecen aumentadas cuando avanza la edad (Mulvany et al., 1980; Mulvany y Nyborg, 1980).

5. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La importancia de este sistema en la patogénesis de la hipertensión se soporta por el hecho de que el bloqueo de SRA con terapia génica (Iyer et al., 1996; Lu et al., 1997; Phillips et al., 1997) o por intervenciones farmacológicas con inhibidores de la ECA o antagonistas AT_1 en el periodo crítico juvenil (Harrap et al., 1990; Morton et al., 1992; Paull y Widdop, 2001; Bergström et al., 2002) puede atenuar o prevenir el desarrollo de la hipertensión.

Resulta interesante que algunos componentes del SRA están incrementados en ratas SHR jóvenes, como los niveles del RNAm de la renina (Samani et al., 1989), la actividad de la renina plasmática, la concentración de angiotensinógeno plasmático (Ruiz et al., 1990; Zicha y Kunes, 1999) y la liberación renal de renina (Henrich y Levi, 1991; Zicha y Kunes, 1999) y estas alteraciones pueden contribuir en la patogénesis de la hipertensión arterial. Por otro lado, existen también signos de hiperactividad cerebral del SRA en SHR jóvenes.

La actividad del SRA renal, junto con una respuesta mayor a la Ang II en el riñón, puede explicar por qué la disminución en la función de los receptores AT₁, en etapas tempranas, causa atenuación a largo término del desarrollo de la hipertensión. Por otra parte, la contribución de los efectos, directos e indirectos, de la Ang II en el aumento del tono vascular y de la hipertrofia de la pared los vasos de resistencia permanecen sin ser aclarados.

6. EFECTOS DE LA HIPERTENSIÓN EN EL RIÑÓN

Dentro de los riñones se realiza la filtración glomerular de la sangre. Una alta filtración glomerular es esencial para mantener estable y óptimos los niveles extracelulares de solutos y agua.

El riñón es el encargado de sintetizar la renina necesaria para mantener los niveles de Ang II y mantener una presión arterial normal. La renina es un elemento que proviene del aparato juxtaglomerular y representa en si misma un mecanismo de regulación. Este mecanismo regulatorio se presenta cuando disminuye la presión de la arteria renal que alimenta a varias arteriolas eferentes.

Las arteriolas eferentes al detectar la disminución de la presión en la pared, activan a los baroreceptores y directamente las células granulares vecinas, que a su vez aumentan la liberación de renina a la circulación y con ello se inicia la cascada de eventos que culmina en el efecto vasoconstrictor de la Ang II, que aumenta la presión de estas en respuesta al decremento de la presión de la arteria renal. Esta secuencia de eventos es un mecanismo primordial para controlar los niveles plasmáticos de renina (Boron et al., 2005).

Las reducciones del flujo sanguíneo renal atenúan mucho la función excretora del riñón y la Ang II reduce el flujo sanguíneo renal al contraer de manera directa el músculo liso vascular renal, al aumentar el tono simpático renal, y al facilitar la neurotransmisión noradrenérgica renal. La Ang II también influye sobre la tasa de filtración glomerular (TFG) de manera variable. Por otro lado, la Ang II origina varios efectos que pueden alterar la TFG, como son: la constricción de las arteriolas aferentes que reduce la presión intraglomerular y tiende a disminuir la TFG y la contracción de la célula mesangial que aminora el área de superficie capilar disponible para la filtración dentro del glomérulo (Hall et al., 1981).

De este modo, el bloqueo del SRA puede causar insuficiencia renal aguda en personas con estenosis bilateral de la arteria renal, o en aquellas con estenosis unilateral que sólo tienen un riñón (Hricik et al., 1983). Además, la Ang II genera efectos pronunciados sobre la función renal para reducir la eliminación urinaria de Na^+ y agua, en tanto incrementa la excreción de K^+ .

La Ang II, al contraer las arteriolas eferentes, ayuda a conservar la filtración glomerular adecuada cuando la presión de perfusión renal es reducida. La inhibición de la ECA favorece la aparición de insuficiencia renal aguda en sujetos con estenosis bilateral de arteria renal, o con estenosis de la arteria que riega al riñón restante. Asimismo, los inhibidores de la ECA reducen la filtración glomerular en individuos con insuficiencia cardiaca congestiva grave, o en pacientes con insuficiencia cardiaca que han recibido tratamiento excesivo con diuréticos.

7. JUSTIFICACIÓN

El buen funcionamiento del riñón es necesario para tener un buen control de la presión arterial normal. Una mala regulación de este sistema puede implicar alteraciones en la presión arterial y puede ser causa de la hipertensión.

Se sabe también que el riñón logra a ser un órgano clave de la regulación de la presión arterial porque en el inicia en SRA que junto con el SNC tienen una contribución muy importante al control de la presión arterial y sin duda alguna el riñón es un órgano blanco de la hipertensión.

En ese contexto no se conoce como la HA influye sobre la expresión de los receptores AT₁ y AT₂ renales en el modelo de hipertensión con L-NAME, que es un modelo en el cual está implicado el SRA.

II. HIPÓTESIS

Existen cambios en la proporción de los receptores a la angiotensina II tipo AT₁ y AT₂ en el riñón durante la hipertensión arterial inducida por L-NAME.

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles proteicos de los receptores a la angiotensina II tipo AT₁ y AT₂ en la corteza y en la médula renales durante la hipertensión arterial inducida por L-NAME.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los niveles proteicos de los receptores a la angiotensina II tipo AT₁ en la corteza y en la médula renales durante la hipertensión arterial inducida por L-NAME.

Determinar los niveles proteicos de los receptores a la angiotensina II tipo AT₂ en la corteza y en la médula renales durante la hipertensión arterial inducida por L-NAME.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En los estudios realizados se emplearon ratas Wistar de 250-300 g. Las ratas se introdujeron en jaulas, por grupo, con acceso libre a agua y alimento.

Los animales se dividieron en 4 grupos:

- 1) Solucion Salina,
- 2) L-NAME (20mg/Kg),
- 3) Captopril (5mg/Kg),
- y 4) Captopril (5mg/Kg)-L-NAME (20mg/Kg).

Se pesaron los animales diariamente para ajustar la dosis y los fármacos se administraron por vía oral en el agua de bebida.

Una vez completados los tratamientos (15 días) los animales fueron empleados en los estudios moleculares.

2. AISLAMIENTO DEL RIÑÓN DE RATA

Los animales se sacrificaron y se expusieron los riñones izquierdos por medio de una insición abdominal y se perfundieron con solución de Krebs. Posteriormente, los riñones se disecaron y se tomaron muestras de corteza y médula renales.

3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras aisladas de riñón de los animales de los 4 grupos (n = 6 por grupo) se homogenizaron individualmente con ayuda de un homogenizador (Polytron; Kinematica AG Littau; Switzerland) en solución Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), estabilizador de la fuerza iónica (NaCl 5 M), un inhibidor de proteasas (PMSF), detergente para lisar la membrana (triton, SDS), se mantuvo en frío la solución.

Se colocaron 50 mg de tejido en 1 ml de solución RIPA, donde se homogenizó, se centrifugó por 5 min a 10000 rpm, se desechó el precipitado y se recuperó el sobrenadante el cual se almacenó a 4 °C.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINA POR EL MÉTODO DE LOWRY MODIFICADO

Se agregó 125 µl de reactivo A' (1 ml de reactivo A mas 20 µl de reactivo S) y 1000 µl de B a cada una de las diluciones. Después se prepararon las muestras (10 µl) a las cuales se les agregó la misma cantidad de reactivo reactivo A' y B (kit de determinación de proteína Bio-Rad). Una vez preparadas las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 750 nm. Por último se obtuvieron las concentraciones de cada una de las muestras a partir de la curva patrón (Tabla 1).

Tabla 1. Volúmenes (μl) de la solución patrón de albúmina (μl) y de agua para la realización de la curva patrón.

Solución patrón BSA (μl)	H₂O (μl)
0	50
12.5	43.75
25	37.5
37.5	25
43.75	12.5
50	0

5. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS RECEPTORES A LA ANGIOTENSINA II AT₁ Y AT₂ EN RIÑÓN

5.1 Electroforesis

Se mezclaron alícuotas de las muestras con una misma cantidad de Laemilli (buffer de carga) que contenía un 2 % de β -mercaptoetanol (un agente reductor) y se hirvieron (a $\approx 100^{\circ}\text{C}$ durante 5 min) y se agregó urea (5 M) para desnaturalizar a las proteínas.

Se prepararon geles para SDS-PAGE al 10% y se cargó una cantidad de proteína constante (50 μg) de la muestra, en otro pozo se cargaron 10 μl de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas a 110 V, para separar las proteínas en función de su peso molecular en un campo eléctrico.

5.2 Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (floruro de polivinildieno) empleando un equipo de transferencia en semiseco (Bio-Rad) durante 45 min a 15 V.

5.3 Bloqueo de las membranas e incubación con anticuerpos

Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de buffer de lavado TBS-Tween con un 5 % leche baja en grasas, durante 12 h a temperatura ambiente.

Después, las membranas se incubaron con anticuerpo policlonal de cabra contra los receptores AT₁, AT₂ (\approx 40 kDa) o contra α -actina (\approx 43 kDa; Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:500, en TBS-Tween con leche 1% a temperatura ambiente durante 4 h, con agitación continua.

Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween durante 15 min y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-cabra; Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:500 en TBS-Tween con leche 1% durante 4 h a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con TBS-Tween durante 15 min.

5.4 Reacción quimioluminiscente

Las membranas se incubaron con sustrato quimioluminiscente (Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante, posteriormente se expusieron a una película. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3200C (Hewlett Packard) y las imágenes se guardaron en una computadora. La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (Quantity

One 1-D Image Analysis Software; Bio-Rad) y se normalizaron con la intensidad de la α -actina (proteína control).

6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS USADOS

6.1 N ω -NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-NAME)

El N ω -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) provoca en las ratas una deficiencia crónica de óxido nítrico, un agente vasodilatador endotelial, que conlleva a alteraciones funcionales marcadas tanto en el endotelio como en el músculo liso vascular, por la inhibición de las sintasas de óxido nítrico (NOS).

El NO es generado por el endotelio vascular a partir de la L-arginina. La infusión de L-NAME provoca efectos inhibitorios específicos, aumentando la resistencia vascular en muchos órganos incluyendo la circulación renal (figura 2).

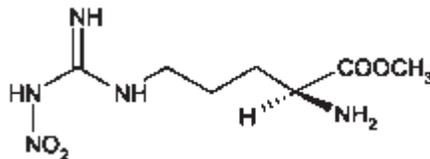


Figura 2. Estructura molecular de N ω -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

6.2 CAPTOPRIL

El captopril es un inhibidor potente de la ECA y el primero de ellos que se comercializó (figura 3). Presenta una constante de inhibición (K_i) 1.7 nM. Las concentraciones plasmáticas máximas ocurren en el transcurso de una hora, y el fármaco se elimina con rapidez (la vida media es de aproximadamente de dos horas). La mayor parte del fármaco se elimina intacto en la orina, 40 a 50%, y el resto como dímeros disulfuro de este último y disulfuro de captopril-cisteína.

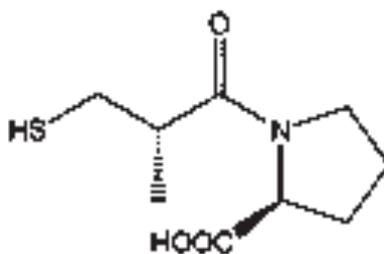


Figura 3. Estructura molecular del captopril.

V. RESULTADOS

1. PESO DE LOS ANIMALES

Los animales se pesaron diariamente y al analizar los datos se observó un aumento conforme avanzó la edad de las ratas, en ambas cepas y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Por otro lado, ni tratamiento con captopril ni con L-NAME modificaron el peso en ningún caso (figura 4). Sin embargo, los animales aumentaron alrededor de 100 g en los 15 días que duró el tratamiento.

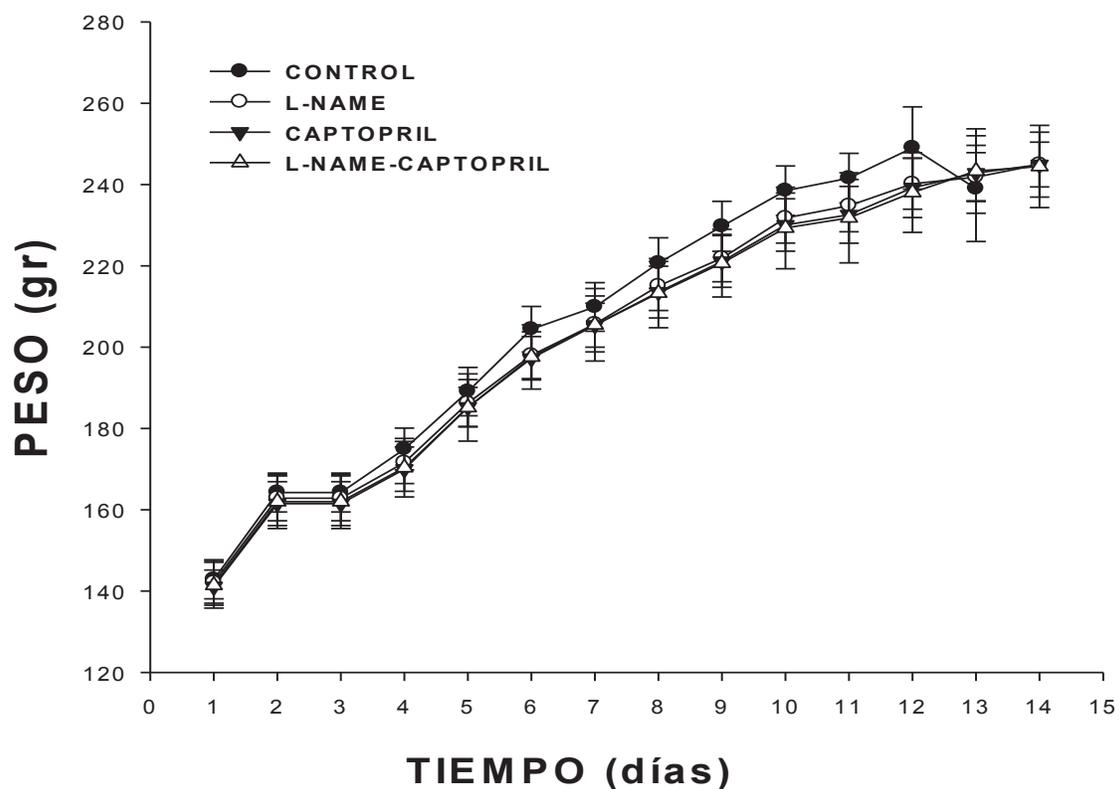


Figura 4. Valores de peso (g) de los animales de los grupos control, L-NAME, captopril y L-NAME-captopril, durante la duración de los tratamientos (15 días). Cada valor representa el promedio \pm el error estándar de 6 animales.

2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se realizó utilizando el método de lowry modificado y una vez obtenidos los datos, se utilizó el programa de software de Microsoft Office Excel para obtener las regresiones lineales y en todos los casos el valor del coeficiente de correlación (R^2) fue superior a 0.9. Con las curvas de calibración graficadas se obtuvo la concentración de proteínas extrapolando las lecturas obtenidas de cada una de las muestras de los diferentes grupos.

3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES AT₁ y AT₂

3.1 Expresión del receptor AT₁ y AT₂ en la corteza renal

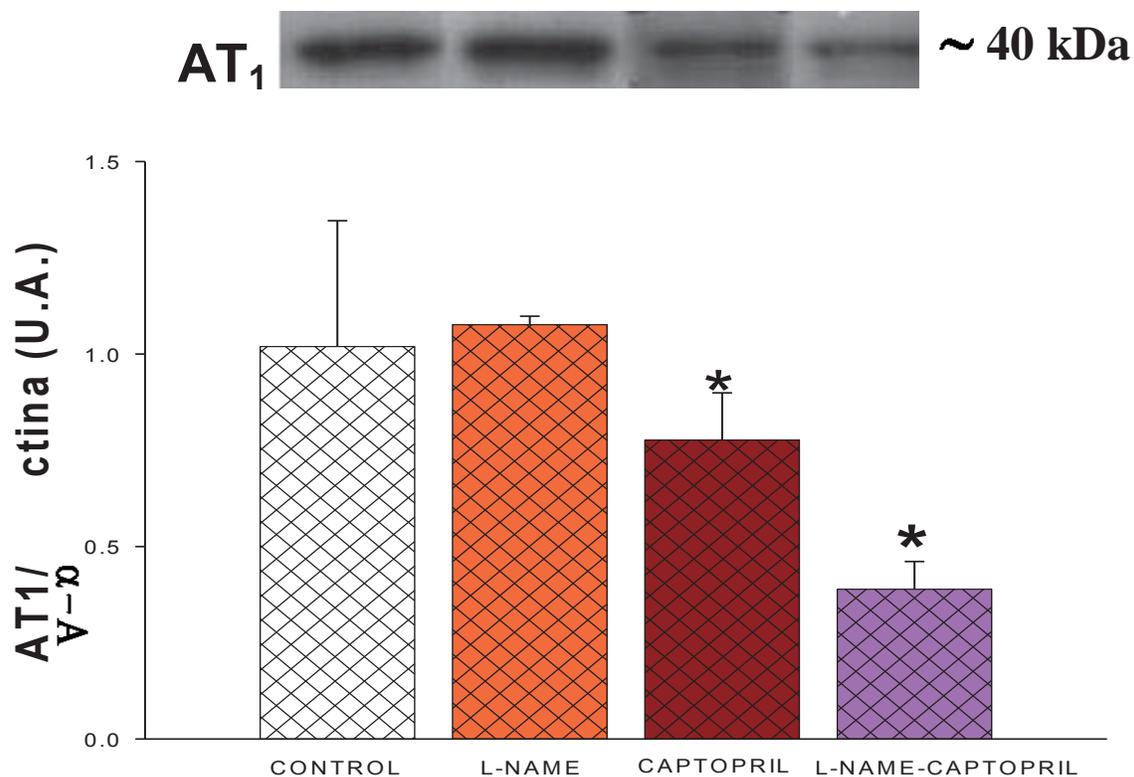


Figura 5. En el panel A se muestran bandas representativas de un experimento típico, Panel B, valores de expresión relativa (AT₁/ α -actina; U.A.) en la corteza renal de animales de los grupos control, L-NAME, captopril y L-NAME-captopril, después de los tratamientos (15 días). Cada valor representa el promedio \pm el error estándar de 6 animales. ($p < 0.05$; SNK).

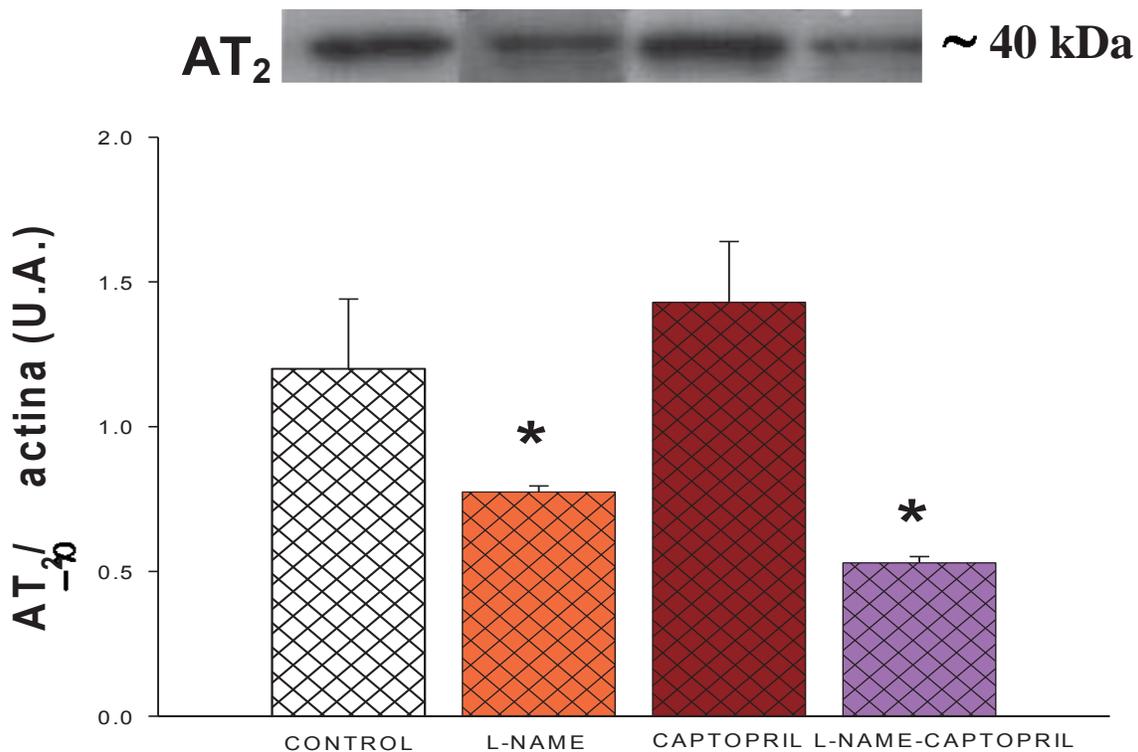


Figura 6. En el panel A se muestran bandas representativas de un experimento típico, Panel B, valores de expresión relativa (AT₂/α-actina; U.A.) en la corteza renal de animales de los grupos control, L-NAME, captopril y L-NAME-captopril, después de los tratamientos (15 días). Cada valor representa el promedio ± el error estándar de 6 animales. (p < 0.05; SNK).

Cuando se analizó la expresión del receptor AT₁ en la corteza renal se observó que existen niveles basales de expresión del receptor mencionado y que el L-NAME no modificó esta expresión basal. Por otro lado, en el mismo tejido de los animales tratados con captopril se produjo una disminución significativa de la expresión del receptor AT₁ (p>0.05). Sin embargo, en la corteza renal del grupo tratado con L-NAME y captopril se observó una disminución, aun mayor que la del grupo captopril, de aproximadamente el 60%, en la expresión del receptor AT₁ (p<0.05; figura 5).

En la figura 6 se muestra la expresión del receptor AT₂ en la corteza renal y se observa que existe una expresión basal de este receptor, igual que el receptor AT₁, sin embargo el L-NAME indujo una disminución de la expresión de aproximadamente el 40 %. El captopril no produjo cambios en la expresión con respecto al grupo control y tampoco modificó la disminución observada para el L-NAME cuando se administró junto con este último.

Cabe resaltar que en la corteza renal tanto el L-NAME como el captopril produjeron efectos diferenciales sobre la expresión de los receptores AT₁ y AT₂, es decir, el L-NAME no modificó la expresión de los receptores AT₁ pero disminuyó la de los AT₂ y el captopril disminuyó la expresión de los receptores AT₁ sin modificaciones en la expresión de los AT₂.

Además, la combinación de los tratamientos L-NAME y captopril tuvo un efecto tipo potenciación sobre la disminución de la expresión observada en cada tratamiento individual ($p < 0.05$; figuras 5 y 6).

3.2 Expresión del receptor AT₁ y AT₂ en la médula renal

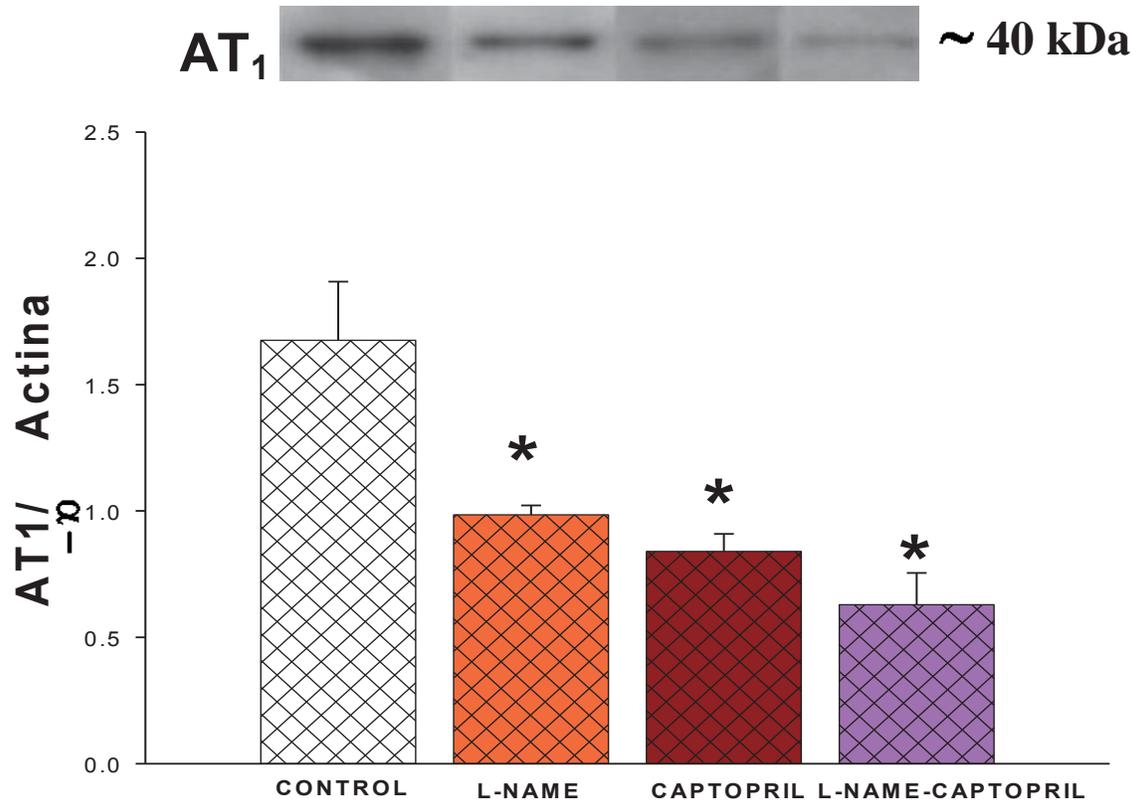


Figura 7. En el panel A se muestran bandas representativas de un experimento típico, Panel B, valores de expresión relativa (AT₁/α-actina; U.A.) en la médula renal de animales de los grupos control, L-NAME, captopril y L-NAME-captopril, después de los tratamientos (15 días). Cada valor representa el promedio ± el error estándar de 6 animales. (p < 0.05; SNK).

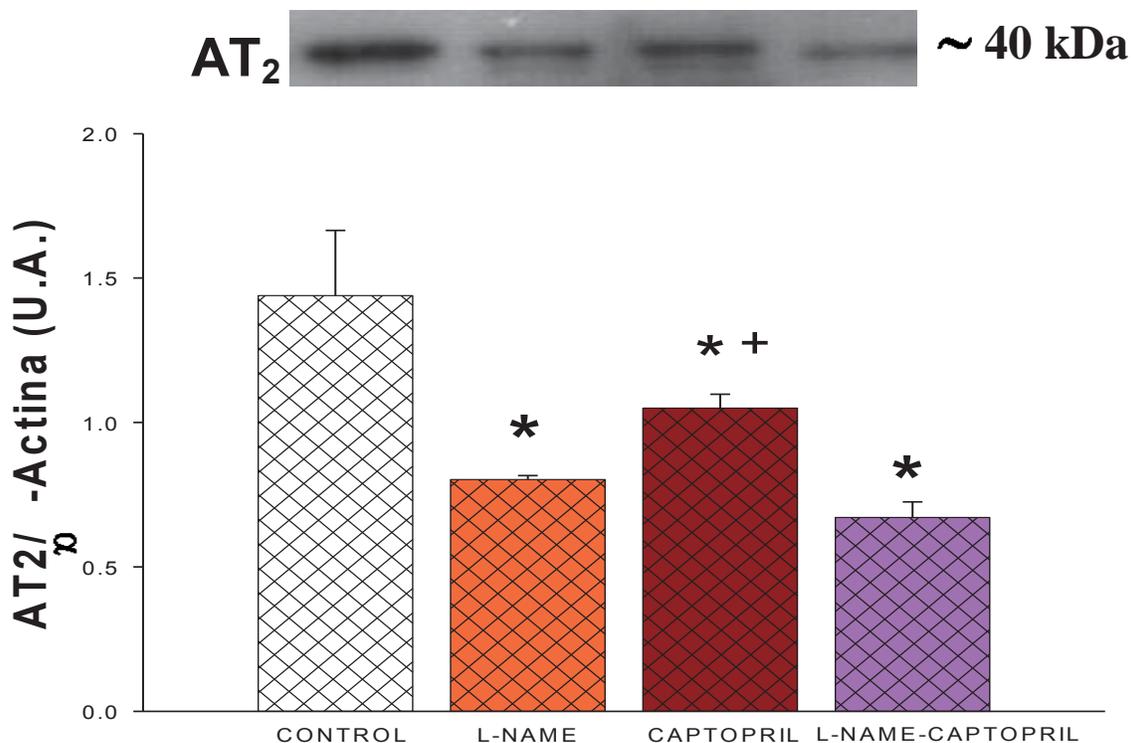


Figura 8. En el panel A se muestran bandas representativas de un experimento típico, Panel B, valores de expresión relativa (AT_2/α -actina; U.A.) en la médula renal de animales de los grupos control, L-NAME, captopril y L-NAME-captopril, después de los tratamientos (15 días). Cada valor representa el promedio \pm el error estándar de 6 animales. ($p < 0.05$; SNK).

Al analizar la la expresión del receptor AT_1 en la médula renal el L-NAME, el captopril y la combinación de ambos disminuyeron de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$), del 50% aproximadamente, la expresión de dicho receptor y la disminución se presentó en mayor grado con la combinación (figura 7).

La figura 8 muestra la expresión del receptor AT_2 en la médula renal y, al igual que el receptor AT_1 , el L-NAME y el captopril indujeron una disminución de la expresión. Sin embargo, el L-NAME produjo una disminución mayor (del 50%, aproximadamente) que el captopril (40 %). La coadministración de L-NAME y captopril no produjo cambios en la expresión con respecto al grupo L-NAME.

VI. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este trabajo fueron:

Se observó que en la corteza renal el L-NAME produjo una disminución de la expresión de los receptores AT_2 , sin modificar la expresión de los AT_1 ; el captopril disminuyó la expresión de los receptores AT_1 , pero no la de los AT_2 ; y la combinación L-NAME/captopril potenció los efectos de los 2 agentes anteriores, aplicados de manera individual, sobre los receptores respectivos.

En la médula renal, tanto el L-NAME como el captopril administrados individualmente como de manera conjunta disminuyeron la expresión de ambos tipos de receptores.

Se sabe que la Ang II intrarrenal no se distribuye de manera homogénea pero está distribuida tanto en el compartimento regional como en el segmental (Navar et al., 2001). Estudios recientes indicaron que los niveles de Ang II en la médula son más altos que los niveles corticales en ratas normales y se incrementan aún más en las ratas hipertensas por infusión de Ang II (Navar et al., 1997). En la médula renal, la combinación de los niveles altos de Ang II con la alta densidad de receptores a la misma, sugiere que la Ang II ejerce una influencia muy importante en la regulación de la hemodinámica y de la función tubular en la médula renal (Harrison-Bernard et al., 2002; Pendergrass et al., 2006).

Los niveles altos de Ang II en la médula sugieren que existe, probablemente, una especialización de las vías de formación de la Ang II o la existencia de mecanismos de acumulación en el tejido medular que están sujetos a la regulación local. Sin embargo, otros autores no han podido confirmar que el contenido de Ang II en la médula es mayor que en la corteza (Ingert et al. 2002a,b). Estos autores publicaron que los niveles de Ang II en la corteza y en la

médula son equivalentes y que responden de manera similar a alteraciones de la ingesta de sal en la dieta.

Dentro de la corteza, hay una distribución de la Ang II en el fluido intersticial, en el fluido tubular y en los compartimientos intracelulares.

En nuestros resultados, los efectos diferenciales sobre la expresión de los receptores AT₁ y AT₂ en la médula y corteza pueden deberse a la sensibilidad diferencial a la Ang II en estos sitios anatómicos del riñón o bien a las diferencias de tejido influenciadas por las demandas locales, dentro de la regulación de la función renal.

En este sentido, observamos que en la corteza la expresión del receptor AT₁ está influenciada por la Ang II (figura 5) mientras que la expresión del receptor AT₂ no tiene esa influencia (figura 6). En la médula renal cambia el panorama, se observó que la expresión de ambos receptores depende de la Ang II (figuras 7 y 8).

La mayoría de las acciones de la Ang II sobre la función renal son consecuencia de la activación de receptores específicos, que están ampliamente distribuidos en varias regiones y en varios tipos celulares en el riñón. Se han descrito, caracterizado farmacológicamente y clonado 2 categorías de receptores a la Ang II, el tipo 1 (subtipos 1a y 1b) y el tipo 2 (Murphy et al., 1991; Sasamura et al., 1992; Nakajima et al., 1993). Sin embargo, la mayoría de los efectos hipertensogénicos de la Ang II son atribuidas generalmente a los receptores AT₁ (Ito et al., 1995).

El transcrito del receptor AT₁ se ha localizado en túbulos proximales, porción ascendente gruesa del asa de Henle, glomérulo, vasculatura arterial, vasa recta, arterias del arcuato y en las células yuxtaglomerulares (Tufro-McReddie et al., 1993b). En roedores, hay 2 subtipos del receptor AT₁, siendo el receptor 1a el predominante en todos los segmentos de la nefrona, mientras el tipo 1b es más abundante que el tipo 1a en el glomérulos (Bouby et al., 1997). En el riñón maduro, los receptores tipo 1a se localizan en las membranas luminal y basolateral de varios segmentos de la nefrona, así como en la microvasculatura renal tanto en la corteza como en la médula renales, en las células musculares lisas de las arteriolas aferentes y eferentes, en las células epiteliales de la porción ascendente gruesa del asa de Henle, en la membrana proximal tubular apical y basolateral, en las células mesangiales, túbulos distales, túbulos colectores y en las células de la mácula densa (Paxton et al., 1993; Harrison-Bernard et al., 1997; Miyata et al., 1999).

En condiciones hipertensivas, la regulación intrarrenal de los receptores a la Ang II es compleja debido a que los receptores vasculares y tubulares responden diferencialmente cuando hay estadios de concentraciones altas de Ang II (Navar et al., 2002). En general, niveles altos de Ang II están asociados con una disminución en la expresión del receptor AT₁ y un aumento en los receptores AT₁ tubulares, debido a una dieta baja en sodio (Cheng et al., 1995).

En ratas hipertensas Goldblatt, se ha demostrado que los receptores AT₁ glomerulares disminuyeron 2 semanas después del pinzamiento del riñón y los receptores vasculares no disminuyeron hasta las 16 semanas (Amiri and Garcia, 1997). Sin embargo, en el modelo de hipertensión por infusión de Ang II en la rata, los niveles totales de RNAm del receptor AT₁ en riñón se mantuvieron tras 2 semanas de infusión, a pesar de causar una hipertensión marcada (Harrison-Bernard et al., 1999). Además, se encontró una regulación a la baja de los receptores AT₂ sólo en los receptores isquémicos.

En ratas hipertensas transgénicas que expresan el gen de la renina de ratón *Ren2*, Zhuo y colaboradores (1999) encontraron un aumento del receptor AT₁, por estudios de unión con radioligandos, en las células del músculo liso vascular de la arteriola aferente y eferente, aparato yuxtaglomerular, células mesangiales glomerulares, células del túbulo proximal y células intersticiales renoglomerulares. Lo anterior sugiere que existe una regulación a la alta de los receptores AT₁ en células renales múltiples puede contribuir a la patogénesis de la hipertensión en esas ratas. Harrison-Bernard y colaboradores (2002) reportaron que existe una respuesta diferencial a la Ang II, medida por autorradiografía, con disminuciones significativas en el glomérulo pero no en los túbulos proximales en ratas con infusión de Ang II. Adicionalmente, la unión (cantidad) de la ECA se incrementó significativamente en los túbulos proximales de las ratas con infusión de Ang II. De esta manera, los receptores AT₁ vasculares y glomerulares están regulados a la baja, sin embargo, hay una regulación a la alta o no hay alteraciones significativas en los receptores tubulares en la hipertensión dependiente de Ang II.

La observación de que la expresión de los receptores AT₁ tanto de la médula como de la corteza son dependientes de Ang II puede sugerir que los receptores a la AT₁ regulan positivamente su propia expresión al ser estimulados por la Ang II.

El receptor AT₂ se expresa en gran cantidad en el mesénquima renal tanto en el humano como en los roedores durante la vida fetal y disminuye dramáticamente después del nacimiento (Norwood et al., 2000).

Los receptores AT₂ se localizan en las células epiteliales glomerulares, túbulos proximales, túbulos colectores y partes de la vasculatura renal de la rata adulta (Miyata et al., 1999). Sin embargo, la participación de los receptores AT₂ en la regulación de la función renal permanece incierta y se ha sugerido que la activación de los receptores AT₂ contrarresta los efectos AT₁, en parte, debido a la estimulación de la formación de bradicinina y la subsecuente activación de la vía del óxido nítrico, produciendo un incremento en la concentración de monofosfato de

guanosina cíclico en el fluido intersticial (Siragy y Carey, 1999). La activación del receptor AT_2 parece influenciar la reabsorción de sodio en el túbulo proximal por un mecanismo mediado por un receptor membranal o por una vía intersticial dependiente del óxido nítrico-monofosfato de guanosina cíclico (Jin et al., 2001). La infusión de Ang II en el ratón knockout del receptor AT_2 produce una exagerada hipertensión y una reducción en la función renal debida, probablemente, a una disminución en los niveles de bradicinina o de monofosfato de guanosina cíclico disponible en el fluido intersticial renal que contrarresta el efecto directo de la Ang II (Siragy et al., 1999).

En la corteza renal no se observaron cambios en la expresión AT_1 , pero sí en la expresión de los receptores AT_2 , lo cual nos lleva a sugerir que los receptores AT_2 corticales pueden participar, de manera importante, en la hipertensión por L-NAME.

VII. CONCLUSIONES

La expresión de los receptores AT₁ en la corteza y en la médula renales es dependiente, en parte, de la Ang II.

El L-NAME promovió una disminución en la expresión de los receptores AT₁ en la médula renal que puede contribuir al desarrollo de la hipertensión por éste agente.

La expresión de los receptores AT₂ en la médula renales es dependiente, en parte, de la Ang II.

El L-NAME produjo una disminución en la expresión de los receptores AT₂ tanto en la corteza como en la médula renal que pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión en este modelo.

VIII. REFERENCIAS

- Bergström, G, Johansson, I, Wickman, A, Gan, L y Thorup, C. Brief treatment in young spontaneously hypertensive rats abates long-term blood pressure elevation by effects on renal vascular structure. *J Hypertension* 20: 1413-1421, 2002.
- Borkowski, KR. Effect of adrenal demedullation and adrenalina on hypertension development and vascular reactivity in young spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Pharmacol.* 11: 1–14, 1991.
- Boron W., Boulpaep E. Medical physiology. Edit. elsevier saunders. Edición actualizada. pag. 737-755, 2005
- Chobanian AV, Bakris, GL, Black, HR, Cushman, WC, Green LA, Izzo, JL, Jones DW, Materson, BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ y the National High Blood Pressure Educational Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA*, 289 (19): 2534-2573, 2003.
- De Gasparo M, Catt, KJ, Inagami, T, Wright JW y Unger TH. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev.* 52:415–472, 2000.
- Edwin K., Jackson y James C. Garrison. Las bases farmacologicas de la terapeutica novena edición Goodman y Gilman editorial Mcgraw-hill interamericana vol. 1 capitulo 31 pag 785-807, 1996
- Flores J., Armijo J. A., y Mediavilla A. Farmacologia humana Mediadores celulares III. Angiotensinas; cininas, citocinas y otros mediadores peptídicos. 3 edición, editorial masson. pag. 343-347, 1997.
- Folkow, B, y Karlström G. Age- and pressure-dependent changes of systemic resistance vessels concerning the relationships between geometric design, wall distensibility, vascular reactivity and smooth muscle sensitivity. *Acta Physiol. Scand.* 122: 17–33, 1984.
- Folkow, B. “Structural factor” in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 16: 89–101, 1990.
- González-Juanatey JR, González Cid A. Actividades de sistemas y mediadores neurohormonales como causa de hipertensión arterial. *Rev Lat Cardiol.* 23(5):163-71, 2002.

- Harrap, SB, Van Der Merge, WM, Griffin, SA, Macpherson, F y Lever, AF. Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension* 16, 603–614, 1990.
- Henrich WL y Levi, M. Ontogeny of renal rennin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Am J Physiol.* 260, F530-F535, 1991.
- Iyer, SN, Lu, D, Katovich, MJ y Raizada MK. Chronic control of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by delivery of angiotensin type 1 receptor antisense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9960–9965, 1996.
- Kong, JQ, Taylor, DA y Fleming, WW. Mesenterio vascular responses of young spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 13–17, 1991.
- Korner, PI, Angus, JA, Bobik, A y Jennings, JL. Amplifier function of resistance vessels and the left ventricle in hypertension. *J. Hypertens.* 9, Suppl. 2: S31—S41, 1991.
- Lu, D, Raizada, MK, Iyer, S, Reaves, P, Yang, H y Katovich MJ. Losartan versus gene therapy: chronic control of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hipertensión* 30: 363–370, 1997.
- Morton, JJ, Beattie, EC, y Macpherson, F. Angiotensin II receptor antagonist losartan has persistent effects on blood pressure in the young spontaneously hypertensive rat: lack of relation to vascular structure. *J Vasc Res.* 29, 264–269, 1992.
- Mueller, SM. Longitudinal study of the hindquarter vasculature during development in spontaneously hypertensive and Dahl saltsensitive rats. *Hypertension* 5: 489–497, 1983.
- Nahmias C, Strosberg AD. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci.* 16(7):223–5, 1995.
- Paull, JRA y Widdop, RE. Persistent cardiovascular effects of chronic renin-angiotensin system inhibition following withdrawal in adult spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 19, 1393-1402, 2001.
- Phillips, MI, Mohuczy-Dominiak, D, Coffey, M, Galli, MS, Kimura, B, Wu, P y Zelles T. Prolonged reduction of high blood pressure with an in vivo, nonpathogenic, adeno-associated viral vector delivery of AT1-R mRNA antisense. *Hipertensión* 29: 374–380, 1997.

- Prewitt, RL, Chen, II y Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol.* 243 (*Heart Circ. Physiol.* 12): H243—H251, 1982.
- Rizzoni, D, Castellano, M, Porteri, E, Bettoni, G, Muiesan, ML y Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hipertensión in SHR. *Am. J. Hypertens.* 7: 193–200, 1994.
- Rosas PM. La hipertensión arterial en México y su relación con otros factores de riesgo. *Archivos de Cardiología de México*, 73 (suppl 1): S137-S140, 2003.
- Ruiz, P, Basso, N, Cannata, MA y Taquini, AC. The renin-angiotensin system in different stages of spontaneously hypertension in the rat (SHR). *Clin Exp Hypertension: Theory and Practice A* 12, 63-81, 1990.
- Timmermans, PBMWM, Wong, PC, Chiu, AT, Herblin, WF, Benfield, P, Carini, DJ, Lee, RJ, Wexler, R, Saye, J y Smith, R. Angiotensin II receptors and angiotensina II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 45:205–251, 1993.
- Velázquez, MO, Rosas PM, Lara, EA, Pastelín, Grupo ENSA 2000, JL, Attie, F y Tapia, CR. Hipertensión arterial en México: resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. *Archivos de Cardiología de México*, 72: 71-84, 2002.
- Weir MR y Dzau, VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 12, 205S-213S, 1999.
- Zicha, J y Kuneš, J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.* 79, 1227-1282, 1999.