



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**T E S I S**

**EFFECTO DE LA ANGIOTENSINA II EN LA RESPUESTA VASCULAR DE LA  
AORTA TORÁCICA DEL MODELO DE RATÓN NULO PARA EL GEN DELTA-  
SARCOGLICANO ( $\delta$ -SG) CON MIOCARDIOPATÍA DILATADA**

**PRESENTA**

**MARÍA DEL CARMEN MARIN ROMERO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD EN ÁREA EN INVESTIGACIÓN  
CLÍNICA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CASTILLO HERNÁNDEZ**

**DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ**

**MEXICO D.F. ENERO 2012**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 10:00 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

**“Efecto de la angiotensina II en la respuesta vascular de la aorta torácica del modelo de ratón nulo para gen delta-sarcoglicano ( $\delta$ -SG) con miocardiopatía dilatada”**

Presentada por la alumna:

**Marin**

Apellido paterno

**Romero**

Apellido materno

**María del Carmen**

Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	2	0	7	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

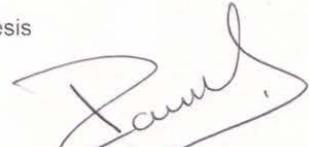
**Maestría en Ciencias de la Salud**

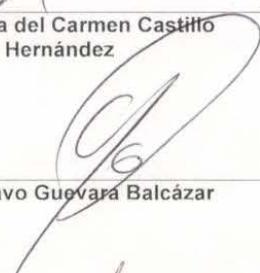
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

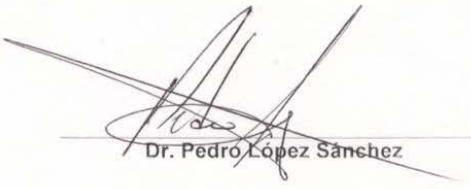
### LA COMISIÓN REVISORA

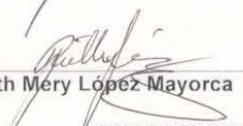
Directores de tesis

  
Dra. María del Carmen Castillo  
Hernández

  
Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

  
Dr. Gustavo Guzmán Balcázar

  
Dr. Pedro López Sánchez

  
Dra. Ruth Mery López Mayorca

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Eleazar Lara Padilla





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de **México** el día **29** del mes **Noviembre** del año **2011**, el que suscribe **María del Carmen Marin Romero** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias de la Salud** con número de registro **B102072** adscrito a **La Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. María del Carmen Castillo Hernández y el Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Efecto de la angiotensina II en la respuesta vascular de la aorta torácica del modelo de ratón nulo para gen delta-sarcoglicano ( $\delta$ -SG) con miocardiopatía dilatada”**, al **Instituto Politécnico Nacional** para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [marincita75@hotmail.com](mailto:marincita75@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**María del Carmen Marin Romero**

Nombre y Firma

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por seguirme permitiendo vivir y a mis padres por estar siempre.

Dra. Castillo, gracias por sus enseñanzas y su incondicional apoyo durante todo el tiempo que me llevo hacer esta tesis.

Al Dr. Coral por su paciencia, apoyo, enseñanzas y por ayudarme a llevar de la mano la investigación básica y la investigación clínica.

Al Dr. Castillo Henkel por apoyo y sus comentarios que aun los recuerdo como si hubiesen sido ayer.

A la Dra. Ruth, al Dr. Guevara y al Dr. Pedro López por sus comentarios y correcciones.

A mis compañeras de laboratorio.

A todas las personas que participaron en la realización de este nuestro proyecto mi sincero agradecimiento.

<b>INDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Abreviaturas	7
2. Resumen	10
3. Abstract	12
4. Introducción	14
5. Antecedentes	16
5.1 Complejo de glicoproteínas-distrofina (DGC) o complejo de proteínas asociadas a distrofina(DAPC)	16
5.2 Regulación del tono vascular	21
5.2.1 Angiotensina II	22
Acciones fisiológicas de la angiotensina II en células del músculo liso vascular	
5.2.2 Participación de prostanoides en el efecto contráctil de la angiotensina II	28
5.2.3 Regulación del efecto contráctil mediado por el endotelio vascular (ON)	29
6. Planteamiento del problema	33
7. Justificación	34
8. Hipótesis	35
9. Objetivos	35
9.1 Objetivo general	35

9.2	Objetivos específicos	35
10.	Metodología	36
10.1	Animales	36
10.1.2	Obtención de aorta torácica y preparación	37
11.	Análisis estadístico	39
12.	Resultados	40
13.	Discusión	47
14.	Conclusiones	53
15.	Bibliografía	54

## 1. ABREVIATURAS

Sgcd	δ-sarcoglicano. (δ-SG delta-sarcoglicano)
KO	Knock-out (mutante), nulo.
WT	Wild type (silvestre)
Sgca	α- sarcoglicano
DAPC	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofia DGC o complejo de proteínas asociadas a distrofia.
Ang II	Angiotensina II
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
mM	Milimoles ( $10^{-3}$ M)
AMPc	Adenil monofosfato cíclico
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
AT <sub>1</sub>	Receptor a angiotensina subtipo 1
AT <sub>2</sub>	Receptor a angiotensina subtipo 2
nNos	Sintasa de óxido nítrico neuronal
eNos	Sintasa de óxido nítrico endotelial

ON	Óxido nítrico
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAG	Diacilglicerol
PIP2	Fosfato del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
IP3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
AA	Ácido Araquidónico
MAP	Proteín cinasas activadas por mitógeno (Mitogen-activated protein kinases)
Fen	Fenilefrina
PG	Prostaglandina
PG's	Prostaglandinas
PKC	Proteín cinasa C (protein kinase C)
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> (cPLA <sub>2</sub> , iPLA <sub>2</sub> o sPLA <sub>2</sub> )
L-NAME	N-nitro-L-arginina metiléster
Indo	Indometacina

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
KCl	Cloruro de potasio
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de potasio
$\text{MgSO}_4$	Sulfato de magnesio
$\text{CaCl}_2$	Cloruro de calcio
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato de sodio

## 2. RESUMEN

Mutaciones en el gen delta sarcoglicano ( $\delta$ -SG) causan distrofia muscular de la cintura con cardiomiopatía. En el caso del modelo murino deficiente de este gen se han observado alteraciones en el músculo cardiaco y el músculo liso, y además se ha descrito que presentan múltiples vasoconstricciones en las arterias coronarias. Sin embargo, los cambios fisiopatológicos de estas alteraciones vasculares no han sido precisados, por lo que podrían estar involucrados varios sistemas; como el sistema renina-angiotensina, aspecto que consideramos importante. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la angiotensina II en la respuesta vascular de la aorta de un modelo experimental de ratón nulo del gen delta sarcoglicano ( $\delta$ -SG).

**Método:** Utilizamos ratones hembra knock-out (KO) y ratones silvestres (WT) de 5 meses de edad, estos fueron anestesiados con pentobarbital (50mg/kg vía intraperitoneal) y heparina (50 UI), después procedimos a disecar la aorta torácica. La aorta fue colocada en el sistema de órgano aislado, el cual se mantuvo con solución de Krebs y burbujeadado con carbógeno ( $O_2$  95% y 5%  $CO_2$ ). Finalmente se realizaron curvas de concentración respuesta a la angiotensina II ( $10^{-9}$ -  $10^{-6}$ ).

**Resultados:** Encontramos una diferencia significativa en la respuesta vascular contráctil a la angiotensina II, la cual se encuentra incrementada en el ratón knock-out. Por otra parte, analizamos si los cambios en la respuesta vascular a

angiotensina II eran debidos a una disminución en la respuesta relajante lo cual pudiera dar como resultado un aumento en la respuesta a la angiotensina II en la aorta torácica; sin embargo, los datos sugieren que el ON endotelial no está participando de forma importante en la regulación de la respuesta contráctil en estos ratones. Por último se determinó si la participación de los prostanoïdes contráctiles se modifica en esta patología, para lo cual se realizaron curvas de concentración respuesta a angiotensina II en presencia y ausencia de indometacina, encontramos de forma interesante que en el ratón knock-out la respuesta se inhibía casi por completo a diferencia del ratón silvestre, lo que sugiere una mayor participación de los prostanoïdes contráctiles en el ratón mutante. De forma complementaria se realizaron cortes histológicos para analizar si los cambios en la respuesta vascular se relacionaban con los cambios estructurales, encontramos que existe hipertrofia del músculo liso vascular y daño en la capa de células endoteliales tanto en aorta torácica como en la arteria coronaria del ratón mutante.

**Conclusión:** Existe un incremento en la respuesta vascular contráctil a la angiotensina II en el ratón knock-out (KO), en estos cambios no parece estar participando de forma importante el ON en la regulación de la respuesta vascular contráctil en los ratones KO. En cuanto a la participación de los prostanoïdes contráctiles en esta patología, encontramos una participación de prostanoïdes contráctiles en el ratón KO. Se observaron cambios estructurales en músculo liso y en el endotelio del ratón KO.

**Palabras clave:** Ratón nulo delta sarcoglicano, angiotensina II, miocardiopatía dilatada.

### 3. ABSTRACT

**Introduction:** Mutations in the delta sarcoglycan gene ( $\delta$ -SG ) cause muscular waist dystrophy with cardiomyopathy. For the mouse model deficient in this gene are observed alterations in cardiac muscle and smooth muscle, and also described featuring multiple coronary artery vasoconstriction. However the pathophysiological changes of these vascular changes have not been clarified, so that multiple systems may be involved, such as the renin-angiotensin system, something we consider important. So the aim of this study was to evaluate the effect of angiotensin II in the vascular response of the aorta of a mouse experimental model delta sarcoglycan gene null ( $\delta$ -SG).

**Methods:**

In this protocol we use female mice Knock-out (KO) and wild type (WT) from 5 months old, it were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg IP) and heparine (50 UI), after that we proceeded to dissect the aorta. The aorta was placed in an isolated organ system, which keeps Krebs solution and bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Finally we proceeded to make curves concentration response to angiotensin II ( $10^{-9}$ -  $10^{-6}$ ).

**Results:** We found a significant difference in contractile vascular response to angiotensin II, it was increased in the knockout mouse. Moreover, we analyze

whether changes in the vascular response to angiotensin II were due to a decrease in the relaxant response which could result in an increase in the response to angiotensin II in the thoracic aorta, but the data suggests that endothelial NO is not participating significantly in the regulation of the contractile response in these mice. Finally, we determined whether the participation of contractile prostanoids was modified in this disease, for which concentration response curves were performed to angiotensin II in the presence and absence of indomethacin, in an interesting finding that the knockout mice the response was inhibited almost completely unlike normal mouse, suggesting a greater participation of contractile prostanoids in mouse mutant. Followed up with a way to assess whether histological changes in the vascular response is related to structural changes, finding that there is vascular smooth muscle hypertrophy and damage to the endothelial cell layer in both thoracic aorta and coronary artery mutant mouse .

**Conclusion:** There is an increase in contractile vascular response to angiotensin II in KO mouse, these changes do not appear to be significantly involved in the NO in the regulation of vascular contractile response in KO mice. Regarding the participation of contractile prostanoids in this disease, we found a participation of contractile prostanoids in mouse KO. Structural changes were observed in smooth muscle and endothelial KO mouse.

**Key words:** Mouse knock-out, delta sarcoglycan, angiotensin II, cardiomyopathy

#### 4. INTRODUCCIÓN

El complejo de glicoproteínas asociadas a distrofia o complejo de proteínas asociadas a distrofia (DGC, DAPC), se encuentra en el sarcolema del músculo esquelético, músculo liso y músculo cardiaco, al cuál se le han propuesto varias funciones, dentro de ellas servir de unión entre el citoesqueleto intracelular y la matriz extracelular que conecta la F-actina intracelular, una función mecánica para fortalecer la membrana plasmática durante la contracción muscular; y por otra parte se ha demostrado que juega un papel en la transducción de vías de señalización. La deficiencia en componentes de éste puede conducir a la presencia de distrofia muscular, así como mutaciones tanto en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -sarcoglicano que pueden conducir a distrofia muscular (LGMD: distrofia muscular de cintura), y en el caso de los tres últimos se asocia a cardiomiopatía. Estudios experimentales en animales han mostrado que los ratones nulos  $\delta$ -sarcoglicano (Sgcd) desarrollaban cardiomiopatía con áreas de necrosis focal como característica histológica en el músculo cardiaco y el músculo esquelético; así como presencia de numerosas áreas de vasoconstricciones pronunciadas, dilataciones pre y post-estenóticas con apariencia de microaneurismas.<sup>1</sup> Hasta ahora se sabe que los ratones nulos Sgcd tienen alteraciones vasculares; sin embargo, no se ha precisado lo que induce estas alteraciones y podrían estar implicados en el incremento de la contractilidad y/o del espasmo de la microvasculatura tanto los niveles elevados del calcio intracelular, las alteraciones en la síntesis del óxido nítrico, así como

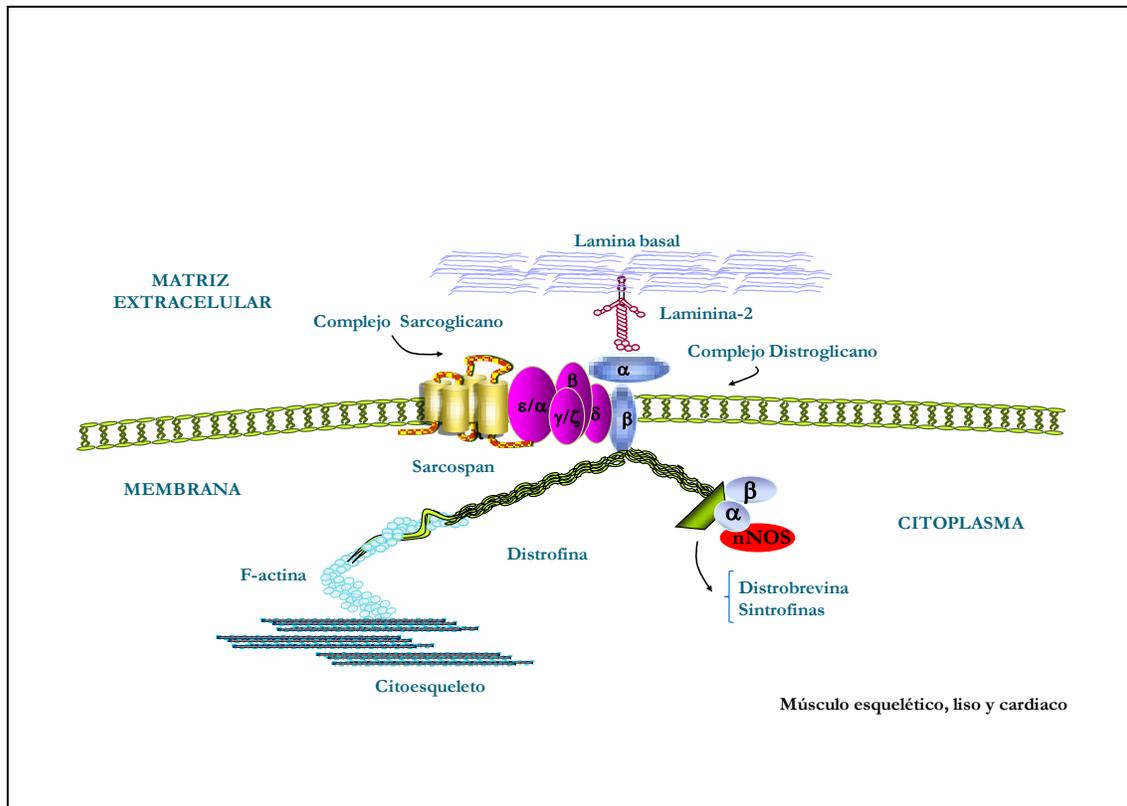
también el aumento de la actividad de la proteína cinasa C, así como alteraciones en la regulación del tono vascular. No existen estudios previos realizados que aporten información sobre la respuesta vascular en estas mutaciones del gen  $\delta$ -SG.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Complejo de glicoproteínas-distrofia (DGC) o complejo de proteínas asociadas a distrofia (DAPC).

El DAPC, se encuentra en el sarcolema del músculo esquelético, el músculo liso y el músculo cardiaco, éste complejo a su vez se divide en tres diferentes sub-complejos; el primer sub-complejo está compuesto por las proteínas periféricas donde encontramos a la distrofia, las sintrofinas (subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ), la distrobrevina (subunidad  $\alpha$ ) y la sintasa de óxido nítrico neuronal (Nitric Oxide Synthase, nNOS). El segundo sub-complejo es el que está conformado por el complejo de distroglicanos (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). El tercer sub-complejo está constituido por glicoproteínas transmembranales conocido como complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN) el cual consiste de los sarcoglicanos (SG)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  y  $\epsilon$  y una tetraspanina llamada Sarcospan (SSPN). Asimismo el DAPC puede interactuar con otras proteínas como caveolina, disferlina y una molécula de la matriz extracelular, el proteoglicano conocido como biglicano.<sup>2</sup>

**(Fig. 1)**



**Figura. 1. Complejo proteínas asociados a distrofina (DAPC).** Está compuesto por 3 subcomplejos, el primero conformado por las proteínas periféricas: distrofina, sintrofinas (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ 1), distrobrevina (subunidad  $\alpha$ ) y la sintasa de óxido nítrico neuronal (Nitric Oxide Synthase, nNOS). El segundo sub-complejo conformado: por el complejo de distroglicanos (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). El tercer sub-complejo está constituido por glicoproteínas transmembranales conocido como complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN) el cual consiste de los sarcoglicanos (SG)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -,  $\delta$ ,  $\zeta$  y  $\epsilon$  y el Sarcospan (SSPN).

Dentro de las funciones de este complejo se han descrito que tiene una función mecánica para fortalecer la membrana plasmática durante la contracción muscular.<sup>3,4</sup> y por otra parte se ha sugerido que juegan un papel en la transducción de vías de señalización. Como aspecto importante se ha reportado la participación del complejo SG-sarcospan en el proceso contráctil; se ha descrito que participa iniciando la contracción mediante la fosforilación de sus miembros ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) y por otra parte se refiere que los nucleótidos extracelulares modulan la señalización, como es el caso del  $\alpha$ -SG en su sitio de unión a ATP, por otro lado la interacción de  $\alpha$  y  $\delta$ -SG con filamina C, incluso la interacción de Grb2 con sintrofinas ( $\alpha_1$   $\beta_1$   $\beta_2$ ) los cuales también intervienen con los canales de voltaje de sodio.<sup>5</sup>

Dentro del DAPC se encuentra el subcomplejo de sarcoglicanos (SG), constituido a su vez por 6 sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y recientemente se ha identificado  $\zeta$ . Todos los SG, son glicoproteínas transmembranales con al menos un sitio de glucosilación. Los sarcoglicanos  $\alpha$  y  $\epsilon$  comparten alta homología y ambos son proteínas transmembranales tipo I y los sarcoglicanos  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  son también altamente relacionados, son proteínas transmembrana tipo II.

La expresión de  $\alpha$  y  $\gamma$ -sarcoglicanos está restringida a tejido muscular cardíaco y esquelético, en contraste  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$ -sarcoglicanos (un  $\alpha$ -sarcoglicano homólogo) y el sarcospan se expresan en células del músculo liso.<sup>6</sup> (Tabla 1)

**Tabla 1. Distribución de los elementos del complejo de glicoproteínas-distrofina (DAPC) en los diferentes tipos de músculo**

Elemento	Músculo esquelético	Músculo cardíaco	Músculo liso vascular
Distrofina	+	+	+
$\alpha$ - sarcoglicano	+	+	-
$\beta$ - sarcoglicano	+	+	+
<b><math>\delta</math>- sarcoglicano</b>	+	+	+
$\gamma$ - sarcoglicano	+	+	-
$\varepsilon$ - sarcoglicano	+	+	+
$\zeta$ - sarcoglicano	+	+	+
Distroglicano	+	+	+
Sarcospan	+	+	-
Sintrofinas ( $\alpha$ y $\beta$ )	+	+	?
Distrobevinas ( $\alpha$ y $\beta$ )	+	+	?
Caveolina-3	+	+	-
nNos	+	+	+

Modificada de Lapidos A.Karen. 3

## IMPORTANCIA DEL COMPLEJO

Se asume que la función del complejo de sarcoglicanos es servir como estabilizador molecular del DAPC, cada subunidad del complejo puede tener funciones diferentes entre sí, por lo que si existe alteración o falta de alguno de las subunidades de los sarcoglicanos que puede conducir a la pérdida concomitante o reducción de los 4 sarcoglicanos y el sarcospan, pudiéndose presentar diferentes tipos de distrofia muscular o cardiomiopatía.

Por ejemplo deficiencias en  $\gamma$  y  $\delta$ -sarcoglicano están asociadas con cardiomiopatía, mientras la deficiencia de  $\alpha$ -sarcoglicano no.<sup>7,8</sup> Se ha descrito que mutaciones tanto en el  $\beta$ -sarcoglicano, como en el  $\delta$  y  $\gamma$ -sarcoglicano pueden conducir a distrofia muscular (LGMD: distrofia muscular de cintura, afectan principalmente los músculos escapulares y pélvicos) asociada a cardiomiopatía.<sup>5,9,10,11</sup> Sin embargo también se ha descrito mutaciones en  $\epsilon$ -sarcoglicano en humanos con cardiomiopatía dilatada, sin acompañarse de la enfermedad muscular.<sup>12</sup> Con el fin de estudiar los mecanismos fisiopatogénicos de la cardiomiopatía asociada a mutaciones del complejo glucoproteína-distrofina, se han hecho estudios en modelos experimentales, analizando ratones (modificados por ingeniería genética), deficientes ya sea para  $\alpha$ -sarcoglicano (Sgca) o  $\delta$ -sarcoglicano (Sgcd), encontrando que solo los ratones nulos Sgcd desarrollaban miocardiopatía con áreas de necrosis focal como característica histológica en músculo cardíaco y músculo esquelético. Mediante

la técnica de transiluminación de microfil-perfusión de arterias coronarias se observó que el ratón Sgcd presentaba numerosas áreas de vasoconstricciones pronunciadas, dilataciones pre y post-estenóticas con apariencia de microaneurismas los cuales fueron asociados con estas constricciones, concluyendo que la disrupción del complejo SG-SSP en musculo liso vascular altera la función vascular, lo cual inicia la cardiomiopatía y exagera la distrofia muscular.<sup>1</sup>

Como aspecto importante, en otro estudio Cohn et al,<sup>13</sup> analizaron en un modelo animal con falta de complejo sarcoglicano-sarcospan el efecto de verapamil oral a largo plazo (un bloqueador de los canales de calcio con propiedades vasodilatadoras) en músculo liso y demostraron que, el tratamiento a largo plazo con verapamil, abolía las vasoconstricciones y efectivamente prevenía el desarrollo de cardiomiopatía severa demostrada por niveles séricos de Troponina I y demostraron además que la interrupción del tratamiento con verapamil conducía otra vez a alteraciones en la función vascular y a necrosis de células miocárdicas.

## **5.2 REGULACION DEL TONO VASCULAR**

Se conoce que en la regulación del tono vascular participan varios sistemas como el mismo endotelio vascular, el sistema nervioso autónomo (activación de receptores adrenérgicos) y el sistema renina angiotensina y que estos sistemas controlan el tono vascular tanto en condiciones fisiológicas como en situaciones

de estrés. Dichos sistemas realizan su papel regulatorio a través de la liberación de sustancias vasoconstrictoras como la angiotensina, la endotelina, la noradrenalina y de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico y la prostacliclina.

### **5.2.1 ANGIOTENSINA II**

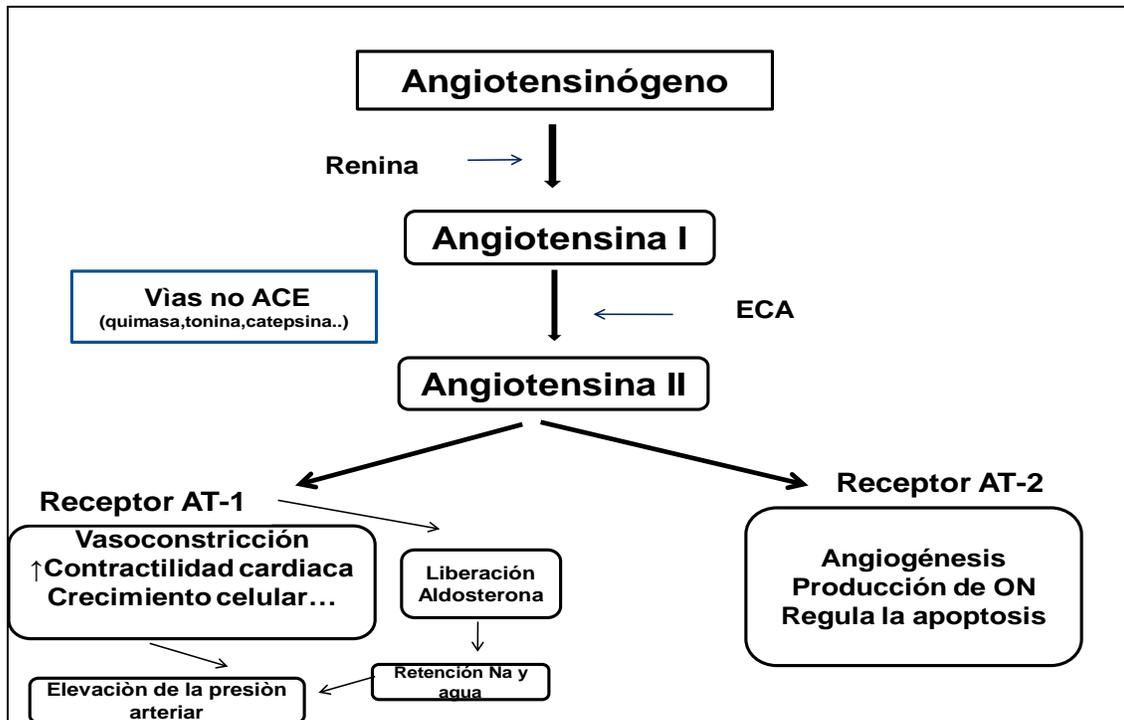
#### **Acciones fisiológicas de la angiotensina II en células de músculo liso vascular**

El sistema renina-angiotensina juega un papel importante en la regulación de la función cardiovascular, contribuye al mantenimiento de la presión arterial y al balance hidroelectrolítico. El efector principal de este sistema es la angiotensina II (Ang II), la cual causa, vasoconstricción intensa del músculo liso de las arteriolas, libera aldosterona, tiene efecto antinatriurético sobre el riñón al incrementar la reabsorción de sodio; además, induce un incremento en la vasoconstricción simpática por facilitar la secreción y en parte por inhibir la recaptación de la noradrenalina.

Éste sistema es una cascada proteolítica conectada a una traducción de señales en la que la renina, una enzima proteolítica que se libera en las células yuxtaglomerulares en respuesta a disminución de la volemia o de la presión arterial, detectada por los barorreceptores presentes en estas células que

rodean la arteriola aferente, también responden a una estimulación de las células de la mácula densa, que detectan una disminución en la concentración salina del líquido que fluye por el túbulo contorneado distal).

Las células yuxtaglomerulares sintetizan y acumulan en los gránulos prorenina, forma inactiva de la renina. Cuando ésta se libera, la mayor parte de la renina llega a la circulación general, una pequeña parte permanece en los riñones desencadenando reacciones locales. En la circulación general, actúa sobre el angiotensinógeno, glucoproteína sintetizada en el hígado, dando lugar a la angiotensina I, péptido de 10 aminoácidos, vasoconstrictor débil, incapaz de producir cambios funcionales importantes en la circulación. La angiotensina I, mediante la enzima convertidora de angiotensina, sintetizada en las células endoteliales de los vasos sanguíneos pequeños pulmonares, se transforma en el octapeptido Ang II. **(Fig. 2)**. Ahora se sabe que en muchos tejidos, incluidos los vasos sanguíneos, el riñón, el corazón y el cerebro son capaces también de generar en forma local Ang II a través de vías no dependientes de la ECA /vías no ECA como la vía de la quinasa, carboxipeptidasa, catepsina G, (teniendo como sustrato la Ang I), y a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato el angiotensinógeno).<sup>14-16</sup>



**Figura 2. Activación del sistema renina-angiotensina.** El Angiotensinógeno es convertido a angiotensina I por la renina. Angiotensina I puede ser convertida en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y por vías no dependientes de la ECA. La angiotensina II ejerce sus efectos biológicos por unión al receptor tipo I (AT<sub>1</sub>) y al receptor tipo II (AT<sub>2</sub>). Modificado de Ramasubbu K, MD (2007).<sup>17</sup>

## Señalización de la Angiotensina II en los vasos

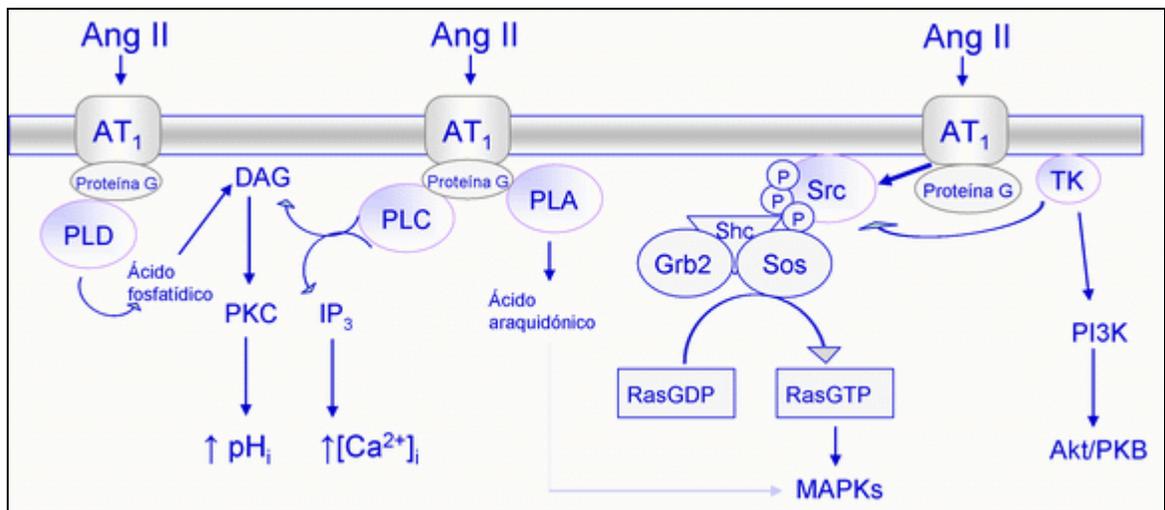
La angiotensina II (Ang II), media sus efectos a través de al menos, dos tipos de receptores de angiotensina tipo I ( $AT_1$ ) y tipo 2 ( $AT_2$ ). Aunque existen otros receptores de angiotensina, llamados también receptores atípicos, los  $AT_3$  (identificados en una sola línea de ratón) y  $AT_4$ , (reconocidos en el tejido nervioso y renal), cuya función no es completamente clara aun.<sup>18</sup> La mayoría de los efectos fisiológicos de la ang II son mediados a través de la unión a los receptores  $AT_1$ , donde la ang II induce contracción celular, proliferación, migración, producción de componentes de la matriz extracelular y respuesta inflamatoria, mientras que la interacción con el receptor  $AT_2$  parece actuar como antagonista de los efectos mediados por  $AT_1$ , promoviendo la apoptosis e inhibiendo la proliferación y la hipertensión.<sup>19</sup> Los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$  pertenecen a la familia de receptores transmembrana acoplados a las proteínas G.

La cascada de la vía señalización de la angiotensina II por el receptor  $AT_1$  es una consecuencia de activación de una proteína G:  $G_{q/11}$ ,  $G_i$ ,  $G_{12}$  y  $G_{13}$ . La señal del receptor  $AT_1$  es a través de 3 principales vías: señalización clásica de fosfolipasa C (PLC), capaz de hidrolizar el enlace ester- fosfato del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato(PIP2), conduciendo a producción de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), la fosfolipasa D (PLD), que culmina también en generación de DAG; y fosfatidilcolina, ácido fosfatídico (PA)

implicado en la señalización celular asociado a mitogénesis y fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) la cual es responsable de producción de ácido araquidónico (AA) y prostaglandinas (PGs).<sup>20</sup> **(Fig. 3)** Cada uno de ellos ejerce una función distinta como segundo mensajero.

Por su fuerte carga eléctrica, el IP<sub>3</sub> abandona la membrana celular y emigra al citoplasma donde activa el receptor a ryanodina (RyR), un receptor específico situado centralmente y en la periferia del retículo sarcoplásmico (SR), la activación de los RyR abre los canales de Ca<sup>2+</sup>, causa un incremento rápido de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, en el citoplasma. El Ca<sup>2+</sup> actuará entonces como mensajero, uniéndose a la calmodulina; y su liberación intracelular puede promover la penetración secundariamente desde el espacio extracelular hasta el interior de la célula a través de los canales de Ca<sup>2+</sup>.

El complejo Ca<sup>2+</sup> -calmodulina se une a la cinasa de la cadena ligera de la miosina y la activa por fosforilación activándose entonces, la ATPasa de miosina y esto permite que la actina se deslice sobre la miosina causando la contracción muscular.



**Fig. 3. Vías de señalización de angiotensina II.** La estimulación de receptores AT<sub>1</sub> por Ang II, induce como respuesta inmediata la activación por fosforilación de PLC, capaz de hidrolizar PIP<sub>2</sub> produciendo DAG e IP<sub>3</sub>, que moviliza el calcio intracelular. La unión de Ang II a sus receptores AT<sub>1</sub> también activa PLD, capaz de hidrolizar fosfolípidos, como fosfatidilcolina y generar ácido fosfatídico. La unión del ligando a su receptor también activa proteínas kinasas por fosforilación en residuos tirosina, activando kinasas de las familias SRC, Janus y PI3K. Estos efectos pueden ser mediados por transactivación de receptores con actividad kinasa como EGF, PDGF e IGF. Los TK activan otras vías MAPKs a través de la fosforilación de la proteína adaptadora Src que se asocia al complejo Shc-Grb2-Sos para inducir el intercambio de nucleótidos GDP-GTP en la proteína RAS. (Touyz,2000).

Takahashi et al,<sup>21</sup> demostraron en un estudio de un modelo experimental, en el que ligar la arteria coronaria en ratas sin deficiencia genética inducían alteraciones morfológicas y degradación del complejo glucoproteína-distrofina en la porción viable de ventrículo izquierdo, sugiriendo que esta degradación contribuía a la disfunción ventricular de la falla cardiaca, Takahashi et al,<sup>22</sup> posteriormente utilizaron inhibidores de enzima convertidora de angiotensina II (trandolapril) y un bloqueador de los receptores a angiotensina II AT<sub>1</sub> (candesartán), sugiriendo con su uso una atenuación en la degradación del complejo de proteínas sarcoglicanos y distrofina como un posible mecanismo que mejoraba la función estructural y funcional del ventrículo derecho en estas ratas con ligadura de arteria coronaria.

### **5.2.2 PARTICIPACIÓN DE PROSTANOIDES EN EL EFECTO CONTRÁCTIL DE LA ANGIOTENSINA II**

La Ang II activa a la fosfolipasa A<sub>2</sub>, liberando ácido araquidónico, sobre el cual actúa la enzima ciclooxigenasa (COX) formando prostanoïdes.<sup>23</sup> Se han demostrado dos isoformas COX-1 y COX-2<sup>24,25</sup> la COX-2 se localiza en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico y la COX -1 en la membrana del retículo endoplásmico.<sup>26,27</sup> En cuanto a su localización, la COX-2 se expresa en el corazón y el pulmón, testículos, epitelio de la tráquea, la mácula densa en el riñón en ausencia de inflamación, células endoteliales y músculo liso de aorta.<sup>28-33</sup>

Los prostaglandinas son mediadores en la regulación de las funciones cardiovasculares y renales, su producción es regulada por diferentes compuestos endógenos dentro de los cuales se encuentra la ang II, ésta estimula la liberación de PGs a través de fosfolipasa A<sub>2</sub> que libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular, el cual es convertido a prostaglandinas por la COX. Algunos estudios han reportado que en la arteria mesentérica de la rata, la indometacina inhibe la respuesta a diferentes vasoconstrictores entre ellos la Ang II.<sup>34</sup> También se ha reportado que la indometacina inhibe el efecto contráctil de la Ang II en similar magnitud tanto en aorta torácica como en abdominal indicando que participa un prostanoide en la respuesta contráctil a este autacoide.<sup>35</sup>

### **5.2.3 REGULACIÓN DEL EFECTO CONTRÁCTIL MEDIADO POR EL ENDOTELIO VASCULAR (ÓXIDO NÍTRICO, ON)**

El endotelio es una capa unicelular de células endoteliales (CEs) que recubre los vasos sanguíneos (arteriales y venosos), los vasos linfáticos, las cavidades cardiacas, los cuerpos cavernosos y la cámara anterior del ojo. Las CEs se orientan en el sentido del flujo sanguíneo. El endotelio tiene varias funciones esenciales para la salud, que se ejercen en su mayoría a través de mediadores químicos. La función más conocida es el mantenimiento de un tono vascular

dilatado en la proporción exacta para conservar la presión arterial en valores normales y permitir la perfusión tisular.

El endotelio participa en la regulación del tono vascular sintetizando y liberando sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico y por otra parte se sintetizan también compuestos vasoconstrictores como la endotelina 1, el tromboxano A<sub>2</sub>, la prostaglandina F<sub>2</sub> alfa y el anión superóxido.

El ON es producido cuando la L- arginina es transformada a L-citrulina por catálisis de sintasa del óxido nítrico (NOS) en presencia de O<sub>2</sub> de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina y de cuatro cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahydrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima NOS y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LNMA), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros.<sup>36</sup> El óxido nítrico, una vez formado, puede difundir hacia las células subyacentes, donde activa a la enzima guanilil-ciclasa (Gc) y ésta provoca el aumento intracelular de GMPc, mediador de los efectos fisiológicos. Se ha identificado más de una isoforma de NOS, constituidos por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 KDa, las cuales describiremos a continuación:

1.-Dos isoformas constitutivas calcio-dependientes (cNOS): la endotelial (eNOS) o tipo III y la neural (nNOS) o tipo I, presentes en diferentes tejidos

(células endoteliales, neuronas, neuroglías y otros) que producen ON y actúa como señalizador molecular.

2.-Una forma calcio-independiente (iNOS) o tipo II, inducible en un número de tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso, endotelio en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa y lipopolisacárido bacteriano.

La eNOS, se expresa esencialmente en el endotelio. El óxido nítrico regula la presión arterial modulando, con el efecto vasodilatador que tiene, el efecto contráctil de diversas sustancias vasoconstrictoras.

Se ha descrito en la literatura que se presenta una disminución en la liberación de óxido nítrico asociado a la disfunción endotelial en ciertas patologías, lo cual favorece que no se presente modulación inhibitoria de los efectos de las sustancias vasoconstrictoras, permitiendo así el incremento del tono vascular y con esto hipertensión.<sup>37</sup>

También se ha descrito interacción entre los diferentes sistemas que regulan el tono vascular, así, en estudios reportados por Zhao et al.<sup>38</sup> y Olson et al.,<sup>39</sup> la Ang II estimula el aumento en los niveles de mRNA de la NOS, la expresión de la proteína eNOS y la producción de NO vía receptor AT<sub>2</sub>, mientras que la Ang II parece regular a la baja la expresión de la proteína eNOS en la vía del receptor AT<sub>1</sub> vinculado a la vía que involucra a la proteína G<sub>q</sub>/fosfolipasa C/  
Ca<sup>2+</sup> fosfatidilinositol en células endoteliales de arteria pulmonar.

En relación a la modificación en la regulación el tono vascular y las alteraciones en el complejo de sarcoglicanos, existen varios estudios, dentro de estos, el de Heydemann A, Mc Nally et al,<sup>40</sup> en el cual se analizó el rol de óxido nítrico (NO) en la cardiomiopatía asociada a mutaciones de sarcoglicanos (modelos experimentales mutantes de  $\delta$  y  $\gamma$  SGs), donde observaron que no hay diferencia en la expresión de la nNOS en el corazón de ratones mutantes de 24 semanas en concordancia con lo reportado en el músculo esquelético en otros estudios.<sup>41</sup> Observaron también que la eNOS fue significativamente mayor en daños focales en el miocito, señalando además que el ON se incrementó en las regiones de los daños y en alteraciones de la permeabilidad de la membrana.

En los estudios previos realizados en modelos experimentales de animales nulos del gen sarcoglicano sugieren que la cardiomiopatía está relacionada con el vasoespasmo coronario y pérdida del complejo sarcoglicano en el músculo liso de arteria coronaria sin embargo no se ha considerado que la mutación pudiera estar afectando otros vasos como el de la aorta torácica. Por otro lado existen pocos estudios en modelos experimentales de ratones nulos del gen  $\delta$ -SG donde se reporten los cambios histológicos encontrados en vasos. Uno de estos estudios realizado por Lipskaia L. et al.<sup>49</sup> en hámster mutantes, encontró un espesor homogéneo de la media de la aorta torácica de los WT en tanto que en los hámster mutantes se encontraron numerosas zonas de atrofia y marcada hipertrofia. Mientras que en el estudio realizado por Dye W.W et al, en el que compararon las arterias carótidas de ratón deficiente de distrofina (mdx), ratón

deficiente de  $\delta$ -sarcoglicano (sgcd -/-) y ratón control wild-type, encontraron que a pesar de la similitud de las características morfológicas y el espesor de la pared, el porcentaje de la pared ocupado por la media parecía ser menos en ambos ratones mdx y el sgcd -/- comparado con el control WT sugiriendo más adventicia y colágeno en los dos modelos de ratones de distrofia muscular.

## 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las principales causas de falla cardíaca, es la miocardiopatía, cuya etiología es multifactorial, en donde se incluyen causas adquiridas y hereditarias.

En la miocardiopatía debida a mutaciones en el gen principal  $\beta$ - o  $\delta$ -sarcoglicano, se presentan espasmos microvasculares por la disfunción vascular pudiendo estar involucrados sistemas que regulan el tono vascular como el endotelio, el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina. Por lo que utilizando vasos (aorta) de un modelo de ratón con mutación del gen  $\delta$ -sarcoglicano podemos conocer, si existe diferencia en la respuesta vascular contráctil a angiotensina II en el vaso del ratón nulo del gen  $\delta$ -sarcoglicano.

## 7. JUSTIFICACIÓN

En la cardiomiopatía que se asocia a distrofia muscular de cintura no se han precisado sus mecanismos fisiopatológicos, nuestro modelo es un ratón nulo del gen  $\delta$ -SG, con cardiomiopatía dilatada, y se conocen por estudios mencionados previamente las alteraciones que presentan, hasta ahora se sabe que los ratones nulos del gen  $\delta$ -SG tienen alteraciones vasculares (vasoconstricciones, estrechamientos focal- luminal), sin embargo no se conoce con certeza lo que induce estas alteraciones y podrían estar implicados en el aumento de la contractilidad y/o del espasmo de la microvasculatura. Por otra parte la mayoría de los estudios experimentales que se han realizado en modelos experimentales nulos del gen  $\delta$ -SG ha sido en músculo esquelético y cardíaco y los pocos estudios que existen en músculo liso de vasos sanguíneos se han basado en el estudio del vasoespasmo en arterias coronarias, sin embargo no existen antecedentes en otros vasos sanguíneos. Por otra parte no existe suficiente información en relación a los cambios que se presentan en la reactividad vascular en vasos importantes como la aorta, por lo que nuestro estudio está encaminado en determinar la respuesta vascular contráctil a la angiotensina II en la aorta torácica en el ratón nulo del gen  $\delta$ -SG.

La posibilidad de contar con un modelo experimental distrofia muscular de cintura y miocardiopatía dilatada, nos permite analizar los cambios en la respuesta vascular de ciertos vasos así como estudiar los cambios morfológicos que se presentan en los tejidos. El estudio de este modelo permite incrementar

el conocimiento sobre la fisiopatología de esta enfermedad, así como brindar una mayor información que sirva como base a mejorar la terapéutica preventiva o profiláctica.

## **8. HIPOTESIS**

La aorta torácica del ratón nulo de  $\delta$ -SG tiene incrementada la respuesta vascular contráctil a la angiotensina II.

## **9. OBJETIVOS**

### **9.1 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la respuesta vascular contráctil a la angiotensina II en la aorta torácica del ratón nulo del gen  $\delta$ -SG.

### **9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.-Comparar los cambios en la respuesta vascular contráctil a la angiotensina II entre el ratón nulo  $\delta$ -SG y el ratón silvestre.
- 2.-Comparar los cambios en la respuesta vascular relajante dependiente de endotelio entre el ratón nulo  $\delta$ -SG y el ratón silvestre.
- 3.-Determinar si la respuesta contráctil a angiotensina se encuentra modulada por el ON derivado de endotelio.

4.-Analizar la participación de prostanoides en el efecto contráctil de angiotensina II en el ratón nulo  $\delta$ -SG y en el ratón silvestre.

5.-Observar si existen cambios histológicos entre la aorta torácica del ratón nulo  $\delta$ -SG y el ratón silvestre.

## **10. METODOLOGÍA**

### **10.1 Animales**

Se utilizaron ratones hembras de 5 meses de edad, nulos del gen  $\delta$ -SG (B6.129 Sgcdtm 1Mcn). Se utilizaron hembras ya que se tienen antecedentes de experimentos en el laboratorio de farmacología cardiovascular de la Escuela Superior de Medicina (ESM), en hembras y machos, no encontrando diferencias significativas entre la respuesta de estos a la angiotensina II.

Los ratones se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM a una temperatura ambiente de 18-25°C promedio, a un ciclo de luz-oscuridad de 12x12 y con alimento y agua ad libitum hasta su uso en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular de la Escuela Superior de Medicina (ESM).

Mantenidos bajo la normativa NOM-062-ZOO-1999 y las buenas prácticas del CICUAL.

Se formaron dos grupos de 6 animales:

Grupo ratón silvestre ó Wild type (WT) y grupo de ratón nulo del gen  $\delta$ -SG ó knock-out (KO) ó mutante.

### **10.1.2 Obtención de aorta torácica y preparación para realizar las pruebas de reactividad vascular con la técnica de órgano aislado (Sistema BYOPAC).**

Previa anestesia con pentobarbital sódico (50mg/kg de peso), Anestesal<sup>R</sup> se procedió a extraer la aorta torácica de ambos grupos, se tomo la aorta torácica desde el diafragma hasta el cayado aórtico, la colocamos en solución de Krebs fría, para posteriormente retirar todo el tejido conectivo adyacente, cortamos la aorta torácica en anillos de 4-5mm de longitud y posteriormente colocamos en las cámaras para órgano aislado en 10ml de solución de Krebs-bicarbonato con la siguiente composición (mM): NaCl 11; KCl 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> 1.2; MgSO<sub>4</sub> 7; H<sub>2</sub>O 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 2.5; NaHCO<sub>3</sub> 25; dextrosa 11.7 y calcio disódico EDTA 0.026. Después se montaron en cámaras para órgano aislado a una temperatura de 37°C, pH 7.4 y burbujeadas con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Los anillos se montaron en 2 ganchos de acero inoxidable, uno de los ganchos se fijo en el fondo de la cámara y el otro a un transductor de tensión Grass FTO3 que se conecta a un 7D Grass Polygraph (Grass Instrument Co., Quincy MA, USA), el cual mide la tensión isométrica desarrollada por los anillos aórticos.

A los anillos se les dio una tensión inicial de 1.5 gramos y se les dejó estabilizar por un periodo de 2 horas, durante el cual se realizaron pruebas de viabilidad de los anillos (cada 15 minutos se administró fenilefrina ( $10^{-6}$ M) para probar la viabilidad del tejido mediante la respuesta contráctil del tejido y se administró acetilcolina ( $10^{-6}$ M) para analizar si los anillos tenían íntegro el endotelio).

1.-Para la valoración de la modificación en respuesta contráctil a angiotensina II en el ratón mutante, se realizó curva concentración respuesta a angiotensina II. Se administró angiotensina II a cada anillo, a concentraciones crecientes desde  $1 \times 10^{-9}$  molar a  $1 \times 10^{-6}$  molar.

2.-Para determinar si existen cambios en la relajación dependiente de endotelio se realizó una curva a acetilcolina a concentraciones de  $1 \times 10^{-9}$  molar a  $1 \times 10^{-5}$  molar.

3.-Para determinar la participación del óxido nítrico en la respuesta contráctil a angiotensina, se realizaron curvas concentración respuesta a angiotensina II ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) en presencia y ausencia de L-NAME ( $1 \times 10^{-4}$ M).

4.-Para determinar la participación de prostanoideos en la respuesta contráctil a angiotensina se realizaron curvas concentración respuesta a angiotensina II ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) en presencia y ausencia de indometacina ( $1 \times 10^{-5}$ M).

5.- Finalmente para observar si los cambios encontrados en la respuesta contráctil a angiotensina II son de tipo estructural se realizaron cortes histológicos de la aorta torácica de los ratones de ambos grupos. La aorta se montó de forma perpendicular sobre un trozo de corcho y se fijó con isopentano (2-Metilbutano, SIGMA) enseguida se congeló la muestra en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-85^{\circ}\text{C}$  realizando posteriormente cortes transversales de  $7\ \mu\text{m}$  de grosor con un criostato MICROM HM550. Estos cortes se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-lisina (SIGMA-ALDRICH) y se les realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE).

## **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

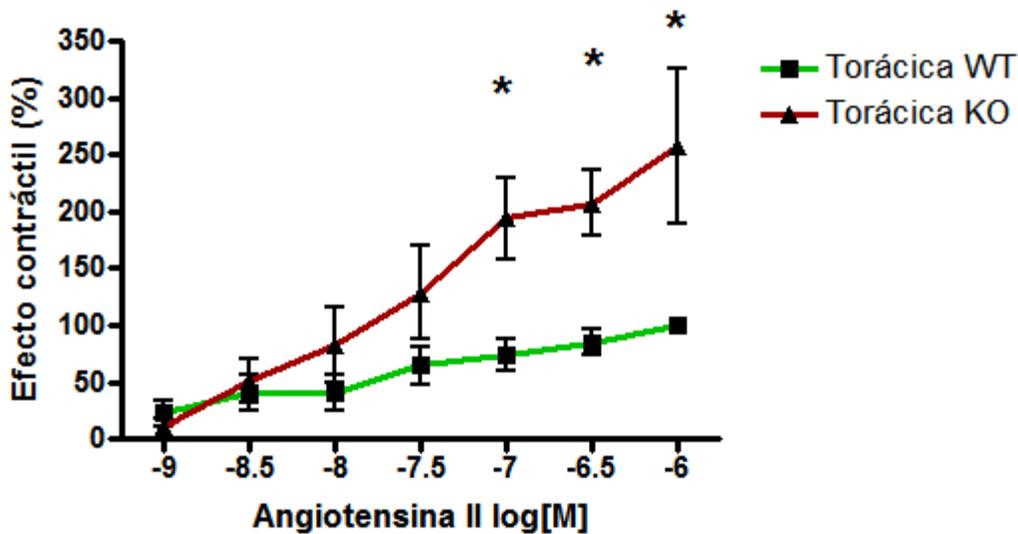
Los valores obtenidos representan el promedio  $\pm$  EEM en todo el trabajo. En todos los experimentos se utilizó una  $n = 6$  animales. Se calcularon los ajustes de curva de regresión no lineales para las curvas de concentración - respuesta y se obtuvo el efecto máximo ( $E_{\text{max}}$ ). Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism, y las comparaciones estadísticas fueron realizadas por ANOVA de dos vías y prueba post hoc Bonferroni a fin de determinar las diferencias en los datos. En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  inferior a 0,05.

## 12. RESULTADOS.

### 12.1.-Curvas concentración respuesta a angiotensina II en anillos de aorta torácica de ratones nulos $\delta$ -SG (KO, mutante) comparado con el ratón silvestre (WT).

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos al administrar angiotensina II ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) en anillos de aorta torácica. Se observa en la gráfica que la angiotensina II indujo contracción mayor en el ratón KO comparado con el ratón silvestre (WT).

Este aumento en la respuesta contráctil observada el ratón KO podría deberse a una alteración en la regulación en la respuesta relajante dependiente de endotelio.

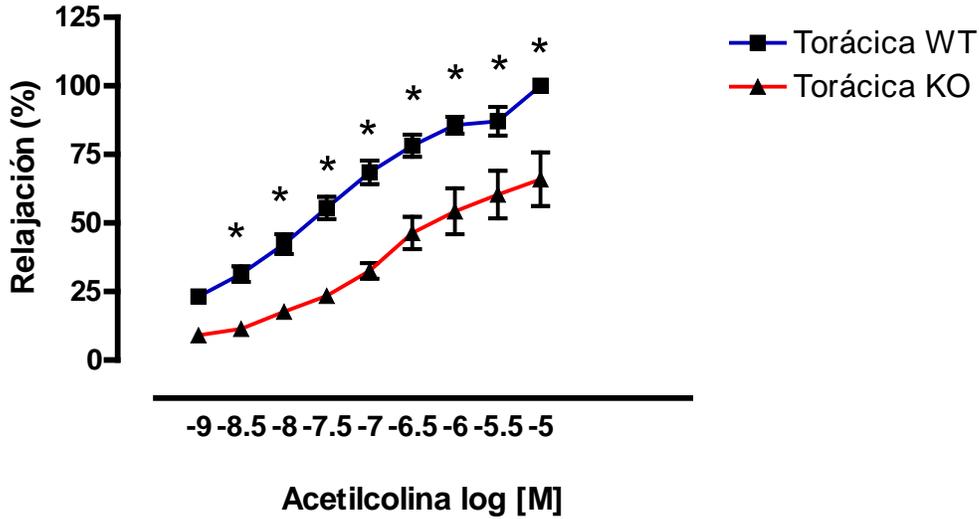


$p < 0.001$   $n = 6$

**Figura 4. Curva concentración respuesta a angiotensina II ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M) en anillos de aorta torácica en ratones WT y KO.** Cada barra representa la media  $\pm$  EEM. n=6 (número de animales). La contracción desarrollada se expresa en porcentajes tomando como 100% el efecto máximo obtenido en los anillos provenientes del ratón WT.

**12.2.-Curva concentración respuesta a acetilcolina en anillos de aorta torácica de ratones nulos  $\delta$ -SG (KO, mutante) comparado con el ratón silvestre (WT).**

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos al administrar acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) en anillos de aorta torácica de ratones nulos  $\delta$ -SG (KO, mutante) y de ratones silvestres (WT). Observamos que a la administración de acetilcolina a los anillos provenientes de la aorta torácica del ratón nulo  $\delta$ -SG (KO) tuvo una menor relajación comparado con la respuesta obtenida de los anillos provenientes del grupo control (WT). Estos datos sugieren que en el ratón KO está alterada la respuesta relajante dependiente de endotelio.



p<0.0001

**Figura 5 .Gráfica de curva de concentración respuesta para acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) en anillos de aorta torácica de ratones KO y ratones WT.** Cada barra representa la media  $\pm$  EEM. n=6 (número de animales). La relajación desarrollada se expresa en porcentajes tomando como 100% el efecto máximo obtenido en los anillos de aorta torácica provenientes de ratón WT.

### **12.3 Curva concentración respuesta a angiotensina II en anillos de aorta torácica de ratón WT en presencia de L-NAME.**

En la figura 6, se muestran los resultados obtenidos al administrar angiotensina II ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) en anillos de aorta torácica del ratón silvestre WT en

presencia y ausencia del inhibidor de óxido nítrico: L-NAME ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ). En la gráfica observamos una tendencia a inhibición de la curva de los anillos tratados con el L-NAME; sin embargo, no es significativa estadísticamente ( $p > 0.05$ ), lo que nos sugiere que el óxido nítrico no parece participar en la alteración de la respuesta relajante dependiente de endotelio en los anillos provenientes de ratón WT.

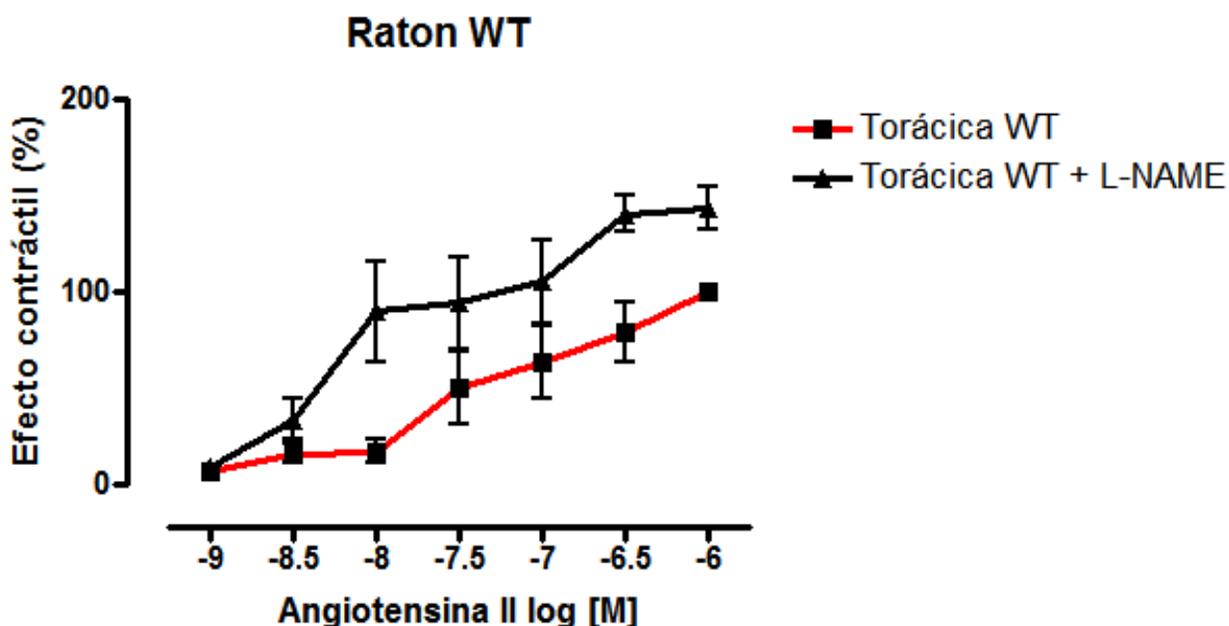
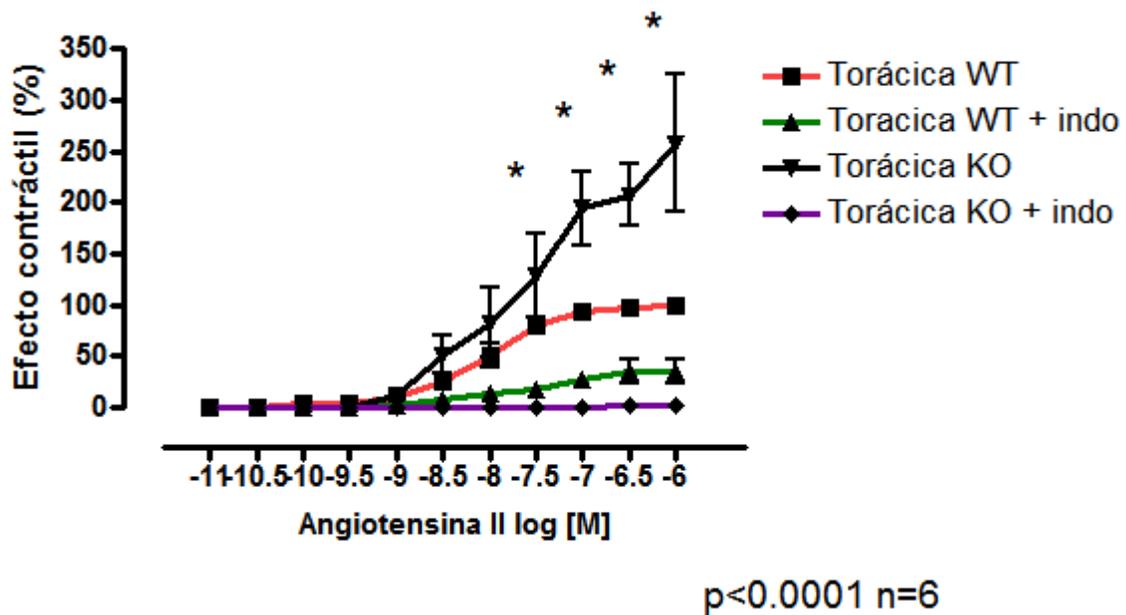


Figura 6. Curva de concentración- respuesta a angiotensina II ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) en anillos de aorta torácica de ratones WT en ausencia y presencia del inhibidor de óxido nítrico: L-NAME ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ).  $n=6$  (número de animales). Los resultados se expresan en porcentajes tomando como 100% el efecto máximo obtenido en los anillos provenientes de ratón WT.

#### **12.4 Curvas concentración respuesta a angiotensina II en anillos de aorta torácica de ratón KO y WT en presencia y ausencia de indometacina**

En la figura 7, se muestran los resultados obtenidos al administrar angiotensina II ( $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) en anillos de aorta torácica de ratón KO y de ratón WT en presencia de indometacina ( $10^{-5}$ M). Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas en la respuesta contráctil entre el ratón KO sin indometacina y el ratón KO con pre- tratamiento con indometacina con una ( $p < 0.0001$ ), mientras que entre el ratón WT sin indometacina y el ratón WT con pre-tratamiento no hay diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ); lo anterior nos sugiere que en el ratón KO existe la participación de un prostanóide contráctil el cual se inhibe por completo en presencia de indometacina; en tanto que en el ratón WT la inhibición en los anillos aórticos no es significativa estadísticamente, lo que sugiere un mecanismo contráctil- alterado en el ratón knock-out.



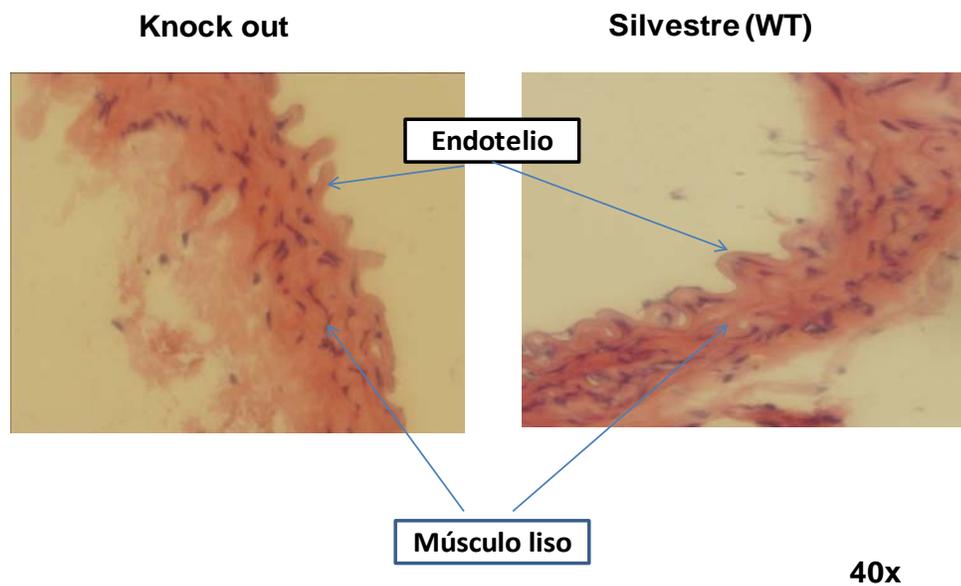
**Figura 7. Gráfica de la curva concentración respuesta a angiotensina II en anillos de aorta torácica de ratones WT y KO en presencia y ausencia de indometacina.** Se muestran los resultados obtenidos al administrar angiotensina II ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) en anillos de aorta torácica provenientes de ratón KO y de ratón WT en presencia de indometacina ( $10^{-5}$ M). n=6 animales.

### 12.5 Histología de la aorta torácica del ratón KO y el ratón WT.

En los cortes histológicos de la aorta torácica del ratón WT y KO, podemos apreciar cambios morfológicos. Específicamente se observa aplanamiento de las células endoteliales, aumento en el espesor de la capa media por hipertrofia de células musculares lisas en el ratón KO. Mientras que en el corte

transversal de aorta torácica de ratón wild type (WT) con tinción de hematoxilina-eosina a un aumento de 40x, donde se observan células endoteliales, espesor de capa media y adventicia de características normales.

**(Fig. 8)**



**Figura 8. Cortes histológicos de aorta torácica de ratón KO y ratón WT.**

Corte transversal de anillos provenientes de aorta torácica de ratón nulo  $\delta$ -SG (KO) y de ratón wild type con tinción de hematoxilina-eosina a un aumento 40x.

### 13. DISCUSIÓN

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de alteraciones caracterizadas patológicamente por degeneración y necrosis del músculo. Clínicamente el fenotipo patológico está representado por debilidad muscular a nivel de la cintura pélvica y escapular, lo cual es progresivo. Diferentes tipos de distrofia muscular tienden a afectar a los grupos musculares y pueden involucrar tanto músculo esquelético así como músculo liso. Las distrofias musculares se pueden asociar a cardiomiopatía cuando se presentan defectos genéticos en los componentes del complejo de proteínas asociados a distrofina (DAPC).

Mutaciones en el gen de distrofia conduce a una alta incidencia de cardiomiopatía en pacientes con distrofia muscular de Duchenne /Becker y pueden causar cardiomiopatía ligada al cromosoma X.<sup>42,43</sup> Mutaciones en los genes  $\beta$ -  $\delta$ - y  $\gamma$ -Sarcoglicano, son responsables de distrofia muscular de cintura que frecuentemente se asocian a cardiomiopatía.

Los sarcoglicanos  $\alpha$ , y  $\gamma$  se expresan en músculo esquelético, en contraste  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$  se expresan adicionalmente en el músculo liso vascular (por ejemplo en arterias coronarias). Se han realizado estudios en modelos nulos del gen  $\delta$ -sarcoglicano para el estudio de la fisiopatología de la cardiomiopatía; Durbeej et al, realizaron un estudio *in vivo* perfusión de arterias coronarias revelaron constricciones vasculares a menudo asociadas con dilataciones pre y post-estenóticas y en general disminución del tamaño del lumen de los vasos.<sup>44</sup> En

el grupo de trabajo de Straub V, Campbell K,<sup>45</sup> describen que tanto la alteración en la función vascular como los eventos de isquemia persistentes tienen un papel significativo en la patogénesis de la cardiomiopatía en el ratón nulo  $\delta$ -SG. Existen pocos trabajos para el estudio de la respuesta vascular funcional de músculo liso vascular realizados en modelos animales deficientes de genes que codifica para distrofina y para  $\delta$ -sarcoglicano.

Nuestro estudio evaluó la reactividad vascular en aorta torácica en un modelo experimental de ratón nulo  $\delta$ -SG, se realizaron curvas concentración-respuesta a angiotensina II, un vasoconstrictor dependiente de receptores  $AT_1$  en músculo liso vascular, en donde se encontró que la respuesta contráctil a la administración de angiotensina II es mayor en el ratón nulo  $\delta$ -SG (knock-out KO) comparada con el ratón silvestre (WT), datos similares a lo reportado por Dye W.W et al, 2007,<sup>46</sup> en el que estudiaron las posibles alteraciones mecánicas de la pared vascular, en tres grupos de ratones faltantes de genes que codifican distrofina (mdx),  $\delta$ -sarcoglicano (sgcd<sup>-/-</sup>) y ratones wild type (WT), realizaron pruebas de presión-diámetro y de longitud axial de arterias carótidas comunes de los ratones, en estado basal y activo, realizaron también respuestas funcionales a tres compuestos vasoactivos (fenilefrina PE, para probar la contractilidad de músculo liso, cloruro de carbamicolina Cch, para probar la relajación de músculo liso dependiente de endotelio, y nitroprusiato de sodio SNP para probar la relajación de músculo liso independiente de endotelio) a una presión y longitud constante. Reportando en cuanto a la

respuesta funcional, después de la dosis de PE, que las arterias de ratones *sgcd* *-/-* tuvieron una vasoconstricción significativamente mayor que las arterias del ratón *mdx* y del ratón WT. Todos los grupos tuvieron una respuesta vasodilatadora similar a CCh con una relajación del WT hasta 84% y *mdx* y *sgcd* *-/-* relajación hasta 82% de su diámetro pasivo. En la respuesta a SNP, la arteria proveniente de el ratón WT relajo hasta 97% de su diámetro final mientras que *mdx* y *sgcd* *-/-* relajo 95%, es decir, las arterias de *mdx* y *sgcd* relajan menos los que las del WT, esto fue similar al reporte de grupo de Laurent et al 2001,<sup>47</sup> en un modelo animal deficiente de distrofina (*mdx*), en el cual estudiaron la respuesta muscular y endotelial en arterias carótidas y mesentéricas con un arteriografo para controlar la presión y el flujo intraluminal, reportado una reactividad vascular normal con excepción de la dilatación inducida por flujo, que se encontró disminuida, posteriormente Laurent et al,<sup>48</sup> realizan un siguiente estudio en animales *mdx* pero tratados con gentamicina, reportando que la contracción de músculo liso dependiente así como la dilatación a acetilcolina (endotelio dependiente) y nitroprusiato de sodio (independiente de endotelio), no se afecto por la ausencia de distrofina y/ o por gentamicina.

El incremento en la respuesta contráctil en el ratón KO que se encontró en nuestro estudio podría deberse a una falta de regulación del tono vascular relajante dependiente del endotelio por lo que se analizó la respuesta a acetilcolina observándose que la respuesta relajante dependiente del

endotelio fue menor en el ratón KO comparada con el ratón WT, estos resultados coinciden con lo descrito por Dye W.W.<sup>46</sup> Gráfica (5).

Esta alteración en la respuesta contráctil sugiere modificaciones en el efecto de algún factor relajante derivado del endotelio, para evaluar la participación del ON y/o prostaciclina en el incremento en la respuesta vascular contráctil de ratones KO observada en nuestros resultados, se realizó una curva de concentración respuesta a la angiotensina II en los anillos aórticos provenientes de los ratones WT con pre-tratamiento de L-NAME, un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, sin embargo los resultados obtenidos no presentaron diferencias significativas en la respuesta vascular contráctil entre el ratón WT tratado y el no tratado, sugiriéndonos con esto que en los ratones WT la respuesta contráctil incrementada a la angiotensina II en la aorta torácica no es regulada por el óxido nítrico endotelial.

En los resultados obtenidos en este estudio se observa una alteración en la respuesta contráctil a la angiotensina II así como en la relajación a acetilcolina en el ratón KO comparada con el ratón WT, lo que nos sugiere una modificación en la respuesta tanto contráctil como relajante en los vasos del ratón con la distrofia muscular de cintura con cardiomiopatía, lo cual no se presenta en el ratón sano.

Por otro lado parece que en la contracción a la angiotensina II en la aorta del ratón WT el ON no participa en la regulación de la respuesta contráctil a angiotensina.

Para analizar si la respuesta contráctil a angiotensina II en el ratón KO se encuentra modificada la participación de prostanoideos contráctiles o relajantes; se realizaron curvas de concentración respuesta a angiotensina II en presencia y ausencia de indometacina que es un inhibidor COX-1 y COX-2. Los resultados obtenidos mostraron una inhibición de la respuesta contráctil a la angiotensina II en el ratón KO casi del 100%, pero no del ratón WT en donde solamente se observó una mínima inhibición sin diferencia estadísticamente significativa. Esto parece indicar la participación de un prostanoide contráctil incrementada en el ratón KO, la cual no se encuentra incrementada en condiciones normales ya que su acción es modulada en forma inhibitorio por el endotelio mediante la producción de óxido nítrico de acuerdo a lo reportado en el estudio realizado por Castillo M. C et al,<sup>35</sup> en aortas torácicas de ratas reportaron que en la respuesta contráctil a Ang II participan prostanoideos contráctiles producidos en las células de músculo liso vascular.

Con la finalidad de integrar el estudio se analizó si los cambios en la respuesta vascular observados son solo cambios en la respuesta fisiológica o bien si existe en cambio estructural entre el vaso del ratón WT y el KO. Histológicamente observamos que en los cortes transversal de aorta torácica de ratón nulo de  $\text{ger}^{\text{ñ}}$ -SG (KO) con tinción de hematoxilina-eosina, con un

aumento 40x y 10x, se existe un aplanamiento de las células endoteliales así como un aumento en el espesor de la capa media por hipertrofia de células musculares lisas, mientras que en la aorta torácica de ratón wild type (WT) se observan células endoteliales normales, espesor de capa media y adventicia de características normales, lo cual es similar a lo reportado en los estudios ya existentes tal es el caso de lo reportado por Lipskaia L. et al <sup>49</sup> en el que realizaron un estudio en aortas torácicas de hámster con mutación del gen  $\delta$ -sarcoglicano que presentan cardiomiopatía dilatada (CHF 147) para examinar si estaba alterada la célula de musculo liso vascular y realizaron una medición morfométrica los cortes de las aortas torácicas teñidos con hematoxilina-eosina, reportando que el espesor de la media de la aorta torácica de los hámster WT fue homogénea mientras que en los hámster mutantes hubo numerosas zonas de atrofia y marcada hipertrofia. El valor de la media de CHF 147 fue más bajo que el valor de WT ( $15.8 \pm 6.9$  vs  $19.4 \pm 2.8$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ), esto fue similar a lo encontrado en nuestro estudio. Sin embargo en el estudio realizado por Dye W.W et al,<sup>46</sup> donde comparan las propiedades funcionales y biomecánicas de arterias carótidas entre ratón deficiente de distrofina (mdx), ratón deficiente de  $\delta$ -sarcoglicano (sgcd -/-) y ratón control wild-type, observaron con tinción de Hematoxilina-eosina, que a pesar de la similitud de las características morfológicas y el espesor de la pared, el porcentaje de la pared ocupado por la media parecía ser menos en ambos ratones mdx ( $0.32 \pm 0.09$ ) y el sgcd -/- ( $0.34 \pm 0.07$ ) comparado con el control WT ( $0.39 \pm 0.08$ ),

sugiriendo así mas adventicia y colágeno adventicial en los dos modelos de ratones de distrofia muscular .

#### **14. CONCLUSIONES**

1. Existe un incremento en la respuesta vascular contráctil a angiotensina II en el ratón knock-out (KO).
2. No parece estar participando de forma importante el ON en la regulación de la respuesta vascular contráctil en los ratones KO.
3. En cuanto a la participación de prostanoïdes contráctiles en esta patología, nuestros resultados sugieren una participación de prostanoïdes contráctiles en el ratón KO.
4. Se observaron cambios estructurales en músculo liso y endotelio del ratón KO.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. **Coral-Vázquez R, Cohn R D., Moore S, Hill J A., Weiss R M.** Disruption of the Sarcoglycan- Sarcospan Complex in vascular Smooth Muscle: A novel Mechanism for Cardiomyopathy and Muscular Dystrophy. *Cell*, 1999;98:465-474.
2. **Estrada J. Francisco, Mornet Dominique, Rosas-Vargas Hayde, Angulo Alexandra, Hernandez Manuel, Becker Viola, Rendón Alvaro, Kuri-Ramos, Coral-Vázquez.** A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem and Biophys Res Commun.* 2006;340(3):865-871.
3. **Lapidos Karen A. , Kakkar Rahul , Mc Nally Elizabeth.** The Dystrophin Glycoprotein Complex Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circ Res.*2004;94:1023-1031.006;340(3):865-71.
4. **Campbell KP.** Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton extracellular matrix linkage. *Cell* 1995;80:675–679.
5. **Heydemann A, McNally EM.** Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(2):55-9.
6. **Straub V., Ettinger, A.J Durbeej, M., Venzke, D. P., Cutshall, S., Sanes, J., and Campbell, KP (1999).**  $\epsilon$ -sarcoglycan replaces  $\alpha$ -sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J.Biol.Chem.*1999;274:27989-27996.

7. **Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, and Campbell KP.** Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 1998;142:1461–1471.
8. **Sam S. Oh, Kirk L. Peterson and John Ross, Jr. Yasuhiro Ikeda, Maryann Martone, Yusu Gu, Masahiko Hoshijima, Andrea Thor.** Altered membrane proteins and permeability correlate with cardiac dysfunction in cardiomyopathic hamsters. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1362-H1370.
9. **Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G, Salandi A, Daniel S, Cornelio F, Morandi L, Mora M.** Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by  $\beta$ -sarcoglycan mutations. *J Med Genet.* 2000;37:102–107.
10. **Lim , LE, and Campell KP.** The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin. Neuro.*1998;11:443-452 .
11. **Melacini R, Fanin M, Duggan D Freda MP, Berardinelli A, Daneli G.A, Barchita A, Hoffman E.P, Dalla Volta S, and Angelini C,** Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Musc Nerv* 1999;22: 473-479.

12. **Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA.** Mutations in the human  $\delta$ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2000;106:655–662.
13. **Cohn R D, Durbeej M, Moore S, Coral-Vazquez R, Prouty S and Campbell K.** Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Clin Inv.* 2001;107:R1-R7.
14. **Santeliz Contra H, Estrada Romano L .** El Sistema renina-angiotensina-aldosterona en la presión arterial. *Rev Mex Cardiol* 2008; 19(1):21-29.
15. **Touyz R, Schiffrin E.** Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol Reviews,* 2000;52:639-672. 42/865372.
16. **Harrison Bernard L.** The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ* 33:270-274.2009.
17. **Ramasubbu K, MD, Mann Douglas L, MD, Deswal Anita, MD MPH.** Anti-angiotensin Therapy: New Perspectives. *Cardiol Clin* 2000;25:573-580.
18. **Pérez-Díaz Iván, Hiriart Marcia, Olivares-Reyes, Robles Díaz.** Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: características y su papel en el funcionamiento

celular. Revista de educación bioquímica, junio, año/col.25, número 002.  
UNAM.pp55-60.

19. **Allen AM, Zhuo J and Mendelson FAO.** Localization and function of angiotensin AT1, receptors. *Am J Hypertens* 2000;13:31A-38s.
20. **Wynne Brandi M, M.S. Chiao Chin-Wei, Ph.D., and Webb R Clinton , Ph.D.** Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*, .2009;3(2):84-95.
21. **Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, Koshimizu, Oikawa Ryo, Daicho T, Takeo S.** Effects of ACE inhibitor and AT1 blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart. *Car Res* 2005;65:356-365.
22. **Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, Koshimizu, Oikawa Ryo, Daicho T, Takeo S.** Effects of angiotensina I-converting enzyme inhibitor and angiotensina II type 1 receptor blocker on the right ventricular sarcoglycans and dystrophin after left coronary artery ligation. *Eur J Pharmacol* 2005;522:84-93.
23. **Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL, and Garavito RM.** The productive confirmation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* 2000;289:1933-1937.

24. **Fu JY, Mansferrer JL, Seibert K, Raz A, and Needleman P.** The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990;265:16737-16740.
25. **Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL.** Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl. Aca Sci* 1991; 88:2692-2696.
26. **Otto JC, DeWitt DL, Smith WL.** N-Glycosylation of prostaglandin Endoperoxide Synthases-1 and-2 and Their Orientations in the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 1993;268:18234-18242.
27. **Morita I, Schindler MS, Regier MK, Otto JC, Hori T, Dewitt DL, Smith WL.** Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and-2. *J Biol Chem* 1995;270:10902-10908.
28. **Okamoto T, Hino O.** Expression of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA in rat tissues: tissue-specific difference in the expression of the basal level of mRNA. *Int J Mol Med* 2000;6:455-457.
29. **Yamagata K, Anderasson KI, Kaufmann We, et al.** Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neuron: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993;11:371-386.
30. **Simmons DL, Xie W, Chipman JG and Evett GE.** Prostaglandins, Leucotriens, Lipoxins, and PAF (Bailey, J.M.,) Plenum Press, New York, 1991, pp. 67-78.

31. **Walenga RW, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivede R, and Statt C.** Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. *Prostaglandins* 1996;52(5);341-59.
32. **Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN and Breyer MD.** Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994;94:2504-2510.
33. **Bobadilla RA, Bracho I, Alvarez VM, Anguiano L, Mera JE, Lopez SP.** Pregnancy induced changes in COX-1, COX-2 and NOSIII vascular and renal expression. *Proc West Pharmacol Soc.* 2004;47:25-27.
34. **Manku MS, Horrobin DF.** Indomethacin inhibits responses to all vasoconstrictors in the rat mesenteric vascular bed: restoration of responses by prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1976;12(3):369-76.
35. **Castillo-Hernandez MC, Martinez-Godinez MA, Guevara Balcazar G, Miliar-Garcia A, Mancilla J, Lopez-Mayorga RM, Castillo-Henkel EF, Castillo-Henkel C.** Extraendothelial and constitutive COX-2 expression is involved in the contractile effect of angiotensin II in the rat aorta. *Auton Autacoid Pharmacol.*2010;30(4):205-11.
36. **Toda Noborou, Ayajiki K, Okamura T .**Interaction of Endotelial Nitric Oxide and Angiotensin in the circulation. *Pharmacol Rev* 2007;59:54–87.

37. **Toda N Okamura T.** The Pharmacology of Nitric Oxide in the peripheral Nervous System of Blood Vessels. *Pharmacol Rev* 2003;55:271-1324.
38. **Zhao X, Li X , Trusa S and Olson C .** Angiotensin type 1 receptor is linked to inhibition of nitric oxide production in pulmonary endothelial cells. *Regul Pept* 2005;132:113-122.
39. **Olson S, Oeckler R, Li X, Du L, Traganos F, Zhao X, and Burke-Wolin T.** Angiotensin II stimulates nitric oxide production in pulmonary artery endothelium via the type 2 receptor. *Am J Physiol* 200;287:L559-L568.
40. **Heydemann A, Huber J M, Kakkar R, Wheeler M, Mc Nally E.** Functional nitric oxide synthase mislocation in cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004;36:213-223.
41. **Brennan JE, Chao Ds, Xia H, Aldape K, Bretz DS.** Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995;82:743-52.
42. **Towbin, I.A.** The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:131-139.
43. **Ferlini A, Sewry C, Melis MA, Mateddu A, Muntoni F.** X-linked dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord.* 1999;9(5):339-46.
44. **Durbeej M, Cohn RD, Hrstka F, Moore S, Allamand V, Davidson BL, Williamson RA, and Campbell KP.** Disruption of  $\beta$ -sarcoglycan gene

reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell Biol* 200;5:141-151.

45. **Straub V and Campbell KP.** Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr. Opin. Neurol* 1997;10,168-175.
46. **Dye W.W, Gleason R.L, Wilson E, Humphrey J.D.** Altered biomechanical properties of carotid arteries in two mouse models of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 2007;103:664-672.
47. **Loufrani Laurent, Matrougui K, Gorny D, Duriez Micheline, Blanc I.** Flow /shear stress)-induced endothelium-dependent dilatation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circul.* 2001;103(6):864-870.
48. **Loufrani Laurent, Dubroca Caroline, You Dong, Li Z, Levy Bernad.** Absence of dystrophin in mice reduces NO-dependent vascular function and vascular density: total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 2004;24(4):671-676.
49. **Lipskaia L, Pinet Caroline, Fromes Y, Hatem S, Cantaloube I, Coulombe A, Lompré A.** Mutation of  $\delta$ -Sarcoglycan Is Associated with  $Ca^{2+}$ - Dependent Vascular Remodeling in the Syrian Hamster *The Am J of Pathol* 2007;171:162-171. DOI:10,2353/ajpath.2007.070054