



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**COMUNICACIÓN CRUZADA (CROSS TALK)
ENTRE RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS Y EL
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL
MÚSCULO LISO VASCULAR**

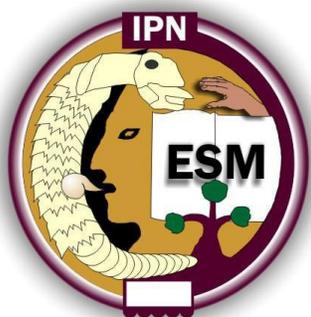
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**“DOCTOR EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA”**

P R E S E N T A:

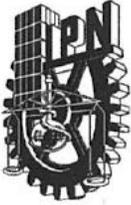
M. EN C. ITZELL ALEJANDRINA GALLARDO ORTÍZ



DIRECTORES DE TESIS

DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA

DR. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 18 del mes de Marzo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

“COMUNICACIÓN CRUZADA (CROSS TALK) ENTRE RECEPTORES α 1-ADRENÉRGICOS Y EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR”

Presentada por la alumna:

Gallardo	Ortiz	Itzell Alejandrina
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

A	0	5	0	5	9	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Investigación en Medicina

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

Dr. Pedro López Sánchez

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dr. Carlos Castillo Henkel

Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo

Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 18 del mes Marzo del año 2011, el que suscribe Gallardo Ortiz Itzell Alejandrina alumna del Programa de Doctorado en Investigación en Medicina con número de registro A050599, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Pedro López Sánchez, Dr. Rafael Villalobos Molina y cede los derechos del trabajo intitulado “COMUNICACIÓN CRUZADA (CROSS TALK) ENTRE RECEPTORES α 1-ADRENÉRGICOS Y EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR”, 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/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección itzellg@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Itzell Alejandrina Gallardo Ortiz

Nombre y firma

Este presente trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y en la Escuela Superior de Medicina, I.P.N., bajo la dirección del Dr. Pedro López Sánchez y el Dr. Rafael Villalobos Molina con apoyo de proyectos patrocinados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT 47481 y la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto PAPIIT 224408.

“La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos”.

(Albert Einstein)

Dedicatorias

A Dios y esos ángeles guardianes

Porque siempre están a mi lado vigilando mis pasos con amor.

A mis padres

Quienes con gran esfuerzo y cariño, me dieron las herramientas necesarias para caminar día a día hacia aquellos sueños o ideales, aún cuando estos pudieran parecer lejanos o inalcanzables. Gracias por sus consejos que siempre han sido parte de mi impulso y sobretodo por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

A mis hermanos Cayo, Isis, y enano

Por fungir como mis compañeros y amigos en esta travesía por la vida, quienes en diversas ocasiones me han enseñado con su ejemplo, que no es importante el ambiente que nos rodea, pues aun en la adversidad han sido vencedores.

A mi abuelita (Cocola)

Porque hasta en el último suspiro, estuviste presente en mi crecimiento, y aun en la lejanía, sigues acompañando silenciosamente mis pasos, pero sobre todo, por haber sido la mujer que me enseñó la alegría de vivir y mostrarme que en el horizonte, siempre hay algo más por descubrir.

A mis sobrinos Liesel, Gilgal y Chicharito

Por ser la luz, la energía y la alegría que impulsa nuestras vidas para un nuevo mañana.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Rafael Villalobos Molina y al Dr. Pedro López Sánchez, quienes además de transmitirme su vocación investigadora, me orientaron, ayudaron y estimularon de manera constante durante estos años, en el desarrollo de este proyecto y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Agradecerles la confianza que siempre me mostraron, así como la dedicación y la atención que me han ofrecido.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo, Dr. Carlos Castillo Henkel, Dr. Enrique Castillo Henkel y Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, por sus valiosas sugerencias que enriquecieron de manera importante este trabajo.

Al Dr. D. Javier Sánchez González de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, por su apoyo y colaboración en las técnicas de Histología, así mismo quiero agradecer al Químico Leonardo del Valle Mondragón, investigador del Departamento de Farmacología del Instituto de Cardiología “Ignacio Chávez”, por su valiosa colaboración e incondicional apoyo para la determinación de hormonas y metabolitos mediante técnicas Cromatográficas.

A mis amigos, Juan Javier López, Maximiliano Ibarra, Patricia Castro, Araceli Arellano, Marian Martínez y Manuel López, por haberme brindado su amistad, cariño y apoyo, compartiendo conocimientos, alegrías y sinsabores, que nos han llevado a formar como una familia, haciendo más agradable nuestra estancia en el laboratorio.

“La Ciencia tiene dos reglas. Primero: No hay verdades sagradas; toda presunción tiene que ser examinada críticamente. Segundo: cualquier inconsistencia con los hechos tiene que descartarse o revisarse. Nosotros tenemos que comprender el Universo como es y no confundir como es con como quisiéramos que fuera”.

(Carl Sagan)

Indice

Glosario de términos	
Resumen (inglés)	
Resumen (español)	
1. Introducción.....	1
1.1 Hipertensión y su prevalencia.....	1
1.2 Remodelación Vascular en la Hipertensión (Cambios estructurales de los vasos).....	4
1.3 Control cardiovascular.....	6
1.4 Regulación humoral de la circulación sistémica.....	7
1.5 Descripción actual del Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	9
1.5.1 Producción de Angiotensina II.....	9
1.5.2 Quimasas.....	10
1.5.3 Angiotensina III (heptapéptido Angiotensina 2-8)	11
1.5.4 Angiotensina IV (hexapéptido Angiotensina 3-8)	12
1.5.5 Angiotensina 1-7 (heptapéptido).....	12
1.5.6 Enzima convertidora de Angiotensina 2 (ECA2).....	13
1.6 Efectos fisiológicos y patológicos de Ang II en el control del sistema cardiovascular.....	15
1.7 Receptores a Angiotensina. Funciones clásicas y novedosas de los receptores AT ₁ y AT ₂	17
1.8 Inflamación y Angiotensina II.....	20
1.9 Receptores adrenérgicos.....	21
1.10 Receptores α_1 -adrenérgicos.....	22
1.11 Receptores α_1 -adrenérgicos vasculares.....	23
1.12 Comunicación entre el SRA y el sistema nervioso simpático.....	25
2. Justificación.....	27
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo general.....	29

4.2	Objetivos particulares.....	29
5.	Material y métodos (Protocolo Experimental).....	30
5.1	Animales.....	30
5.2	Infusión continua de Ang II.....	30
5.3	Tratamiento con BMY 7378 o losartán en animales con y sin bomba de Ang II. Registro de la presión arterial.....	31
5.4	Registro de la presión arterial sistólica en animales conscientes.....	32
5.5	Registro de la contracción isométrica en arterias aorta y caudal aisladas de ratas control y tratadas con angiotensina II.....	32
5.6	Estudio histológico de aorta.....	33
5.7	Aislamiento y cultivo de células de músculo liso vascular de rata.....	33
5.8	Efecto de Ang II sobre la expresión de RNAm de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular en cultivo y en aorta de ratas.....	35
5.9	Efecto de Ang II sobre la cantidad relativa de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular y aorta de rata.....	36
5.10	Medición de Ang II y sus metabolitos.....	37
5.11	Análisis de resultados.....	37
6	Resultados.....	39
6.1	Efecto de la infusión continua de Ang II sobre la presión arterial sistólica.....	39
6.2	Niveles plasmáticos de Ang II de ratas controles y ratas con bomba osmótica con Ang II.....	40
6.3	Efecto contráctil de los agonistas α_1 -adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas control y ratas tratadas con Ang II.....	41
6.4	Evaluación de la reactividad vascular durante la contracción producida con KCl 80 mM en las arterias aortas y caudal.....	44
6.5	Análisis histológico de las arterias aorta torácica y caudal de ratas...	45
6.6	Efecto de los antagonistas losartán y BMY 7378 sobre los niveles plasmáticos de Ang III, Ang IV y Ang 1-7 de ratas controles y tratadas con Ang II.....	47

6.7	Caracterización de los receptores α_1 -adrenérgicos involucrados en la contracción de las arterias aorta y caudal de ratas controles y tratadas con Ang II.....	49
6.8	Efecto de los antagonistas α_1 -adrenérgicos, BMY 7378 y RS100329 sobre el efecto contráctil en la arteria aorta de ratas controles y tratadas con Ang II.....	50
6.9	Expresión de RNAm de los receptores α_1 -adrenérgicos en la arteria aorta de ratas controles y tratadas con Ang II a diferentes tiempos...	54
6.10	Determinación proteica de los receptores α_1 -adrenérgicos en la arteria aorta de ratas controles y tratadas con Ang II a diferentes tiempos.....	58
6.11	Determinación de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular estimuladas con Ang II a diferentes tiempos...	60
6.12	Efecto del losartán sobre el receptor α_{1D} -adrenérgico en células de músculo liso vascular tratadas con Ang II.....	61
7.	Discusión.....	63
7.1	Efecto de la Ang II sobre la presión arterial, remodelamiento y reactividad vascular.....	64
7.2	Remodelamiento Vascular.....	65
7.3	Reactividad Vascular.....	71
7.4	Caracterización de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas con y sin tratamiento con Ang II..	78
7.5	Expresión de RNAm y proteína de los receptores α_1 -adrenérgicos y su relación con la Ang II.....	82
7.6	Catabolismo de Ang II y efectos de sus metabolitos.....	87
8.	Conclusiones.....	90
9.	Perspectivas.....	91
10.	Bibliografía.....	92

Glosario de términos

5HT. Serotonina

α_1 -ARs. Receptores α_1 -adrenérgicos

ADH. Hormona antidiurética

AMP. Aminopeptidasa

Ang I. Angiotensina I

Ang II. Angiotensina II

Ang III. Angiotensina III

Ang IV. Angiotensina IV

AP-1. Activador de Proteína- 1 (activator protein-1)

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

D-AMP. Aminopeptidasa-D

ECA. Enzima convertidora de angiotensina II

ECA2. Enzima convertidora de Angiotensina tipo 2

EDHF. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

ET-1. Endotelina

HA. Hipertensión arterial

ICAM-1. Molécula de adhesión inter-celular tipo 1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)

IECA. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II

IL-6. Interleucina-6 (interleucine-6)

IRAP. Receptor de aminopeptidasas regulado por insulina (*insulin-regulated amino peptidase receptor*)

IRAP/AT₄. Receptores AT₄ o Receptores de aminopeptidasas reguladas por insulina (Insulin-regulated aminopeptidase receptors /AT₄)

MAPK. Proteína Cinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase).

MCP-1. Proteína quimioattractora de monocitos (monocyte chemotactic protein-1)

NA. Noradrenalina

NADPH. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase)

NEP. Endopeptidasa neutra

NF-κB. Factor Nuclear-κB (Nuclear Factor -κB)

NO. Oxido Nítrico

PAI-1. Inhibidor del activador de plaquetas-1 (*platelet activator inhibitor-1*)

PGI₂. Prostaciclina

PLZF. Factor de transcripción de la proteína de leucemia proteolítica con dedos de zinc (promyelocytic leukemia zinc finger protein).

RANTES. Quimiocina (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted)

RAS. Sistema Renina Angiotensina (Renine-Angiotensin System)

SHR. Ratas espontáneamente hipertensas

SNC. Sistema nervioso central

TNFα. Factor de necrosis tumoral-α (Tumoral necrosis factor-α)

TxA₂. Tromboxano A₂

VCAM-1. Molécula de adhesión celular vascular tipo 1 (Vascular cell adhesion molecule-1)

Cross-talk between α_1 -adrenergic receptors and the renin-angiotestsin system in vascular smooth muscle

Abstract.

Angiotensin II (Ang II) has an important function in the regulation of systemic arterial pressure. Interestingly, it is known that renin-angiotensin system components are enhanced in young SHR (plasma renin activity and angiotensinogen concentration), which might contribute to pathogenesis of genetic hypertension. In the cardiovascular system α_1 -adrenoceptors regulate processes such as cardiac and arterial smooth muscle contraction and they have been implicated in pathologies like cardiac hypertrophy or ischemia-induced cardiac arrhythmias. The purpose of this work is to explore the *in vivo* Ang II continuous effect on α_{1D} -adrenoceptors functional expression and hypertrophy in aorta and tail arteries of Wistar rats. Osmotic minipumps (Alzet) filled with Ang II (release of 200 ng/kg/min/14 days) were subcutaneously implanted in 3 months-old male Wistar rats, at the same time, rats were administered with BMY 7378 (10 mg/kg/day/14days) or losartan (1 mg/kg/day/14days) in drinking water. Arterial blood pressure was measured by a tail-cuff method; after 2 weeks arteries were isolated and used for contractile experiments. Ang II induced an early and sustained increase in blood pressure and a maximal effect at 11 days (136 ± 4 vs 104 ± 4 mmHg) however, when losartan (antagonist AT_1) was administered in the drinking water, it prevented the development of hypertension, whereas hypertension was not prevented with BMY 7378 (antagonist α_{1D} -ARs). At the functional level, phenylephrine, A61603 and KCl (80mM) induced contraction in aorta was greater in Ang II-treated rats, ~40% more than in control groups, this increase was observed only in aorta but not in caudal artery; furthermore, BMY 7378 and losartan inhibited the hyperreactivity produced by Ang II in aorta. Similar events were observed by vessels histology, where only the aorta of rats treated with Ang II developed hypertrophy.

Vascular smooth muscle cells (VSMC) were incubated with Ang II (100 nM) for different periods of time (30min-24hrs), and protein was determined by Western blot for α_1 -ARs. Data showed an important increment of α_{1D} -ARs after 30 min of Ang II incubation, then a time-dependent diminution in the expression of protein at later measurement points. Whereas α_{1A} -ARs shown opposite effects, they decreased at short times and returned to basal. α_{1B} -ARs were not modified by the peptide. Maximal expression was blocked by losartan and inhibited by cycloheximide. This data suggest that stimulation of AT_1

receptors by Ang II increased α_{1D} -ARs in isolated cells, and this effect is due to synthesis de novo of that receptor.

These data support a putative crosstalk between Ang II and α_{1D} -adrenergic pathways in the vascular remodeling and this effect might be related with hypertension and hyperreactivity induced by Ang II.

Comunicación cruzada entre receptores adrenérgicos α_1 y el sistema renina-angiotensina en el músculo liso vascular.

Resumen

La angiotensina II (Ang II) tiene una función importante en la regulación de la presión arterial sistémica. De manera interesante, se sabe que los componentes del sistema renina-angiotensina se encuentran incrementados en jóvenes SHR (actividad de renina plasmática y concentración de angiotensinógeno), los cuales pueden contribuir a la patogénesis de la hipertensión genética. En el sistema cardiovascular los receptores adrenérgicos α_1 regulan procesos como la contracción del músculo liso vascular y cardíaco y han sido implicados en patologías como la hipertrofia cardíaca o las arritmias cardíacas inducidas por isquemia. El propósito de este trabajo es explorar *in vivo* el efecto de la infusión continua con Ang II sobre la expresión funcional de receptores adrenérgicos α_{1D} (α_{1D} -ARs) y la hipertrofia en la aorta y en la arteria caudal de ratas Wistar. Se implantaron subcutáneamente minibombas osmóticas (Alztec) con la Ang II (dosis de 200 ng/kg/min/ durante 14 días) en ratas macho de 3 meses de edad, al mismo tiempo, a las ratas se les administró BMY 7378 (10 mg/kg/day/durante 14 días) ó losartán (1 mg/kg/day/ durante 14 días) en el agua que bebían. La presión arterial fue medida por el método pletismográfico; luego de dos semanas las arterias fueron aisladas y se usaron en experimentos de contracción. La Ang II induce un incremento sostenido de la presión arterial con un efecto máximo a los 11 días (136 ± 4 vs 104 ± 4 mmHg) sin embargo, cuando se administró losartán (antagonista AT_1) en el agua para beber, previno el desarrollo de hipertensión, mientras que la hipertensión no se evitó con BMY 7378 (antagonista α_{1D} -ARs). A nivel funcional, la fenilefrina, A61603 y el KCl (80mM) inducen un aumento en la contracción en las aorta de ratas tratadas con Ang II, ~40% más que en el grupo de control. Este incremento se observó sólo en la arteria aorta pero no en la arteria caudal; además, el BMY 7378 y el losartán inhibieron la hiperreactividad producida por el Ang II en la aorta. Eventos similares se observaron a través de la histología de los vasos sanguíneos, en donde sólo la aorta de ratas tratadas con Ang II desarrolló hipertrofia.

Células de músculo liso vascular (VSMC) se incubaron con Ang II (100nM) a diferentes tiempos (30min-24hrs) y la proteína fue determinada por WB para subtipos de receptores α_1 -ARs. Los datos muestran un importante incremento de receptores α_{1D} -ARs después de 30 minutos de incubación con Ang II, luego una disminución dependiente del tiempo en la

expresión de la proteína en mediciones posteriores. Mientras que con los receptores α_{1A} -ARs muestran efectos opuestos, ellos disminuyeron en períodos cortos y regresaron a niveles basales. Los α_{1B} -ARs no fueron modificados por el péptido. La expresión máxima fue bloqueada por el losartán e inhibida por la cycloheximida.

Estos datos sugieren que la estimulación de receptores AT_1 por el Ang II incrementó los receptores α_{1D} -ARs en células aisladas y este efecto se debe a la síntesis de novo de ese receptor.

Estos datos apoyan una posible comunicación cruzada entre Ang II y la vía de señalización de receptores α_{1D} -ARs en el remodelamiento vascular y este efecto puede estar relacionado con la hipertensión y la hiperreactividad inducida por Ang II.

1. Introducción

1.1 Hipertension y su prevalencia

La hipertensión arterial es definida como un padecimiento crónico de etiología variada y se caracteriza por un aumento en la resistencia vascular periférica, la cual se debe en gran parte a alteraciones funcionales y estructurales de las arterias (Folkow, 1982; Marin, 1993; Mulvany *et al.*, 1996). En el 5-10% de los casos existe una causa directamente relacionada con la elevación de la presión (por ejemplo: defectos congénitos en el corazón, anormalidades renales, aldosteronismo primario, ciertos tipos de cáncer como el feocromocitoma), a este tipo de hipertensión se le conoce como *hipertensión arterial secundaria*. En el 90-95% restante, la enfermedad es denominada *hipertensión primaria o esencial*, donde la causa es desconocida. En los estadios iniciales, la actividad simpática y el gasto cardiaco están incrementados, pero cuando la hipertensión ya está establecida, la actividad simpática y el gasto cardiaco son normales, así como todos los parámetros humorales. La única excepción es la presión arterial, la cual teóricamente es igual al producto del gasto cardiaco y la resistencia periférica. Así, el aumento en la resistencia implica un estrechamiento de los vasos de resistencia que no parece ser por aumento de la activación intrínseca, y debe ser por cambios en los propios vasos (Mulvany, 2008).

La hipertensión arterial es una enfermedad frecuente, que en sus fases iniciales es asintomática, es de fácil detección y casi siempre sencilla de tratar. Sin embargo, cuando la hipertensión no es atendida durante un período de años, puede llevar a un gran número de complicaciones, algunas de las más importantes son la arterioesclerosis y la cardiopatía hipertensiva. Por éstas razones, la hipertensión es, probablemente, el factor de riesgo más importante en enfermedades cardiovasculares, incrementando el infarto cardiaco, accidente vascular cerebral e insuficiencia renal (Scheuer, 2008), y es uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo (Williams, 1994), ocupando los primeros lugares de las causas de morbilidad y mortalidad.

La prevalencia de la hipertensión depende, tanto de la composición racial de la población estudiada como de los criterios empleados para definir el proceso. En las mujeres se relaciona estrechamente con la edad y aumenta considerablemente a partir de los 50 años, probablemente asociado con los cambios hormonales producidos durante la menopausia. Se estima que aproximadamente mil millones de personas la padecen, y en México, la hipertensión ocupa el primer lugar de las causas de morbilidad y mortalidad en donde la prevalencia es del 30.8% en la población mayor de 20 años (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006). Esta prevalencia está directamente relacionada con la edad, ya que después de los 50 años en los hombres supera el 50%, y en el caso de las mujeres al llegar a esta edad alcanza y supera a los hombres (Olaiz G, 2006).

Numerosos factores contribuyen en el desarrollo de la hipertensión, como el consumo de alcohol, edad, obesidad, sensibilidad a la sal, género, alteraciones en el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRA), y resistencia a la insulina, entre otros. Además, durante mucho tiempo se ha supuesto que los factores genéticos son importantes en la génesis de la hipertensión. Estudios con animales y en poblaciones humanas apoyan la hipótesis: la herencia es probablemente multifactorial o diversos defectos genéticos tienen como una forma de expresión fenotípica, la elevación de la presión arterial. Así, se han examinado más de 50 genes sensibles en relación con la hipertensión, y su número cada vez es mayor (Anthony S. Fauci, 2006).

A pesar de la gran cantidad de investigaciones realizadas en este campo, no se conocen los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de la hipertensión; sin embargo, en el ámbito vascular se han propuesto tres factores involucrados en la patogénesis de la hipertensión:

- 1) Hipersensibilidad de los vasos sanguíneos a estímulos vasoconstrictores.

- 2) Disfunción endotelial, que parece ser de gran importancia durante el desarrollo de la enfermedad. (Marin, 1993; Williams, 1994; Mulvany, 2008).
- 3) Cambios estructurales en las paredes de los vasos sanguíneos, en donde se muestra una clara reducción del diámetro luminal y aumento en la relación media/lúmen y, en cierta medida, rarefacción de los lechos vasculares.

Aunque es bien conocida la participación de otros órganos como el corazón, el riñón y el sistema nervioso central (Hollenberg, 2000).

La hipersensibilidad del músculo liso vascular en respuesta a noradrenalina y a otros agentes vasoconstrictores como angiotensina II (Ang II) y endotelina (ET-1), se ha sugerido como un elemento involucrado en la elevación y el mantenimiento de la alta presión arterial en ratas SHR (espontáneamente hipertensas). Sin embargo, en el caso de la noradrenalina, se desconoce si este fenómeno está relacionado con un incremento en la afinidad o en el número de receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -ARs), con predominancia de alguno de ellos o con cambios en los eventos post-receptor, pues existe controversia con algunos datos experimentales, ya que se ha descrito aumento, disminución o inclusive ausencia de cambio en la respuesta contráctil a noradrenalina (Suzuki *et al.*, 1994). En este sentido, Schiffrin (1992) reportó que los vasos sanguíneos de resistencia tienen modificaciones funcionales y estructurales, que dan como resultado la elevación de la presión arterial, de manera que el efecto presor a vasoconstrictores se amplifica por la interacción con otros factores para conservar la tensión elevada.

Por otra parte, la disfunción endotelial presupone la disminución de los factores relajantes [óxido nítrico (NO), prostaglandina I₂ (prostaciclina, PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)], y aumento de los factores contráctiles endoteliales [prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TxA₂) y otros prostanoides], así como aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno debidas a estrés oxidativo, conduciendo a la desregulación del endotelio y

al desbalance en el tono del músculo liso vascular (De Artiñano and Gonzalez, 1999; Touyz, 2003; Touyz, 2005).

1.2 Remodelación Vascular en la Hipertensión

(Cambios estructurales de los vasos)

El concepto de que el aumento en la resistencia periférica durante la hipertensión se debe a cambios estructurales en la vasculatura de resistencia, fue propuesta por el grupo de Folkow (Folkow, 1956), donde el grosor de la pared de los vasos se incrementa, por lo que aumenta la relación pared/luz. Esta propuesta ha sido confirmada por otros grupos; además, se ha sugerido que la alteración morfológica no se debe a un incremento en la masa de la pared vascular, sino a una nueva disposición de los componentes del interior del vaso es decir, otra forma de reordenamiento denominada *remodelamiento eutrófico*. Los cambios estructurales en los vasos sanguíneos se denomina "remodelación vascular"; aunque se ha sugerido que el término "remodelación" debe limitarse a situaciones donde cambia la luz del vaso en estado relajado, por reacomodo del tejido existente en torno al pequeño lumen (Mulvany *et al.*, 1996).

Durante la remodelación en el vaso, hay un proceso activo de cambios estructurales, relacionados con alteraciones en procesos celulares (incluyendo crecimiento, apoptosis, migración, inflamación y producción de proteínas de matriz extracelular), y que incrementa la relación *tunica media*/lumen; mientras que en la remodelación fisiológica hay cambios adaptativos, que ocurren en respuesta a cambios hemodinámicos y a la edad. Sin embargo, el aumento en la relación *tunica media*/lumen en pequeñas arterias de resistencia, debido a un aumento en la masa muscular o a un reacomodo inadecuado de elementos celulares y no celulares, favorecen de manera importante la fisiopatología de la hipertensión y sus complicaciones. Los cambios estructurales pueden aumentar la reactividad vascular, la cual potencia el incremento en la resistencia periférica característica de la hipertensión (Touyz, 2007). En este contexto, desde hace varios años se ha

sugerido que la hipertensión primaria se asocia con los cambios estructurales en los vasos de resistencia, de manera que la luz de los vasos se reduce y la relación de la *tunica* media/lumen aumenta (Mulvany *et al.*, 1996).

De manera específica podemos describir a la pared vascular como un órgano activo, flexible e integrado por células (células endoteliales, células del músculo liso vascular, y fibroblastos), y componentes no celulares (matriz extracelular). Es un órgano dinámico que cambia de forma y sus componentes aumentan, disminuyen, o se reorganizan, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos (Dubey *et al.*, 1997). En los vasos intactos, las células del músculo liso y la matriz son responsables de características estructurales y funcionales de la pared vascular, como la contracción-relajación, crecimiento, desarrollo, remodelamiento y reparación; asimismo, están involucradas en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, reestenosis y la hipertensión. Muchos factores locales y sistémicos regulan la función de las células de músculo liso vascular como los péptidos vasoactivos (Ang II y ET-1), que estimulan el crecimiento y la vasoconstricción, y factores vasorelajantes como el NO, la PGI₂, y el péptido natriurético C, aumentando los niveles de nucleótidos cíclicos (Touyz & Schiffrin, 2000).

Se ha propuesto que una vez que la hipertensión arterial se ha establecido surgen los cambios estructurales en la vasculatura sistémica. En los vasos de calibre grande y mediano, como en el ventrículo izquierdo, hay una clara evidencia histológica de hipertrofia de las capas medias del músculo liso, pero al disminuir el tamaño de los vasos como en las arterias pequeñas, que conforman la vasculatura de resistencia, se producen otro tipo de cambios. En la hipertensión primaria, las células musculares lisas de vasos pequeños se reestructuran en torno al diámetro luminal, haciéndose más pequeños, pero no hay evidencia de hipertrofia o hiperplasia de la pared vascular; mientras que en las formas de hipertensión secundaria, que representan las formas más severas de la enfermedad, se observa la remodelación hipertrófica. Las alteraciones en la arquitectura vascular de las arterias pequeñas pueden tener gran importancia pronóstica en los

pacientes, y puede estar por encima de todos los demás factores de riesgo cardiovascular. A pesar de que no se ha establecido si la regresión de estos cambios debería ser un objetivo del tratamiento antihipertensivo eficaz, hay evidencia que sugiere fuertemente que corregir la estructura vascular requiere terapia vasodilatadora; así, existen estudios que demuestran que en pacientes tratados con diferentes vasodilatadores (antagonistas de calcio, inhibidores de la ECA, y bloqueadores de receptores AT₁), todos son capaces de normalizar la estructura de las pequeñas arterias (Mulvany, 2008). Este efecto sobre la reversión de alteraciones en la estructura vascular se ha observado en humanos y en modelos animales de hipertensión (Agabiti-Rosei *et al.*, 2009).

1.3 Control cardiovascular

En los humanos y en otros mamíferos han evolucionado múltiples mecanismos reguladores cardiovasculares. Estos incrementan el suministro sanguíneo a los tejidos activos, así como incrementan o disminuyen la pérdida de calor corporal mediante la redistribución de sangre. Asimismo, conservan el suministro sanguíneo al corazón y cerebro frente a retos, como en una hemorragia. Así, cuando el problema que se enfrenta es grave, el suministro hacia estos órganos vitales se conserva a expensas de la circulación del resto del cuerpo. Los ajustes circulatorios se realizan mediante modificaciones en el gasto cardiaco, cambiando el diámetro de los vasos de resistencia (principalmente arteriolas) o la cantidad de sangre almacenada en los vasos de capacitancia (las venas). El calibre de las arteriolas se ajusta, en parte, por autorregulación de su propio suministro sanguíneo. También se incrementa por los metabolitos vasodilatadores producidos localmente, lo afectan las sustancias que secreta el endotelio y se regula sistémicamente por sustancias vasoactivas circulantes, así como por la inervación de las arteriolas que regulan el flujo sistémico. El calibre de los vasos de capacitancia también se modifica por acción de sustancias vasoactivas circulantes y por nervios vasomotores. Los mecanismos reguladores sistémicos actúan de

forma conjunta con mecanismos locales y ajustan las respuestas vasculares en todo el cuerpo (Ganong, 2002).

En condiciones normales, a nivel central, la presión arterial está regulada por una serie de mecanismos de retroalimentación. Los barorreceptores, que son receptores sensibles a fricción, localizados en las paredes del corazón y de los vasos, estos receptores transmiten información al sistema nervioso central. Cuando la presión arterial es baja, el sistema nervioso autónomo produce vasoconstricción directa y adaptaciones cardiacas, así como la secreción de diversos factores que reestablecen la homeostasis (Rubenstein, 1992).

1.4 Regulación humoral de la circulación sistémica

Una función muy importante en los animales superiores es el intercambio de sustancias nutritivas y productos de desecho producidos por el metabolismo de las diferentes células que lo constituyen, a través del sistema circulatorio que ha evolucionado hasta optimizar sus funciones de recambio. Para ser eficiente en ésta y otras funciones como la regulación térmica, la vigilancia inmunológica y el transporte hormonal, el sistema circulatorio controla variables biológicas para mantener el flujo sanguíneo adecuado en los diversos lechos vasculares (Godínez Hernández, 2002). Por lo tanto, la regulación humoral se refiere a la regulación por sustancias secretadas o absorbidas en los líquidos corporales, como hormonas o iones. Algunas de estas sustancias se forman por glándulas especiales y después son transportadas por la sangre a todo el cuerpo. Otras son formadas en zonas locales de tejido y causan sólo efectos circulatorios locales.

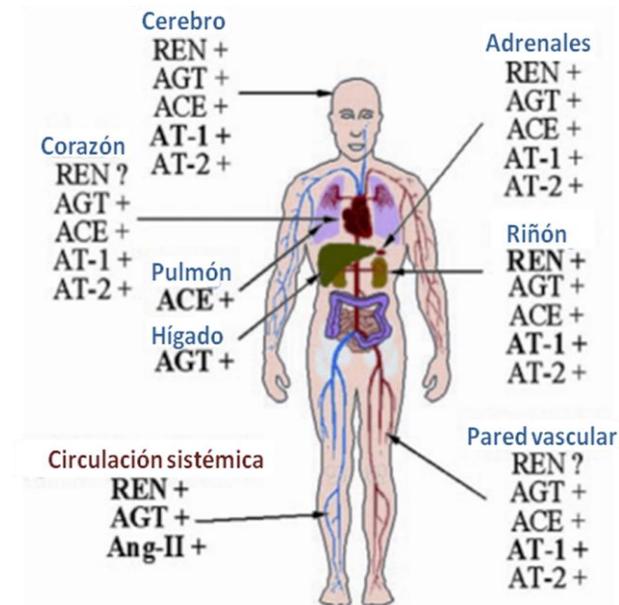
La regulación de la función y estructura vascular, así como el mantenimiento de la integridad vascular, es muy compleja e incluye factores físicos (estrés por rozamiento, presión y flujo), factores mecánicos (distensión, elasticidad y rigidez), y agentes vasoactivos (vasoconstrictores, vasodilatadores y factores de crecimiento).

Numerosos agentes vasoactivos tienen una importante función fisiológica en la regulación del tono, reactividad y estructura vascular. Entre los muchos agentes vasoactivos implicados en la biología vascular, la Ang II, ET (Xi *et al.*), adrenalina y noradrenalina (NA), serotonina (5HT) y péptidos natriuréticos parecen ser de particular importancia debido a sus acciones pleiotrópicas, y por ello son blancos terapéuticos en enfermedades cardiovasculares. Estos agentes vasoactivos median sus efectos al activar receptores específicos, miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Así, la ET-1 se une a receptores ET_A, la serotonina a 5HT₂, la adrenalina y noradrenalina a α_1 -AR y la Ang II a AT₁, y son los principales vasoconstrictores con acciones que promueven crecimiento celular e inflamación. Sin embargo, la activación de otros receptores puede contrarrestar estas acciones, produciendo vasodilatación e inhibición de crecimiento celular. Por su parte, los péptidos natriuréticos son vasodilatadores endógenos con potentes propiedades natriuréticas. En condiciones fisiológicas, los agentes vasoactivos operan de manera integradora, manteniendo la homeostasis vascular; mientras que en situaciones patológicas, la desregulación del control vasoactivo conduce a disfunción endotelial, hiperreactividad vascular, remodelación vascular e inflamación, procesos importantes que subyacen al daño vascular en enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, daño vascular en la hipertensión, aterosclerosis, diabetes mellitus, y falla cardíaca) (Callera *et al.*, 2007). Sin embargo, estos no son los únicos factores que afectan a la función circulatoria, ya que se conocen otros agentes vasoconstrictores (prostaglandinas contráctiles y vasopresina) y otros agentes vasodilatadores (óxido nítrico, bradicinina, histamina y prostaciclina).

1.5 Descripción actual del Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

1.5.1 Producción de Angiotensina II

De manera tradicional, el octapéptido multifuncional Ang II es formado por hidrólisis enzimática del angiotensinógeno, liberado por el hígado y transformado a Ang I, por la renina, una aspartil proteasa proveniente de las células yuxtaglomerulares del riñón. La conversión de Ang I en Ang II, ocurre por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una dipeptidil carboxipeptidasa, que es liberada por los pulmones a la circulación (Esquema 2) (Touyz & Schiffrin, 2000; Dinh *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2008). Recientemente se ha reevaluado al SRA de origen endocrino; así, se identificaron las enzimas que producen Ang II activa, y hay evidencias experimentales que ubican a todos los componentes del SRA (angiotensinógeno, renina y ECA), en tejidos y órganos, indicando la existencia de SRA tisular o local, como en la vasculatura, corazón, riñón y cerebro (Esquema 1) (Danser, 1996; Touyz & Schiffrin, 2000; Dinh *et al.*, 2001). En otras palabras, estos órganos operan de manera independiente del SRA circulante, como en las glándulas adrenales y cerebro; sin embargo, los SRA locales del corazón y riñón interactúan con el SRA circulante (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).



Esquema 1. Sistemas Renina Angiotensina locales

Por otro lado, esa no es la única vía de síntesis de Ang II, pues existen vías alternas que son importantes en algunos tejidos o durante estados patológicos, por ejemplo las quimasas, la catepsina G, la quimostatina sensible a la generación de Ang II (*chymostatin-sensitive Ang II-generating enzyme, CAGE*), activador de plasminógeno tisular y tonina, así como otras carboxipeptidasas (Esquema 2) (Touyz & Schiffrin, 2000; Dinh *et al.*, 2001). Por ejemplo, aun cuando la ECA es la principal enzima que genera Ang II, en el corazón la mayor cantidad de Ang I es convertida a Ang II por las quimasas (Wolny A., *et al.*, 1997; Touyz & Schiffrin, 2000). La quimasa se almacena en complejos macromoleculares con heparina en gránulos secretores de mastocitos. Para activarse, el complejo quimasa debe de ser liberado de los mastocitos; por ejemplo, durante el daño vascular producido por ballooning u otros agentes. Por lo tanto, las quimasas son inactivas en tejido vascular normal y pueden producir Ang II solo en paredes que presentan daño o en paredes arteriales ateroscleróticas (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

1.5.2 Quimasas

Son proteasas de serina localizadas en corazón humano, y generan Ang II a partir de Ang I, estas enzimas no se afectan por IECA y es una vía alterna para la

generación de Ang II. Algunos estudios en homogenados de corazón muestran que > 80% de la Ang II es producida por la quimasa, mientras que \approx 11% proviene de la ECA, sugiriendo la importancia de la quimasa en corazón humano (Urata *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1997); aunque la importancia funcional de esta vía en corazón aún es cuestionable debido a diversos factores: 1) en la clínica, los IECAs son muy eficientes en el tratamiento de enfermedades cardiacas, 2) en condiciones experimentales, la mayoría de Ang II generada en vasos sanguíneos cardiacos es bloqueada por IECAs, y 3) la expresión de quimasa en el corazón humano es muy compartimentalizada y en su mayoría restringida a los mastocitos (Urata *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2006).

Sin embargo, la vía de Ang II en corazón, independiente de ECA, puede ser muy importante en patologías como hipertrofia y falla cardiaca (Paul *et al.*, 2006). En este sentido, la quimasa también se expresa en la pared vascular, donde se ha sugerido una función importante en la arteriosclerosis mediada por Ang II (Arakawa & Urata, 2000).

1.5.3 Angiotensina III (heptapéptido Angiotensina 2-8)

La Ang III se describió desde los 1970s y causa vasoconstricción y liberación de aldosterona. Es generada a partir de Ang II por acción de la aminopeptidasa A (Esquemas 2 y 3). Ang III ejerce sus acciones, de manera similar a Ang II, a través de receptores AT₁ y AT₂; mientras que Ang II es considerada como el principal efector del sistema, Ang III puede ser igual de importante en algunas acciones al activar receptores AT₁, como en la liberación de vasopresina (Zini *et al.*, 1996).

Recientemente se reportó, que la infusión sistémica de Ang II o Ang III en perros conscientes es equipotente sobre la presión arterial, en la secreción de aldosterona, en la excreción de sodio y en la actividad de la renina plasmática, cuando ambos péptidos tienen la misma concentración plasmática. Sin embargo,

la velocidad de aclaramiento de Ang III es cinco veces mayor que la de Ang II (Gammelgaard *et al.*, 2006).

1.5.4 Angiotensina IV (hexapéptido Angiotensina 3-8)

La Ang IV puede ser generada por hidrólisis enzimática de Ang III, vía la aminopeptidasa M (Esquema 2). Este péptido es biológicamente activo y actúa sobre el receptor de aminopeptidasas regulado por insulina, IRAP (*insulin-regulated amino peptidase receptor*), que tiene un sitio de unión, también llamado receptor AT₄. Algunas de las acciones de Ang IV, por activación de IRAP, son vasodilatación renal, hipertrofia y activación del factor NFκB que incrementa la expresión del inhibidor del activador de plaquetas-I (PAI-I, *platelet activator inhibitor-I*), de la proteína quimioattractora de monocitos (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral-α (TNFα, *Tumoral necrosis factor-α*). Varios estudios sugieren que Ang IV tiene importantes funciones reguladoras en cognición, metabolismo renal y daño cardiovascular (Savoia & Schiffrin, 2006; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007). La Ang IV regula el crecimiento celular en fibroblastos cardíacos, células endoteliales y células de músculo liso vascular. Parece que Ang IV está relacionada con la respuesta vascular inflamatoria y podría tener un papel importante en la fisiopatología cardiovascular (Esquema 3) (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

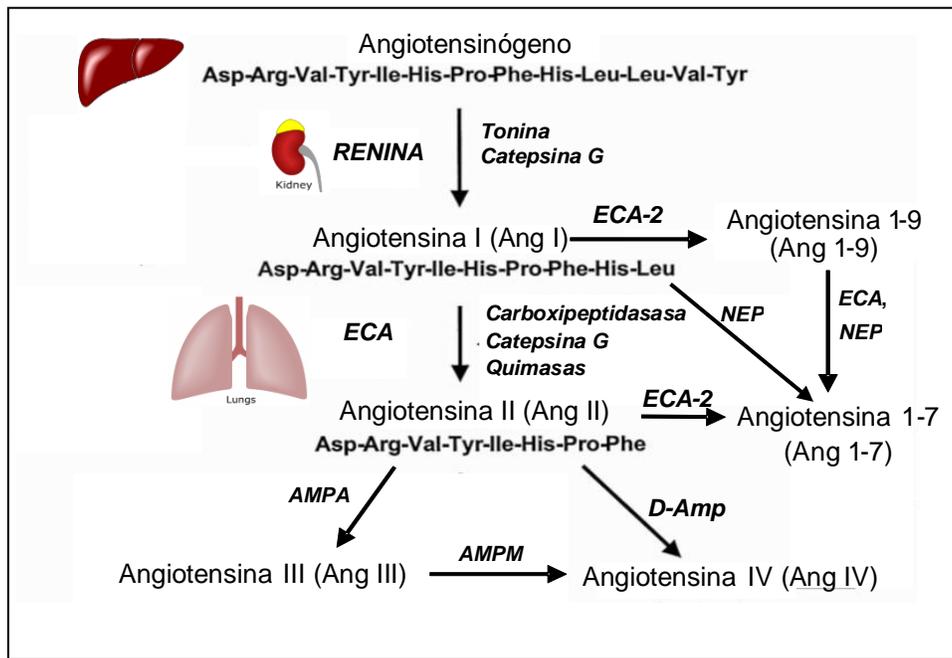
1.5.5 Angiotensina 1-7 (heptapéptido)

El heptapéptido Ang 1-7 parecía carecer de actividad biológica, hasta que se descubrió la ECA2, con lo cual resurgió el interés sobre el péptido. La ECA2 genera Ang 1-7 a partir de Ang II, aunque otras peptidasas también pueden producirlo a partir de Ang I o Ang II (Esquema 2). En 1988, el grupo de Ferrario describió que Ang 1-7 libera vasopresina de manera tan efectiva como Ang II, en explantes neurohipofisarios. Por otro lado, Ang 1-7 produce acciones opuestas a las de Ang II, como efectos vasodilatadores y antitróficos, y amplificación de la

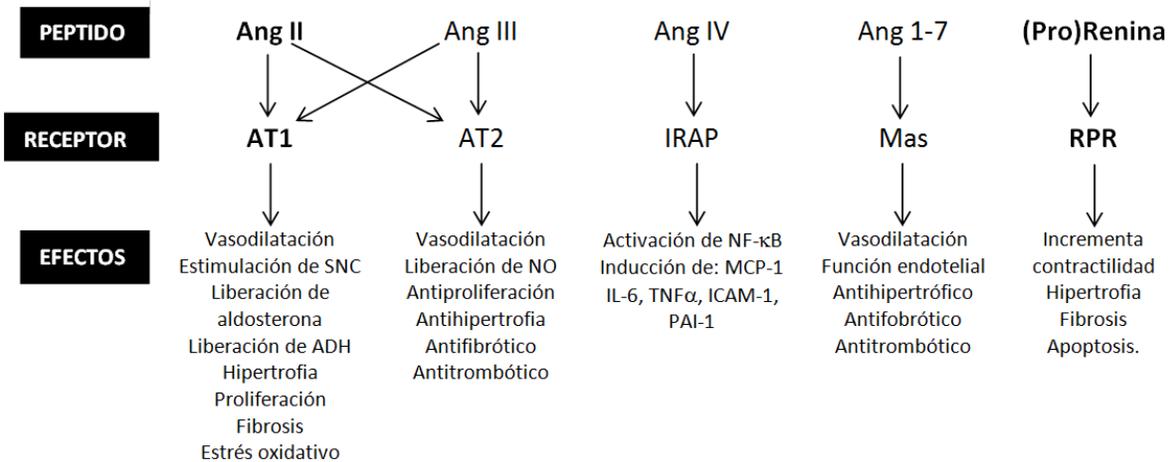
vasodilatación producida por bradicinina (Ferrario, 2006; Santos *et al.*, 2006). Numerosos experimentos sugieren una importante interacción entre Ang 1-7 y el sistema prostaglandina-bradicinina-NO; así, la Ang 1-7 parece contrarrestar varias acciones de Ang II. Los efectos de Ang 1-7 ocurren por activación del receptor mas, que media vasodilatación y antiproliferación (Esquema 3) (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

1.5.6 Enzima convertidora de Angiotensina 2 (ECA2)

La ECA2 fue descubierta y clonada recientemente (Donoghue *et al.*, 2000), tiene > 40% de similitud con el dominio catalítico de ECA y se expresa de manera abundante en el endotelio vascular de riñón, corazón, hipotálamo y pared aórtica. Sin embargo, comparando la distribución ubicua de ECA, el patrón de expresión de ECA2 es limitado, con expresión abundante en riñón > corazón > testículos. El sustrato específico de ECA2 hidroliza la Ang II con alta afinidad (es 400 veces más que por Ang I), y tiene mucho menos afinidad para Ang I (Gurley *et al.*, 2006). La ECA2 es también una carboxipeptidasa, y al igual que ECA, es una metaloproteasa de zinc que pesa alrededor de 120kD (Kramkowski *et al.*, 2006). La ECA2 hidroliza *in vitro* un aminoácido de Ang I o de Ang II, para generar Ang 1-9 y Ang 1-7, respectivamente (Vickers *et al.*, 2002); además, existen estudios que sugieren que ECA2 tiene una función importante en la degradación de Ang II y la regulación de la respuesta vascular a Ang II (Gurley *et al.*, 2006). La ECA2 está presente en macrófagos, células endoteliales, en células de músculo liso, es abundante en endotelio vascular de riñón, corazón, testículos, hipotálamo y pared aórtica (Santos & Ferreira, 2007). La regulación de la expresión de ECA2 no ha sido totalmente clarificada; sin embargo, ni los IECAs ni los antagonistas AT₁ inhiben la actividad de ECA2, aunque estos 2 tipos de fármacos parecen aumentar la expresión de ECA2 en corteza renal y miocardio de rata (Ferrario, 2006; Wang *et al.*, 2008). Asimismo, se ha observado un incremento en la expresión de ECA2 en corazón post infarto (Burrell *et al.*, 2005).



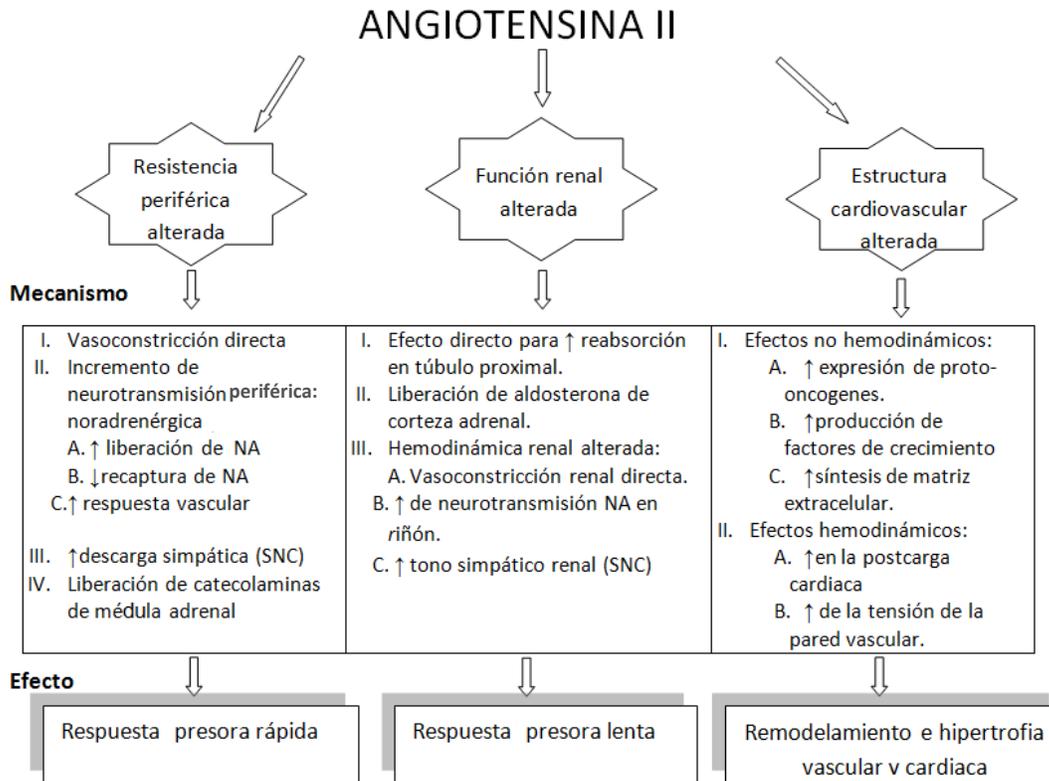
Esquema 2. Esquema del Sistema Renina Angiotensina (Modificado de Nguyem y Fyhrquist). *Abreviaciones:* ECA enzima convertidora de angiotensina, AMP aminopeptidasa, D-Amp dipeptidil-aminopeptidasa, NEP endopeptidasa neutra



Esquema 3. Efectos de los péptidos de angiotensina y renina/prorenina mediados por sus correspondientes receptores.

1.6 Efectos fisiológicos y patológicos de Ang II en el control del sistema cardiovascular

Entre los principales mecanismos que regulan la presión arterial sistémica y los procesos fisiológicos del sistema cardiovascular, el SRA tiene una función crucial, siendo la Ang II el principal efector de las respuestas cardiovasculares, a través de la estimulación de receptores AT₁ (Nguyen *et al.*). La Ang II regula procesos con diferente temporalidad es decir, media eventos inmediatos, tempranos y tardíos. Además, sus efectos son directos o indirectos por ejemplo, incrementa la contracción cardíaca (por apertura de canales de Ca⁺² dependientes de voltaje en miocitos cardíacos), y la frecuencia cardíaca (facilita el tono simpático, incrementando la neurotransmisión adrenérgica y facilita la liberación de catecolaminas); por lo que, el rápido incremento en la presión arterial activa el reflejo barorreceptor que disminuye el tono simpático e incrementa el tono vagal. Así, dependiendo del estado fisiológico, la Ang II incrementa, disminuye o no cambia la contractilidad cardíaca. Además, la Ang II es un potente agente vasoconstrictor, y en el riñón altera la reabsorción de sodio y agua, al estimular la zona glomerulosa de células de la corteza suprarrenal para sintetizar y secretar aldosterona. Por otro lado, la Ang II aumenta la sensación de sed y estimula la secreción de la hormona antidiurética. En consecuencia, la Ang II es fundamental en la regulación aguda y crónica de la presión arterial sistémica, por regulación endocrina (Weir & Dzau, 1999). En resumen, los efectos de Ang II en la resistencia periférica, la función renal y la estructura cardiovascular ocurren por mecanismos directos e indirectos (Esquema 4).



Esquema. 4 Resumen de los 3 principales efectos de Ang II y el mecanismo que media en ellos (Goodman & Gilman 11ª ed.)

Además de los efectos sobre la presión arterial, la estimulación aguda con Ang II regula la homeostasis de sal y agua y la vasoconstricción, modula la presión arterial mientras que la estimulación crónica promueve hiperplasia e hipertrofia de células de músculo liso vascular (VSMCs) y cardíaco, así como incremento en la síntesis y deposición de colágena por fibroblastos cardíacos favoreciendo el proceso de hipertrofia (Geisterfer *et al.*, 1988; Xi *et al.*, 1999). En este sentido, la administración crónica de Ang II promueve cambios significativos en la estructura vascular (remodelación hipertrófica), independiente de la presión, en las pequeñas arterias (Griffin *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1998), mientras que en arterias grandes, la Ang II exógena induce hipertrofia seguida de aumento en la síntesis de DNA (Daigle *et al.*, 2004).

Por otro lado, la exposición prolongada a Ang II produce remodelación e hipertrofia cardíaca, restenosis con stent, fibrinólisis reducida y fibrosis renal (Mehta &

Griendling, 2007). Tomando en cuenta los efectos pleiotrópicos de Ang II, se hace imprescindible comprender las características de los receptores para Ang II e investigar sus mecanismos de transducción. Así como es importante estudiar las diversas funciones de la Ang II, también lo es estudiar los efectos benéficos de los IECAs y de los antagonistas de receptores (Igarashi *et al.*), en la reducción de morbi y mortalidad en diabetes, hipertensión, aterosclerosis, falla cardiaca e infarto (Schiffrin *et al.*, 2000; Henriksen *et al.*, 2001; Igarashi *et al.*, 2001)

1.7 Receptores a Angiotensina. Funciones clásicas y novedosas de los receptores AT₁ y AT₂

De manera tradicional las acciones de Ang II han sido atribuidas principalmente a 2 receptores acoplados a proteínas G, denominados AT₁ y AT₂, los cuales tienen un complejo patrón de regulación y función. En ratas y ratones se han clonado y caracterizado 2 receptores AT₁ que presentan 95% de homología, AT_{1A} y AT_{1B} (Inagami, 1995; Mehta & Griendling, 2007), los cuales son funcional y farmacológicamente indistinguibles; sin embargo, *in vivo* la isoforma AT_{1A} puede ser más importante que el AT_{1B} en regular la presión arterial (Chen *et al.*, 1997; Mehta & Griendling, 2007). Los receptores AT₁ y AT₂ tienen afinidad similar por Ang II, pero tienen estructura genómica y localización distinta, así como expresión tejido-específica. La mayoría de los efectos fisiológicos relacionados con la Ang II están mediados por el receptor AT₁, el cual se encuentra ampliamente distribuido en hígado, glándulas adrenales, cerebro, pulmones, riñones, corazón y vasculatura. Este receptor tiene 359 a.a., y un peso molecular ~ 40kDa. De manera similar a otros receptores (como los receptores adrenérgicos o los muscarínicos), el receptor AT₁ tiene la región carboxilo terminal citoplásmica con varios residuos de serina/treonina, susceptibles de ser fosforilados por cinasas GRKs. Esos residuos son de gran importancia, ya que al fosforilarse alteran la función del receptor y pueden explicar parcialmente algunos de los eventos

celulares que se desarrollan en algunas de las enfermedades cardiovasculares (Mehta & Griendling, 2007).

La Ang II a través de los receptores AT₁ median efectos como vasoconstricción, regulación de líquidos y sodio facilitando el balance hemodinámico produciendo sensación de sed al liberarse vasopresina y aldosterona, así como también participa de manera importante en la fibrosis, crecimiento y migración celular, remodelación cardiovascular, en la generación de especies reactivas de oxígeno relacionadas con inflamación, aterosclerosis y envejecimiento vascular. Mientras que los receptores AT₂ median eventos de vasodilatación a través de la liberación de NO, inhibición de crecimiento celular, ejerce eventos antiproliferativos, pro-apoptóticos en células de músculo liso vascular; dichos efectos se deben principalmente por antagonismo fisiológico de receptores AT₁. Otras evidencias apoyan el papel del receptor AT₂ en la regulación de crecimiento, diferenciación y regeneración de tejido neural (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008), en este sentido, se han encontrado estos receptores con regulación a la alta (upregulated) en áreas peri-isquémicas en el cerebro, protegiendo del daño por isquemia (Li *et al.*, 2005). Así también se reportado efectos dañinos atribuidos a la estimulación del receptor AT₂, como apoptosis, señalización del factor nuclear NF-κB e inducción de quimosinas (Carey, 2005).

De manera similar al receptor AT₁, el receptor AT₂ es una proteína de 7 dominios transmembranales que está contituido por 363 amino ácidos y pesa 41kDa, comparte sólo el 34% de homología con AT₁ y se encuentra expresado de manera abundante en tejido fetal por ello, se le ha relacionado con el desarrollo; sin embargo su expresión declina después del nacimiento, sugiriendo que tiene un papel importante en el desarrollo fetal, sin embargo puede ser inducido después en la vida adulta en algunas condiciones patológicas. Sin embargo de manera normal se encuentran en bajas concentraciones en riñón, pulmón, e hígado aunque se desconoce su papel funcional en estos órganos (Mehta & Griendling, 2007). Diversos estudios han demostrado que el receptor AT₂ puede antagonizar las acciones de AT₁. Sin embargo, otros autores han sugerido que los receptores AT₂

pueden estar involucrados en la hipertrófia en miocitos cardiacos independiente de Ang II (D'Amore *et al.*, 2005). Esta respuesta hipertrófica es mediada por unión directa de factor de transcripción PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger protein) a la porción terminal de el receptor AT₂, conduciendo a la translocación nuclear con un incremento en la transcripción de la subunidad p85 de PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) (Landon & Inagami, 2005). En contraste, y consistente con sus efectos de antagonista sobre los efectos producidos por el receptor AT₁, en un modelo de enfermedad vascular dependiente de inflamación, la delección del receptor AT₂ incrementó la formación de la capa neoíntima e inflamación (Bumpus *et al.*, 1991). Además, la heterodimerización de estos dos receptores también causa una interrupción en la señalización del receptor AT₁ (AbdAlla *et al.*, 2001), por lo que se ha sugerido que el receptor AT₂ media acciones protectoras es decir, que el receptor AT₁ puede mediar acciones nocivas cuando no es apropiadamente contrabalanceado. Sin embargo, la exacta función que juega el receptor AT₂ durante estados patológicos no es clara.

Recientemente se han descrito nuevas acciones mediadas por el receptor AT₁; por ejemplo, la infusión continua de Ang II en ratas disminuye la adiponectina plasmática, un sensibilizador de insulina (Ran *et al.*, 2006). La supresión de adiponectina representa un mecanismo por el que Ang II altere la tolerancia a la glucosa. Otras acciones metabólicas de Ang II incluyen modulación pro-inflamatoria (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006) , secreción de insulina (Ramracheya *et al.*, 2006), apoptosis de células β (Chu *et al.*, 2006), regulación de gluconeogénesis, producción de glucosa hepática (Assimacopoulos-Jeannet *et al.*, 1982) e incremento de triglicéridos plasmáticos (Ran *et al.*, 2004; Ran *et al.*, 2006; Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Por otro lado, de manera reciente, se reportó en un modelo en riñón de rata que la Ang III y no la Ang II produjo natriuresis a través de los receptores AT₂ (Padia *et al.*, 2006), y que este efecto natriurético aumenta por inhibición de la aminopeptidasa N, enzima que metaboliza Ang III a Ang IV (Padia *et al.*, 2007).

En la última década se han propuesto dos novedosos mecanismos de regulación para el receptor AT₁: 1) El receptor AT₂ puede unirse directamente al receptor AT₁ para antagonizarlo inhibiendo su señalización a través de la activación de fosfatasa de tirosina o serina/treonina, además, esta heterodimerización inhibe la señalización de AT₁ y es independiente de la activación de AT₂ (AbdAlla *et al.*, 2001). 2) La activación del receptor AT₁ puede ocurrir por autoanticuerpos, fenómeno observado en mujeres que padecen preeclampsia; estos autoanticuerpos estimuladores están dirigidos contra la segunda asa intracelular del receptor AT₁ e inducen efectos mediados por PKC en VSMCs (Wallukat *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2006). Es importante mencionar, que estos dos mecanismos no han sido confirmados por otros autores, sin embargo abren nuevas áreas para investigaciones futuras respecto a la activación o inhibición del receptor AT₁.

Por otro lado, recientemente se ha propuesto la existencia de un receptor para Ang IV (Ang 3-8) denominado AT₄ o IRAP, localizado en corazón, músculo liso vascular, riñones, colon, glándulas adrenales, próstata y regiones cerebrales relacionadas con funciones motoras y sensoriales y se ha asociado con procesos inflamatorios y en la génesis de la aterosclerosis (Paul *et al.*, 2006).

Finalmente, el protooncogen Mas está caracterizado como un receptor acoplado a proteínas G, y se relaciona con tumorigenesis. Actualmente se visualiza al receptor Mas como un receptor funcional de SRA, con alta afinidad por Ang 1-7. Además, forma heterodímeros con AT₁ y lo inhibe (Kostenis *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2006).

1.8 Inflamación y Angiotensina II

Durante la hipertensión arterial se ha demostrado la activación de mediadores de la inflamación en vasos sanguíneos, corazón y riñones en modelos de hipertensión que dependen de Ang II, en ratas infundidas con Ang II, en ratas transgénicas que expresan angiotensinógeno humano/renina humana, o en hipertensión inducida pro mineralocorticoides.

La Ang II y la ET-1 disparan el proceso inflamatorio que participa en la hipertensión. Así, la deficiencia en macrófagos (ratón “knockout”) abolió la hipertensión por Ang II y ET-1, el estrés oxidativo, la remodelación vascular y la disfunción endotelial (De Ciuceis *et al.*, 2005; Ko *et al.*, 2007; Schiffrin, 2008).

La Ang II ejerce sus efectos proinflamatorios por estimular cascadas de señalización sensibles a REDOX, activando MAPK, específicamente p38 MAPK. El estrés oxidativo estimula mediadores de la inflamación, como NF κ B y AP-1, que disparan la síntesis de quimosinas y MCP-1 (monocyte chemoattractant peptide-1), para reclutar macrófagos, y activación de agentes proinflamatorios y protrombóticos, como PAI-1 y moléculas de adhesión; así como VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) e ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Estas acciones inflamatorias pueden requerir la participación de linfocitos-T, mediadores importantes en la hipertensión inducida por Ang II. En este sentido, se sabe que en ratones carentes de células T y B (RAG-1^{-/-}) no hay hipertensión por infusión con Ang II, ni se desarrollan anomalías de la función vascular, cambios que aparecen al transferir células T, pero no células B (Guzik *et al.*, 2007). En otros modelos, utilizando ratones KO para el receptor AT₁ o en animales con actividad de la NADPH oxidasa disminuida, la hipertensión dependiente de Ang II es bloqueada y disminuye la generación de superóxido vascular. La Ang II incrementa los marcadores de células T de activación y estimula la infiltración de células T en la grasa periadventicia y adventicia en la aorta, acompañada con incremento de ICAM-1 y RANTES (Guzik *et al.*, 2007; Schiffrin, 2008).

1.9 Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos median respuestas celulares a las catecolaminas noradrenalina (NA) y adrenalina. Estas hormonas son secretadas por la glándula adrenal o son liberadas como neurotransmisores de neuronas adrenérgicas, dentro del sistema nervioso central y neuronas postganglionares simpáticas periféricas. Estas catecolaminas son liberadas durante estrés físico o emocional y

actúan sobre receptores adrenérgicos, produciendo efectos cardiovasculares y metabólicos en todos los órganos. Ambas catecolaminas regulan la función cardiovascular; por ejemplo, la activación de receptores adrenérgicos en el corazón, incrementa la frecuencia cardiaca y la fuerza de contracción; mientras que en músculo liso vascular contrae los vasos, incrementando la presión arterial (Izzo JL, 2008).

Los receptores de estas catecolaminas se clasifican en 3 familias: α_1 , α_2 y β -AR. Cada familia se subdivide en 3 receptores por ejemplo, los receptores α_1 se han clasificado en α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , su sistema de señalización incrementa el Ca^{+2} intracelular, ya que activan a la fosfolipasa C (PLC) vía una proteína $G_{q/11}$, generando inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 viaja hasta sus receptores en el retículo endoplásmico y libera Ca^{+2} , el cual actúa de manera sinérgica con DAG para activar a la PKC, la cual fosforila proteínas específicas. Por su parte, los α_2 se clasifican en α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} , esta familia de receptores disminuye el AMPc, al inhibir a la adenilil ciclasa vía una proteína G_i , y los receptores β_1 , β_2 , y β_3 estimulan la producción de AMPc al estimular a la adenilil ciclasa vía proteínas G_s . Desde el punto de vista estructural, los receptores adrenérgicos pertenecen a la gran familia de receptores de 7 dominios transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G heterotriméricas.

1.10 Receptores α_1 -adrenérgicos

Los α_1 -AR son de gran interés, debido a su importancia al regular las respuestas fisiológicas mediadas por catecolaminas en el sistema cardiovascular; además, han sido implicados en patologías, como hipertrofia y remodelación vascular y cardiaca o en las arritmias inducidas por isquemia (Garcia-Sainz *et al.*, 1999; Guimaraes & Moura, 2001; Chen & Minneman, 2005). Estudios en ratones KO de cada uno de los α_1 -AR han mostrado que los tres están relacionados con la regulación de la presión arterial. Además, se comprobó el papel dominante del

α_{1D} -AR en la contracción de la arteria aorta en ratones KO, datos consistentes con otros de caracterización farmacológica en órgano aislado (Tanoue *et al.*, 2002; Chen & Minneman, 2005).

Los estudios del grupo de Lefkowitz han mostrado que los GPCR interactúan con varias proteínas además de la proteína G, extendiendo la señalización y así, se establecen distintas funciones dependiendo del receptor estimulado (Hall *et al.*, 1999; Hall & Lefkowitz, 2002). Estas interacciones son con proteínas de membrana o citoplasmáticas que pueden regular la farmacología de los receptores y su señalización. Aunque los tres α_1 -AR se acoplan a la señalización por $G_{q/11}$, hay datos que indican que los tres activan señalización diferencial después de estimular a la proteína $G_{q/11}$ (Zhong & Minneman, 1999; Chen & Minneman, 2005)

Por otro lado, a pesar de ver a los GPCR como unidades monoméricas, las evidencias sugieren que estos receptores forman dímeros u oligómeros, asociaciones necesarias para farmacología, función y/o para su expresión en la membrana celular. Así, se ha descrito que los tres α_1 -AR forman homodímeros y heterodímeros con otros receptores adrenérgicos (Vicentic *et al.*, 2002; Carrillo *et al.*, 2003; Stanasila *et al.*, 2003; Uberti *et al.*, 2003). Estudios posteriores han mostrado que los α_1 -AR se asocian con receptores de otros sistemas, que pueden regular la función de los receptores involucrados, por ejemplo se reportó que los α_{1D} -AR forman heterodímeros con el receptor AT_1 durante el embarazo y que la disminución de esta asociación se puede relacionar con preeclampsia (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2010).

1.11 Receptores α_1 -adrenérgicos vasculares

Los estudios de unión con radioligandos, los análisis farmacológicos y el clonaje molecular han mostrado que la familia α_1 -AR está integrada por α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , los cuales tienen diferentes propiedades farmacológicas y secuencias de amino ácidos. Estos 3 receptores muestran alta afinidad a prazosina (antagonista α_1); sin

embargo, los estudios funcionales han evidenciado un 4^o receptor α_1 denominado α_{1L} con baja afinidad a prazosina ($pK_B < 9$) (Flavahan & Vanhoutte, 1986; Muramatsu *et al.*, 1990; Stam *et al.*, 1999). Este receptor parece ser una isoforma funcional del α_{1A} -AR (Kava *et al.*, 1998; Daniels *et al.*, 1999; Marti *et al.*, 2005).

En las arterias de las ratas se ha determinado el RNAm de los 3 α_1 -AR (Piascik *et al.*, 1994; Scofield *et al.*, 1995); sin embargo, al usar radioligandos o en estudios funcionales y con anticuerpos contra los α_1 -AR, se demostró que 1 o 2 de los α_1 -AR predominan para la contracción del músculo liso vascular (Piascik *et al.*, 1995; Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 2000; Salomonsson *et al.*, 2000).

Los α_{1D} -AR se localizan en las arterias aorta, carótida, mesentérica, iliaca, femoral y renal, donde median la contracción inducida por agentes adrenérgicos (Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Villalobos-Molina *et al.*, 1997; Gisbert *et al.*, 2000; Salomonsson *et al.*, 2000; Arevalo-Leon *et al.*, 2003), y su expresión funcional *in vivo* tiene una importante función en el control de la presión arterial (Zhou & Vargas, 1996; Ibarra *et al.*, 1997; Villalobos-Molina *et al.*, 1999). Además, en las arterias que expresan el α_{1D} -AR como predominante en la respuesta contráctil, existe una población de receptores constitutivamente activos es decir, los receptores no requieren noradrenalina para ser estimulados, este fenómeno no es observado en vasos sanguíneos que expresan al α_{1A} y α_{1B} , lo que sugiere que los α_{1D} -AR ejercen un papel modulador en las arterias de conductancia, evitando cambios súbitos en el diámetro arterial cuando se remueve el agonista, manteniendo el flujo sanguíneo (Gisbert *et al.*, 2000; Ziani *et al.*, 2002). Con esta idea, varias evidencias muestran que los α_{1D} -AR se relacionan con la génesis y/o el mantenimiento de la hipertensión, pues están presentes antes del establecimiento de la hipertensión, y se ha sugerido un incremento en la población constitutivamente activa de estos receptores, por esta razón se les ha relacionado con la patología y el aumento en el tono simpático en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Villalobos-Molina & Ibarra, 1996, 1999; Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Guimaraes & Moura, 2001; Gisbert *et al.*, 2002; Garcia-Sainz & Villalobos-

Molina, 2004). Datos igualmente interesantes, muestran que la estimulación de α_1 -AR por catecolaminas, están involucrados en la hipertrofia y proliferación de VSMCs y se le atribuye a los α_{1D} -AR una acción importante en la hipertrofia vascular (Chen *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 1997).

1.12 Comunicación entre el SRA y el sistema nervioso simpático

Estudios clínicos y experimentales ha mostrado la interacción entre el SRA y el sistema nervioso simpático, y se ha propuesto como un mecanismo de regulación fisiológica. Existen evidencias que sugieren que los dos sistemas tienen efectos uno sobre otro en la vasculatura periférica y en el sistema nervioso central (Saxena, 1992). La Ang II produce vasoconstricción vía el receptor AT_1 en músculo liso vascular, y por modular la función simpática (Zimmerman, 1981). Desde hace tiempo se sabe que Ang II facilita la neurotransmisión de terminales nerviosas presinápticas (Boadle *et al.*, 1969; Majewski *et al.*, 1984), y se ha reportado que incrementa la frecuencia y la contractilidad cardiacas, al aumentar el tono simpático, es decir, a nivel presináptico facilita la liberación de noradrenalina (Weir & Dzau, 1999). Por otro lado, en la vasculatura se ha mostrado la relación entre SRA y las vías adrenérgicas periféricas, así como su participación en la génesis de la hipertensión; por ejemplo, en ratas SHR aumenta la cantidad de α_1 -AR y receptores AT_1 en la vasculatura en etapas prehipertensivas (Schiffrin *et al.*, 1984). En estudios *in vivo*, la infusión continua de Ang II (35ng/100g/min) durante 2 semanas aumentó la presión arterial y un marcado incremento en la síntesis de DNA en VSMCs, determinada por incorporación de timidina radiactiva; de manera muy interesante, observaron que el efecto depende de estimular los α_1 -AR, ya que la prazosina bloqueó la mitogénesis inducida por Ang II (van Kleef *et al.*, 1992). También, se ha reportado que al estimular VSMCs con Ang II incrementa el contenido de proteína y la síntesis de *novo* de α_{1D} -AR (Hu *et al.*, 1995), sugiriendo que estos dos sistemas se comunican entre si (“cross talk”), y que estos eventos se asocia con crecimiento y

proliferación celular que favorecen la génesis de la hipertensión. Sin embargo, no solo Ang II está relacionada con procesos proliferativos, pues existen evidencias que sugieren que el sistema nervioso simpático, a través de los α_{1D} -AR ejercen efectos tróficos sobre VSMCs y que podrían contribuir en la patogénesis de la hipertrofia vascular (Chen *et al.*, 1995; Xin *et al.*, 1997).

Recientemente, en nuestro laboratorio se mostró que dosis bajas de captopril, (iECA, 3mg/kg/día por 7 días), en ratas SHR de 4 semanas de edad, disminuyeron la respuesta funcional, y la expresión del RNAm y la proteína α_{1D} -AR en aorta de ratas SHR. Estos datos sugieren que la ausencia de Ang II disminuye la expresión de los α_{1D} -AR en la aorta de ratas SHR conduciendo a la disminución en la reactividad vascular (Godinez-Hernandez *et al.*, 2006).

Otro estudio que muestra la importancia de la interacción entre el SRA y el sistema nervioso simpático en funciones cardiovasculares, se desarrolló con ratones KO para el receptor AhR, que media toxicidad a agentes ambientales, y que cursan con hipertensión e hipertrofia cardíaca debida, en parte, por tener alta concentración circulante de ET y Ang II (Lund *et al.*, 2003); además, la aorta del ratón KO es hipersensible a agonistas adrenérgicos y se observó el incremento en la expresión de α_{1D} -AR, como RNAm y proteína (Villalobos-Molina *et al.*, 2008). Observamos que el captopril revirtió la hipersensibilidad y disminuyó la expresión del α_{1D} -AR (Villalobos-Molina *et al.*, 2008). Todas estas evidencias sugieren que Ang II y el receptor α_{1D} -adrenérgico podrían estar implicados de manera conjunta durante la hipertensión, ya que niveles elevados de Ang II parecen facilitar este padecimiento a través de la expresión de receptores α_{1D} -AR vasculares, los cuales pueden estar mediando hipertrofia e hipersensibilidad en la vasculatura (Villalobos-Molina & Ibarra, 2005).

2. Justificación

La hipertensión arterial es una enfermedad que constituye un grave problema de salud pública y es una de las mayores preocupaciones de los sistemas de salud en prácticamente todos los países del mundo. Las cifras relativas del número de hipertensos en el mundo varía de acuerdo al país en donde se haya realizado la encuesta; sin embargo, los resultados de las encuestas indican que la prevalencia de la hipertensión arterial oscila entre el 10 y el 20 % de la población total. Por otra parte, cuando la hipertensión arterial no es controlada adecuadamente suele terminar en una serie de complicaciones como insuficiencia cardiaca congestiva, cardiopatía isquémica, arritmias cardiacas, insuficiencia renal y accidentes vasculares periféricos, complicaciones que ponen en riesgo la vida del individuo. Un aspecto particularmente interesante es que de los muchos agentes vasoconstrictores que han sido implicados en la hipertensión, la Angiotensina-II (Ang II) y las catecolaminas parecen ser de los mediadores químicos más importantes. En este sentido, en la literatura se ha descrito que la Ang II estimula diversos factores que influyen directamente en el crecimiento de cardiomiocitos y células de músculo liso vascular y que estos tipos celulares son de gran importancia para el desarrollo de enfermedades complejas como la hipertrofia cardiaca, enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis e hipertensión. Así mismo, en el sistema cardiovascular los receptores adrenérgicos α_1 regulan la contracción y crecimiento del músculo cardiaco y músculo liso arterial, por lo que también han sido implicados en procesos patológicos como hipertrofia o arritmias cardiacas inducidas por isquemia.

Además, desde hace algunos años se ha descrito la importancia fisiológica de la interacción entre la Ang II y receptores adrenérgicos así, el sistema renina angiotensina (SRA) y el sistema nervioso simpático (SNS) interactúan a varios niveles tanto en la homeostasis como en la fisiopatología cardiovascular. Ang II ejerce efectos facilitadores a nivel pre y post-sináptico sobre terminales vasoconstrictoras noradrenérgicas, y ha demostrado en experimentos *in vitro* que regula la transcripción genómica de receptores adrenérgicos α_1 vasculares. Por

otro lado, los receptores AT_1 y α_1 son receptores heptahelicoidales que están acoplados a proteína G y comparten el mismo sistema de transducción de señales involucrando al fosfatidilinositol trifosfato (IP_3) y aumento de calcio (Ca^{+2}) intracelular, incrementando con ello la probabilidad de comunicación cruzada (cross talk) entre estos receptores. A pesar de la gran cantidad de información generada en este campo, no se conoce el mecanismo directo de activación de receptores de Ang II sobre la expresión de receptores α_1 adrenérgicos tanto en animales íntegros como en células aisladas de músculo liso vascular, particularmente de receptores α_{1D} -adrenérgicos, ya que estos receptores han sido involucrados tanto en la génesis como en el mantenimiento de la hipertensión.

3. Hipótesis

La angiotensina-II favorece la expresión de los receptores α_{1D} -adrenérgicos en el músculo liso vascular. Por lo tanto, la Ang II aumentará la respuesta adrenérgica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la influencia de la Ang II sobre los receptores α_1 -adrenérgicos en músculo liso vascular de rata.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la respuesta contráctil, por estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas con y sin infusión con Ang II.
2. Determinar el efecto hipertrófico de la Ang II en las arterias aorta y caudal de ratas con y sin tratamiento antihipertensivo (losartán o BMY 7378).
3. Determinar el efecto de Ang II, sobre la expresión de RNAm y proteína de los receptores α_1 -adrenérgicos en aorta de rata Wistar.
4. Determinar los niveles plasmáticos de Ang II y sus metabolitos Ang III, Ang IV y Ang 1-7.
5. Determinar el efecto de la Ang II en cultivos primarios de células de músculo liso vascular aisladas de aortas de ratas Wistar sobre la expresión de RNAm y proteína de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.

5. Materiales y métodos

Protocolo experimental

5.1 Animales

Se emplearon ratas Wistar macho (3 meses de edad), se mantuvieron con temperatura controlada (22 ± 2 °C) y 40-60% de humedad, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y con acceso libre de agua y alimento. El almacenamiento, cuidado y procedimientos experimentales de los animales se realizaron evitando al máximo el sufrimiento innecesario, siguiendo las directrices aprobadas por el Comité Institucional de Bioética de nuestra institución para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México). El número de animales por grupo (n) fue de 6-8 ratas para experimentos *in vitro*, de 4-6 ratas para los experimentos de biología molecular y de 3-4 ratas para los cultivos primarios de células de músculo liso vascular.

5.2 Infusión continua de Ang II

Las ratas se entrenaron para la medición de la presión arterial en la cola, por pletismografía, un método no invasivo, con un sistema digital Letica (PanLab, España). Una vez registrada la presión arterial basal, a un grupo de animales se les implantó una bomba osmótica Alzet (Alza Co., EUA) por vía subcutánea, que contenía a la Ang II para ser liberada de manera continua a una dosis de 200 ng/kg/hora/14 días; se midió la presión arterial cada tercer día. Al final del tratamiento los animales se sacrificaron para experimentos de órgano aislado y/o su preparación para histología.

5.3 Tratamiento con BMY 7378 o losartán en animales con y sin bomba de Ang II. Registro de la presión arterial

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

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

- A) Ratas Controles
- B) Ratas Ang II
- C) Ratas Ang II + BMY7378
- D) Ratas Ang II + Losartán

En el caso de los estudios moleculares, se llevó a cabo un protocolo similar utilizando ratas Wistar macho de 3 meses de edad, en las que se implantaron bombas osmóticas para la infusión de Ang II (200ng/kg/día) a diferentes tiempos para realizar un curso temporal de la expresión de receptores α_1 -adrenérgicos a nivel de RNAm y proteína. Los animales se dividieron en grupos de acuerdo al tiempo de infusión:

- A) Ratas Controles
- B) Ratas con Angiotensina II por 1 día
- C) Ratas con Angiotensina II por 3 días
- D) Ratas con Angiotensina II por 7 días
- E) Ratas con Angiotensina II por 15 días.

5.4 Registro de la presión arterial sistólica en animales conscientes.

A las ratas se les midió la presión arterial sistólica por pletismografía (LE 5007, Letica, Panlab, España). Esta evaluación se realizó registrando el pulso sistólico de la presión en la arteria caudal de las ratas. La toma de presión se llevó a cabo en un cuarto cerrado, libre de ruidos que puedan perturbar la tranquilidad de los animales y a temperatura ambiente. Con el propósito de dilatar la arteria caudal y permitir un mejor flujo sanguíneo, las ratas se colocaron dentro de jaulas inmovilizadoras y sobre una placa provista de un sistema de calefacción que mantuvo la temperatura entre 30° y 32°C.

El sistema de registro LE 5007 es un instrumento programable, basado en un microprocesador que controla el proceso mecánico-electrónico operativo de una medición de presión sanguínea, por un método no invasivo. El registro se basa en la técnica esfigmomanométrica (la empleada en la toma de tensión en humanos), así, el equipo tiene un manguillo de presión que ocluye el paso de sangre, y de un transductor que registra las pulsaciones cardiacas. Ambos instrumentos se colocan en la cola del animal para operar sobre la arteria caudal. El sistema LE 5007 registra los valores de presión sistólica o máxima, diastólica o mínima y frecuencia cardiaca. Para el almacenamiento de datos, el equipo se acopla a un sistema de adquisición de datos RSD232 y el software SEDACOM.

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

Los animales se sacrificaron en atmósfera con éter. Las arterias aorta y caudal se disecaron y limpiaron de tejido conectivo y graso, y se cortaron en anillos (4-5 mm de longitud), se removió el endotelio y se fijaron en ganchos de acero inoxidable al fondo de una cámara para órgano aislado y a un transductor de tensión isométrica, conectado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems, Inc., U.S.A.), en donde se registró la tensión desarrollada por los anillos. Las arterias se sumergieron en solución Krebs con la siguiente composición (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄·7H₂O, 1.2; CaCl₂·2H₂O, 2.5; NaHCO₃,

25.0; dextrosa, 11.7 y EDTA, 0.026 y a pH de 7.4, a temperatura de 37°C y burbujeadas continuamente con O₂/CO₂ (95:5). Los anillos arteriales se sometieron a una tensión inicial de 3 g (aorta) y 2 g (caudal), además se pre-estimularon 3 veces con fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) a concentración sub-máxima que produce 80% del E_{max}, para sensibilizar a los vasos. Se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina y a A61603 (agonista selectivo α_{1A} adrenérgico), en anillos de aorta torácica y caudal, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY-7378 (antagonista selectivo α_{1D}), RS100329 (antagonista selectivo α_{1A}), y en presencia de rauwolscina y propranolol (1×10^{-7} M, cada uno), para antagonizar a los adrenoceptores α_2 y β , respectivamente. Los valores de pA₂ y las pendientes se obtuvieron por análisis de Schild (Arunlakshana & Schild, 1959).

5.6 Estudio histológico de aorta

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

5.7 Aislamiento y cultivo de células de músculo liso vascular de rata

El cultivo de células de músculo liso vascular (CMLV) se hizo al aislar células de aorta torácica de ratas Wistar macho de 200-250 g. La aorta se limpió de tejido conectivo y graso y se cortó en 2 o 3 segmentos, los cuales se removió el endotelio de manera manual usando un estilete rugoso. Las aortas se incubaron con colagenasa II (2mg/ml) durante 15 min a 37°C para quitar la túnica adventicia

de manera mecánica, bajo un microscopio estereoscopio (Zeiss Stemi 2000-C). Finalmente, las células musculares se disgregaron por digestión enzimática con una mezcla de colagenasa II y elastasa (5mg/ml-0.1mg/ml). Las células se mantuvieron en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco, Life Technologies) y penicilina (100 U/ml) con estreptomina (100 U/ml) (Gibco, Life Technologies) a 37°C, bajo atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El medio se cambió cada tercer día hasta llegar a confluencia de 90 – 95% y se hicieron subcultivos (pases) con tripsina 0.05% y 0.02% EDTA. Los subcultivos se usaron en el pase número 6.

Las células se hicieron quiescentes con DMEM, libre de suero bovino fetal, por lo menos 12 hrs. Las células musculares quiescentes se incubaron con Ang II (100 mM) a diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24hr).

Se verificó el fenotipo celular de acuerdo a su morfología y por inmunofluorescencia, utilizando como marcador celular a la α -actina. Para ello se utilizaron cultivos al 70-80% de confluencia, las células se fijaron durante 1 hora en formaldehído al 3% en PBS (NaCl 0.14M, KCl 0.3mM, Na₂HPO₄ 0.01M, KH₂PO₄ 0.2mM a pH 7.4), y se neutralizó con NH₄Cl₂ por 10 minutos. Las células se permeabilizaron con tritón al 1% y se bloquearon con solución PBS-albúmina al 1%. Las células se incubaron con el anticuerpo contra α -actina (Zymed Laboratorios) durante 12 horas. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (FITC, Excitación 495 nm, Emisión 519 nm). Posteriormente, las células se incubaron con un tercer anticuerpo contra β -actina acoplado a rodamina (TRITC, Excitación 547 nm, Emisión 572 nm). Las preparaciones se montaron y fijaron con Entellan (Merck, Alemania) sobre portaobjetos y se mantuvieron protegidos de la luz hasta ser visualizadas en el microscopio confocal (Leica, Modelo DM IRB); las imágenes se capturaron y analizaron con ayuda del software Leica Confocal Software, Microsystems versión 2.5.

5.8 Efecto de Ang II sobre la expresión de RNAm de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular en cultivo y en aorta de ratas

El aislamiento del RNA se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA fue disuelto en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y la integridad de las muestras se determinó por electroforesis, sobre un gel desnaturalizante de agarosa y formaldehído; la concentración de RNA se determinó por espectrofotometría, a longitudes de onda de 260 y 280 nm, calculando el cociente 260/280 para verificar su pureza.

El RNA se trató con DNAsa libre de RNAsas para asegurar la ausencia de DNA genómico. Iguales cantidades de RNA de cada muestra (2 μ g de RNA) se sometieron a retrotranscripción para generar el DNA complementario (cDNA), empleando el kit SuperScript. First-Strand Synthesis System (Invitrogen) y oligo(dT)¹²⁻¹⁸ en una mezcla de dNTPs (10 mM), PCR buffer (10X), MgCl₂ (25mM), ditiotreitól (0.1M) y la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (200 unidades).

Una vez sintetizado el cDNA, se amplificó por PCR de punto final utilizando iniciadores específicos (“primers”) para medir la expresión de los mRNAs que codifican para los 3 receptores α_1 -adrenérgicos (Scofield *et al.*, 1995), y utilizando como control endógeno la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Chen *et al.*, 1998). Las secuencias de oligos para cada receptor son: GAPDH-sentido 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (bases sentido 562-581) y antisentido R:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (bases antisentido 1013-1032), α_{1A} - sentido, 5'- GTA GCC AAG AGA GAA AGC CG (bases sentido 628-647) y antisentido 5' CAA CCC ACC ACG ATG CCC AG (bases antisentido 820-839), para el receptor α_{1B} - sentido, 5'- GCT CCT TCT ACA TCC CGC TCG (bases sentido 629-649) y antisentido 5' AGG GGA GCC AAC ATA AGA TGA (bases antisentido 908-928), y para el receptor α_{1D} - sentido 5' CGT GTG CTC CTT CTA CCT ACC (bases sentido 759-779) y antisentido 5' GCA CAG GAC GAA GAC ACC CAC (bases antisentido 1042-1062). Los “primers” hibridaron con la

secuencia de nucleótidos que codifica para la región transmembranal 5 a la región transmembranal 6 de los receptores adrenérgicos α_1 (Scofield *et al.*, 1995). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con un kit para PCR (Invitrogen) y en un termociclador (Palm-Cycler, Corbett). La PCR consistió en 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, el alineamiento a 58°C (para la GAPDH y los receptores adrenérgicos α_{1B} y α_{1D}) y a 50°C (para el receptor adrenérgico α_{1A}) durante 1 minuto, y la amplificación a 72°C durante 1 minuto. Los productos de amplificación de la PCR (amplicones), se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se corrió una electroforesis durante 1 – 1.5h a 100V. Las bandas correspondientes a la GAPDH se localizaron en 452 pb, los receptores adrenérgicos α_{1A} en 212 pb, α_{1B} en 300pb y α_{1D} en 304pb y fueron visualizados directamente en el gel con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich Co. USA) y luz ultravioleta. Las bandas fueron digitalizadas para análisis densitométrico por lector de imágenes FLA-5000 (Fluoro Image Analyzer) y software Multi Gauge 3.0 software (Fujifilm).

5.9 Efecto de Ang II sobre la cantidad relativa de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular y aorta de rata

Para este estudio usamos Western Blot. De manera breve, se cargaron cantidades iguales de proteína en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE al 10%). Las proteínas se separan por peso molecular mediante electroforesis. Los geles se transfieren a una membrana de PVDF, con un sistema Semi-Dry Transfer Blot (Bio-Rad, CA, USA), se bloquean durante 1 hora con 5% de leche descremada disuelta en TBST, y se incuban con anticuerpos primarios policlonales de conejo para cada receptor adrenérgico, o anticuerpos policlonales anti β -actina (Santa Cruz), diluidos 1:3000 y 1:1000, respectivamente, en leche descremada a 4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, en una dilución 1:1000) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavan de manera exhaustiva. Las membranas se incubaron con reactivo quimioluminiscente (Luminol, Amersham Biosciences) para la emisión

de luz, la que se detectó en película fotográfica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, UK), y se analizan por densitometría con el lector de imágenes FLA-5000 y un software Multi Gauge 3.0 software.

5.10 Medición de Ang II y sus metabolitos

Al final de los tratamientos farmacológicos se colectó sangre utilizando heparina como anticoagulante; las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 minutos a 4 °C para obtener plasma, se adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (complete mini, Roche) para evitar la degradación de Ang II y sus metabolitos. Las muestras de plasma se congelaron a -70°C hasta la posterior determinación de las angiotensinas. Los plasmas se descongelaron, de manera gradual, hasta llegar a una temperatura de 10-15 °C para se desproteinizados con una solución de metanol, y posterior tratamiento con ácido tricloroacético se filtraron en una membrana de nitrocelulosa de poro 0.22µm. El filtrado se hizo pasar a través de una columna Sep-Pak Classic C-18 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La cuantificación final de Ang II y sus metabolitos, Ang III, Ang IV y Ang 1-7 se llevó a cabo por electroforesis capilar en un equipo Beckman Coulter (Fullerton, CA, EE.UU.) P / ACE™ MDQ, con una columna de sílice 57 cm (50 cm al detector) × 75µm (Polymicro Tecnologías, Phoenix, AZ, EUA).

5.11 Análisis de resultados

Los datos de todos los modelos utilizados representan la media ± error estándar (e.e.). En los experimentos *in vitro*, los valores promedio representan la contracción de 4 a 6 anillos de arterias diferentes de los grupos de animales. En estos estudios de desplazamiento, los resultados son expresados en porcentaje de la respuesta máxima inducida por los agonistas adrenérgicos. Para determinar las diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los grupos o entre tratamientos con antagonistas, se realizaron análisis de varianza de 2 vías, seguido del método de Student Newman-Keuls.

Los valores de CE_{50} o pD_2 ($-\log CE_{50}$) se determinaron por regresión no lineal, utilizando un modelo sigmoidal para el ajuste de las curvas concentración-respuesta a la ecuación para un componente:

$$E = \frac{E_{max} (A)^m}{(A)^m + (CE_{50})^m}$$

E = Efecto farmacológico.

A = Concentración del agonista.

m = Pendiente.

E_{max} = Asíntota.

CE_{50} = Concentración efectiva 50

La afinidad de los antagonistas competitivos se expresó como valores de pA_2 , calculados por análisis de Schild (Arunlakshana & Schild, 1959). Para este análisis se utilizaron tres concentraciones de los antagonistas BMY 7378 o RS100329. Las CE_{50} en ausencia y en presencia de los antagonistas se usaron para calcular la relación de concentraciones y construir la gráfica de Schild. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Schild

$$\log(RC - 1) = \log[B] + pA_2$$

pA_2 = Logaritmo negativo de la constante de disociación para el antagonista.

RC = Relación de las concentraciones, es la relación de concentraciones equiefectivas del agonista en ausencia y presencia del antagonista.

$[B]$ = Concentración molar del antagonista

Durante el análisis de Schild, cuando los valores de la pendiente fueron diferentes de la unidad, se determinaron los valores de pK_B con el método de relación de dosis de Furchgott (Furchgott, 1972) utilizando la siguiente ecuación:

$$K_B = [B]/RC - 1$$

pK_B = Logaritmo negativo de la constante de disociación para el antagonista.

$[B]$ = Concentración molar del antagonista.

RC = Relación de las concentraciones, es la relación de concentraciones equiefectivas del agonista en ausencia y presencia del antagonista.

En el caso de los datos de Western Blot o RT-PCR en arterias de rata y en células de músculo liso, las barras representan el promedio \pm e.e. de al menos 4 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). Para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de exposición a Ang II contra el grupo control, se realizaron análisis de varianza de una vía seguida de una prueba de Dunnett's

6. Resultados

6.1 Efecto de la infusión continua de Ang II sobre la presión arterial sistólica

La pletismografía, un método de evaluación indirecto no invasivo, que registra el pulso sistólico de la presión en la arteria caudal de las ratas, se utilizó para determinar el curso temporal de la infusión de Ang II sobre la presión arterial sistólica; así como evaluar el efecto de los tratamientos con losartán (antagonista AT_1) y BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adrenérgico) en presencia de Ang II. Los valores basales de presión arterial sistólica en las ratas Wistar fue de 88.25 ± 2.47 mmHg para todos los grupos (para las ratas control fue 85 ± 4 mmHg, 87 ± 6 mmHg para Ang II, 91 ± 6 mmHg para Ang II + losartán y 90 ± 5 mm Hg para Ang II + BMY 7378). Los valores de presión arterial se incrementaron de manera dependiente del tiempo, mostrando un aumento significativo a partir del cuarto día de tratamiento en las ratas con infusión continua de Ang II (200ng/kg/min), además este efecto se mantuvo durante las 2 semanas de la infusión. Al final del experimento, los valores de presión arterial en estas ratas fue 51 mm Hg por encima de los valores en ratas controles. Cuando losartán (un antagonista AT_1) se administró en el agua de bebida, logró impedir el desarrollo de la hipertensión, mientras que el BMY 7378 (un antagonista α_{1D} -adrenérgico) no fue capaz de prevenir la hipertensión producida por la infusión con Ang II (Figura 1).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos control versus Ang II o Ang II + BMY 7378 (ANOVA 2 vías, Bonferroni * $P < 0.05$).

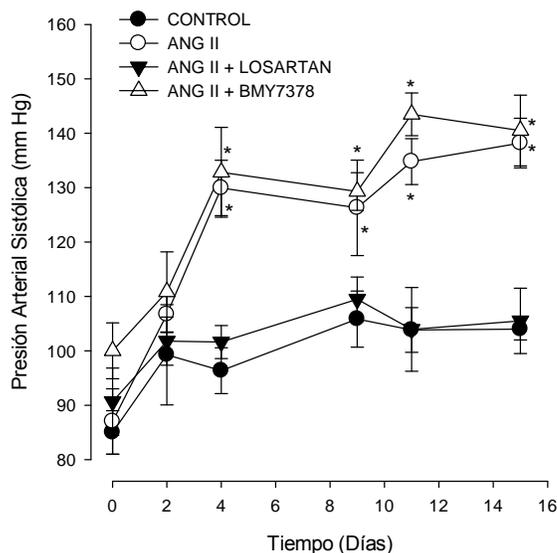
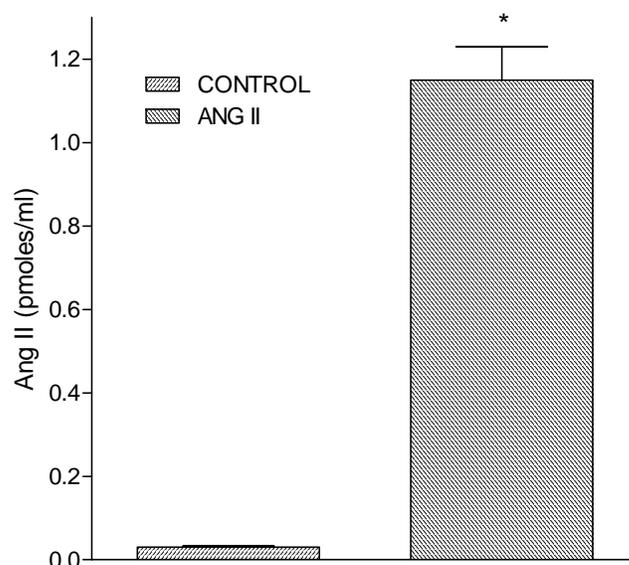


Figura 1. Curso temporal de la infusión continua con Ang-II sobre la presión arterial sistólica en control y en ratas con bomba osmótica. Efecto de los antagonistas losartán (antagonista AT_1) y BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adrenérgico) sobre el efecto presor de la Ang II. Los datos son el promedio de 6-8 ratas \pm el error estándar. * $P < 0.05$ vs control; ANOVA de 2 vías; Bonferroni

6.2 Niveles plasmáticos de Ang II de ratas controles y ratas con bomba osmótica con Ang II

Con el propósito de validar el modelo empleado en este proyecto, es decir para determinar si las bombas osmóticas liberaban de forma adecuada la Ang II o si esta se mantenía elevada, al final del experimento (2 semanas después del implante) las ratas fueron sacrificadas, y se tomaron muestras sanguíneas para determinar los niveles plasmáticos de Ang II en ratas controles y ratas con la Ang II mediante el método de electroforesis capilar en un equipo Beckman Coulter (Fullerton, CA, EE.UU.) P / ACETM MDQ, con una columna de sílice 57 cm (50 cm al detector) \times 75 μ m (Polymicro Tecnologías, Phoenix, AZ, EUA). Esta técnica puede separar diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación de masa/carga de las mismas. Al final de la medición se observó que los valores plasmáticos de Ang II en el grupo control 0.03 ± 0.003 pmoles/ml,

mientras que en las ratas que tenían la bomba osmótica presentaron valores de 1.15 ± 0.08 pmoles/ml, es decir hubo un aumento de 38.3 veces más que el grupo



de ratas control. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos control versus Ang II (*t*-Student, * $P < 0.05$).

Figura 2. Niveles plasmáticos de Ang II. Los datos son el promedio de 4 ratas \pm el error estándar. * $P < 0.05$ vs control; *t*-Student

6.3 Efecto contráctil de los agonistas α_1 -adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas control y ratas tratadas con Ang II

Los agonistas adrenérgicos A61603 y fenilefrina provocaron contracción, de manera dependiente de la concentración, en las arterias aorta y caudal de ratas control y tratadas con Ang II (Figuras. 3 y 4). Sin embargo, la sensibilidad de las arterias a estos agonistas fue diferente, sugiriendo que son distintos los receptores α_1 -adrenérgicos involucrados en la contracción de estos vasos. De manera interesante, se observó que independientemente del tratamiento con Ang II, la afinidad aparente a los diferentes agonistas en los dos lechos vasculares, representada como pD_2 , no se modificó por la Ang II (Tabla 1), y mostraron el

siguiente orden de potencia, para la aorta: fenilefrina > A61603; mientras que en el caso de la arteria caudal el orden de potencia fue: A61603 > fenilefrina. Estos resultados están de acuerdo con reportes que indican, que el principal receptor α_1 -adrenérgico involucrado en la contracción de la arteria caudal es el receptor α_{1A} ; mientras que en la arteria aorta es el α_{1D} -adrenérgico. Es importante hacer notar que en la arteria caudal de ratas Wistar jóvenes, en donde la respuesta contráctil parece estar mediada solo por el receptor α_{1A} -adrenérgico, el pD_2 a fenilefrina también es alto, sugiriendo que la respuesta contráctil en este lecho es mediada por más de una población de receptores (Parés-Hipólito, 2006).

De manera interesante, se observa que la contracción máxima en la arteria aorta con fenilefrina, aumentó aproximadamente 40% por el tratamiento con Ang II, es decir, aumentó la reactividad de la aorta (Figura 3). Este mismo efecto, y en igual magnitud, se observó a concentraciones altas de A61603 (Figura 3) o durante la contracción a KCl (80mM) (Figura 5A) en donde la aorta de ratas tratadas con Ang II también aumentaron la contracción en 40%. En marcado contraste, en la arteria caudal no se observó ningún cambio aparente en la reactividad vascular por efecto de la Ang II (Figuras 4). Estos datos están representados como efecto máximo (Emax) (Tabla 2).

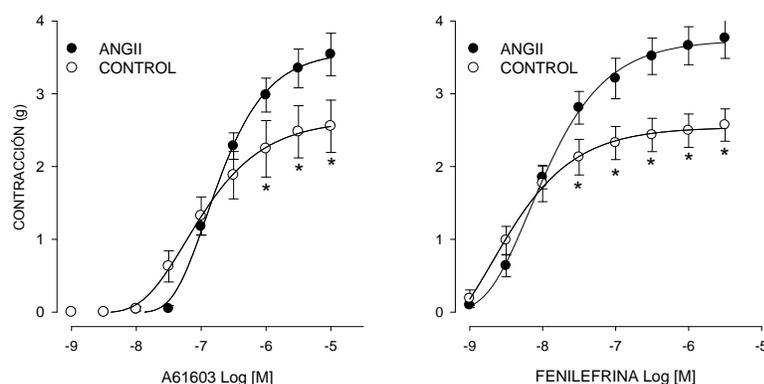


Figura 3. Curvas concentración-respuesta a A61603 y fenilefrina en anillos de aorta de ratas control y tratadas con Ang-II (200ng/kg/min/15 días). n = 4-6 .

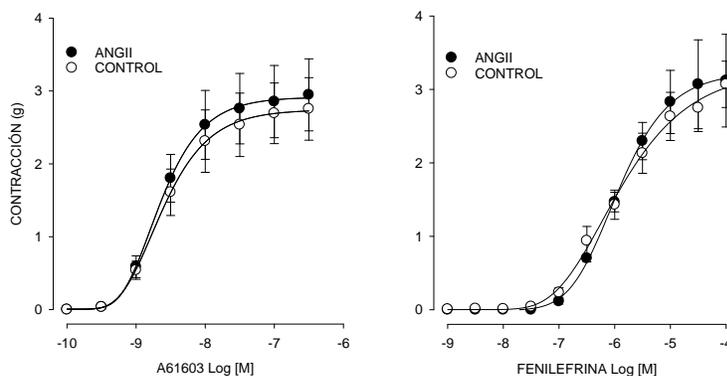


Figura 4. Curvas concentración-respuesta a A61603 y fenilefrina en anillos de arteria caudal de ratas control y tratadas con Ang-II (200ng/kg/min/15 días). n = 4-6 .

	A61603		FENILEFRINA	
	CONTROL	ANG II	CONTROL	ANG II
AORTA	6.84 ± 0.14	6.77 ± 0.06	8.14 ± 0.13	7.96 ± 0.01
CAUDAL	8.23 ± 0.05	8.58 ± 0.06	6.07 ± 0.05	6.01 ± 0.09

Tabla 1. Valores de afinidad aparente (pD_2) para el A61603 y la fenilefrina en anillos de aorta y arteria caudal de ratas control y tratadas con Ang II.

	A61603		FENILEFRINA	
	CONTROL	ANG II	CONTROL	ANG II
AORTA	2.55 ± 0.39	3.54 ± 0.29*	2.41 ± 0.22	3.76 ± 0.27*
CAUDAL	3.02 ± 0.45	3.13 ± 0.43	3.19 ± 0.33	3.21 ± 0.68

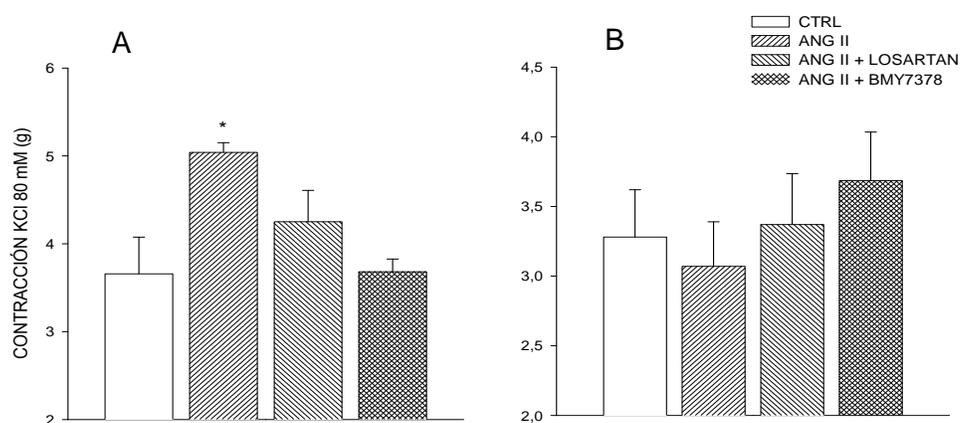
*P < 0.05 VS control; SNK

Tabla 2. Valores de contracción máxima (E_{max}) (g) para los agonistas A61603 y fenilefrina en anillos de aorta y arteria caudal de ratas control y tratadas con Ang II.

6.4 Evaluación de la reactividad vascular durante la contracción producida con KCl 80 mM en las arterias aortas y caudal.

El mismo efecto de hiperreactividad vascular, observado solo en las arterias aortas de ratas tratados con Ang II durante la contracción inducida con los agonistas adrenérgicos, A61603 y fenilefrina, se observó con la contracción producida con KCl 80mM, indicando que este aumento en la reactividad, no se debe a eventos a través de receptor, ya que despolarización con KCl también evidencia el aumento en la contracción máxima (~ 40%) solo en las aortas de ratas tratadas con Ang II (control 3.7 ± 0.4 g, Ang II 5.04 ± 0.1 g), además de manera muy interesante podemos observar, que los tratamientos con losartán y BMY 7378, previenen el desarrollo de la hiperreactividad vascular en las aortas de ratas con Ang II (Ang II + losartán 4.2 ± 0.5 g, Ang II + BMY 7378 3.7 ± 0.1 g), aun cuando el antagonista α_{1D} -adrenérgico, BMY 7378, no fue capaz de prevenir la hipertensión producida por la Ang II (Figura 5A), mientras que en las arterias caudales, no se observan cambios significativos en la contracción debidos a la Ang II o por la administración de los antagonistas AT_1 (losartán) o α_{1D} -adrenérgico (BMY 7378) (Figura 5B).

Figura 5. Efecto contráctil inducido por KCl (80mM) en las arterias aortas (A) y



arterias caudales (B). Los datos representan el valor promedio de 4 ratas \pm el error estándar. ANOVA *P<0.05, Dunnett's.

6.5 Análisis histológico de las arterias aorta torácica y caudal de ratas

Los datos mostrados hasta este momento, nos permiten sugerir que en los lechos vasculares donde la respuesta contráctil está mediada, principalmente, por el receptor α_{1D} -adrenérgico, como en la arteria aorta, la Ang II aumenta la reactividad vascular. Para apoyar esta hipótesis, realizamos cortes histológicos de las arterias aorta y caudal de los 4 grupos evaluados (Control, Ang II, Ang II + BMY 7378 y Ang II+ losartán) y se observó hipertrofia solo en la arteria aorta de ratas tratadas con Ang II (Figura 6A). El análisis estadístico demostró que hay un aumento significativo en el grosor de la capa media (20%) en las ratas tratadas con Ang II (Figura 6).

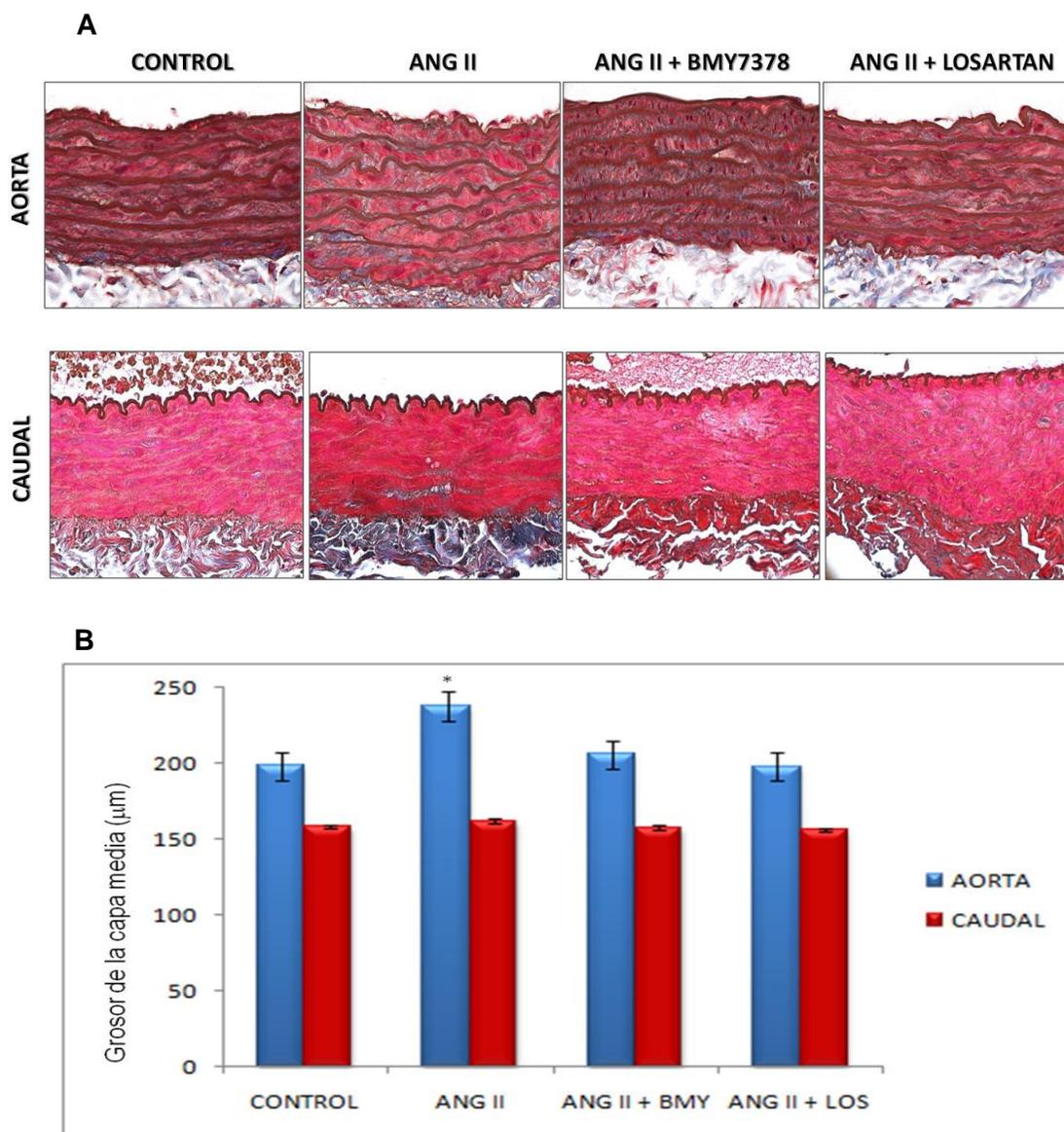


Figura 6. Análisis histológico de las arterias aorta torácica y caudal de ratas. A) Secciones de arterias de ratas fueron de al menos 4 individuos para cada grupo (Control, Ang II, Ang II + BMY 7378 y Ang II+ losartán) teñidas por Tricromía de Mason. B) Los datos representan el valor promedio de la medición del grosor de la capa media \pm el error estándar de al menos 4 ratas. * $P < 0.05$ vs control, ANOVA; Dunnett.

6.6 Efecto de los antagonistas losartán y BMY 7378 sobre los niveles plasmáticos de Ang III, Ang IV y Ang 1-7 de ratas controles y tratadas con Ang II

Con el propósito de investigar si algunos de los metabolitos de Ang II se modifica por efecto del tratamiento, o si alguno de ellos pudiera participar en el proceso de hipertrofia observado en las aortas de ratas tratadas con Ang II, decidimos determinar los niveles plasmáticos de los metabolitos Ang III, Ang IV y Ang 1-7, mediante el método de electroforesis capilar, en muestras sanguíneas de ratas tratadas por 2 semanas con Ang II, en presencia o ausencia de los antagonistas losartán y BMY 7378 (Figura 7)

Los valores plasmáticos de Ang III (control 2.11 ± 0.26 pmoles/ml vs Ang II 9.56 ± 0.50 pmoles/ml) y Ang IV (control 0.04 ± 0.003 pmoles/ml vs Ang II 0.19 ± 0.01 pmoles/ml) se incrementaron de manera significativa ~4.6 veces más en las ratas tratadas solo con Ang II, comparado con los valores del grupo control, mientras que la Ang 1-7 disminuye en un ~33% (control 3.87 ± 0.50 pmoles/ml vs Ang II 2.59 ± 0.24 pmoles/ml) en estas mismas ratas. De manera muy interesante, podemos observar que los tratamientos con el losartán (antagonista AT_1) y el BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adrenérgico) producen una disminución significativa en los valores de Ang III (Ang 9.56 ± 0.50 II vs Ang II + BMY 5.48 ± 0.10 ó Ang + losartán 5.93 ± 0.52 pmoles/ml) y Ang IV (Ang 0.19 ± 0.01 II vs Ang II + BMY 0.08 ± 0.01 ó Ang + losartán 0.10 ± 0.004 pmoles/ml) es decir, la administración de los antagonistas durante la infusión con la Ang II, previene de manera parcial el incremento en las concentraciones plasmáticas de los metabolitos (Ang III y Ang IV) producidos por efecto de la Ang II. Aunado a estos efectos benéficos, la Ang 1-7 se incrementó de manera significativa en los grupos de ratas que recibieron los antagonistas (BMY 7378 y losartán) en el agua de bebida (Ang 2.59 ± 0.24 II vs Ang II + BMY 8.13 ± 0.77 ó Ang + losartán 8.16 ± 0.98 pmoles/ml) (Figura 7).

Estos datos sugieren que el aumento de la Ang II, conduce a la activación de las vías de degradación de Ang II, produciendo incrementos de los metabolitos Ang III y Ang IV, de los cuales se ha descrito que tiene efectos pro-inflamatorios, es por ello que pudieran estar involucrados en el desarrollo de la hipertrofia vascular observado en la aorta; además, la disminución en los niveles plasmáticos de la Ang 1-7 en ratas tratadas solo con Ang II también puede favorecer el desarrollo de la hipertrofia. Es importante hacer notar que la administración del antagonista α_{1D} -adrenérgico, hace evidente la comunicación que existe entre estos dos sistemas, ya que las ratas que fueron tratados con el BMY 7378, se previene parcialmente, el aumento de los metabolitos de degradación de Ang II (Ang III y Ang IV), mientras que los niveles plasmáticos de Ang 1-7 se incrementaron significativamente, y este aumento podría estar relacionado con la prevención del desarrollo de la hipertrofia, ya que este metabolito se ha asociado con efectos anti-proliferativos y anti-inflamatorios. Por otro lado, la administración de losartán demostró, que el receptor involucrado en la activación de la vía de degradación de Ang II así como en la generación de la hipertrofia, es el receptor AT₁.

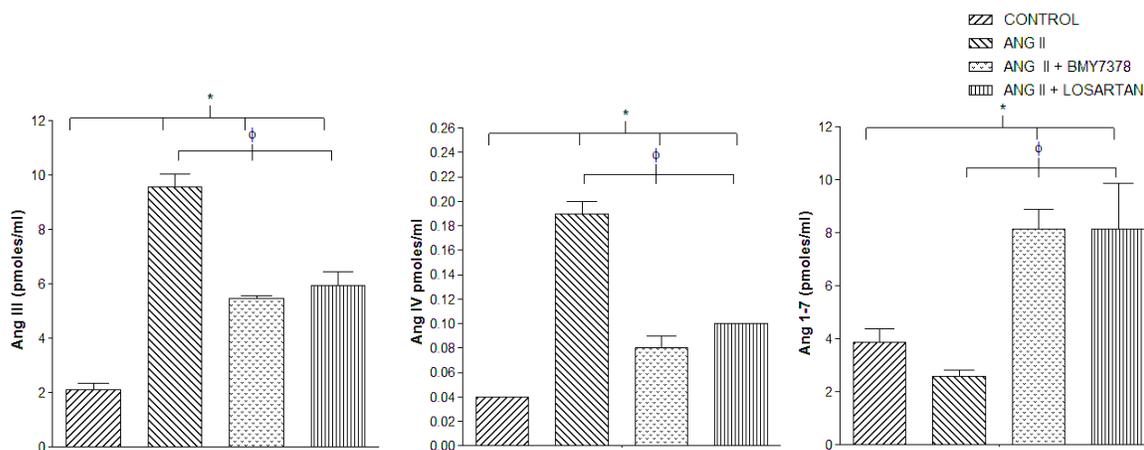


Figura 7. Niveles plasmáticos de Ang III, Ang IV y Ang 1-7. Los datos son el promedio de 4 ratas \pm el error estándar. * $P < 0.05$, (vs control) $\phi P < 0.05$, (vs Ang II); ANOVA; Bonferroni.

6.7 Caracterización de los receptores α_1 -adrenérgicos involucrados en la contracción de las arterias aorta y caudal de ratas controles y tratadas con Ang II.

Con el propósito de investigar si el tratamiento con Ang II modifica a las poblaciones de receptores involucradas en la contracción en las arterias aorta y caudal, se calcularon los valores de pA_2 para los receptores α_1 -adrenérgicos de ratas controles y tratadas con Ang II, en respuesta a la estimulación con los agonistas A61603 y fenilefrina. Construimos curvas concentración- respuesta en presencia y ausencia de BMY 7378, antagonista selectivo α_{1D} -adrenérgico (Aorta $3.1 \times 10^{-8} - 3.1 \times 10^{-9}$ M; Caudal $1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-7}$ M) y RS100329, antagonista selectivo α_{1A} -adrenérgico (Aorta $3.1 \times 10^{-8} - 3.1 \times 10^{-9}$ M; Caudal $3.1 \times 10^{-9} - 3.1 \times 10^{-10}$ M), para provocar el desplazamiento de las curvas y calcular la afinidad de los antagonistas (pA_2), por análisis de Schild (Arunlakshana & Schild, 1959). En los casos donde el valor de la pendiente fue diferente de 1, se determinaron los valores de pK_B utilizando el método de relación de dosis de Furchgott (Furchgott, 1972).

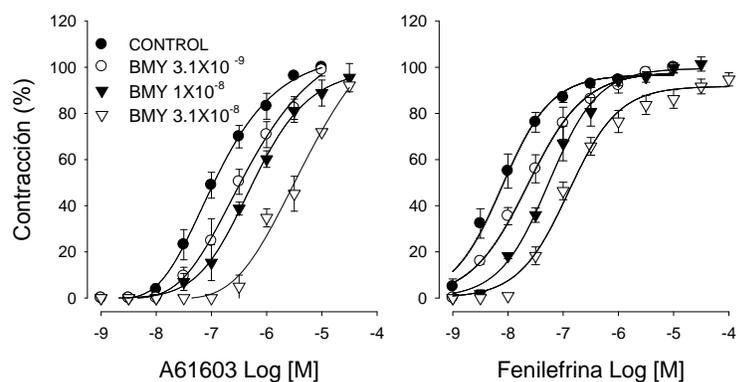
6.8 Efecto de los antagonistas α_1 -adrenérgicos, BMY 7378 y RS100329 sobre el efecto contráctil en la arteria aorta de ratas controles y tratadas con Ang II.

En las aortas de ratas controles y tratadas con Ang II, el BMY 7378 y el RS100329 desplazaron a la derecha las curvas concentración-respuesta, de los agonistas A61603 y fenilefrina, de manera dependiente de la concentración, y sin cambios importantes en la respuesta máxima producida por los agonistas (Figuras 8 y 9), consistente con un antagonismo competitivo. Los valores de pA_2 y pK_B para BMY 7378 y RS 100329 no se modificaron por el tratamiento con Ang II y fueron similares a los valores de afinidad (pK_i) obtenidos por estudios de unión de radioligandos descritos para el receptor α_{1D} (Tabla 3); las pendientes de Schild, en los dos grupos, casi siempre fueron cercanas a 1, indicando que la interacción de los antagonistas con una sola población de receptores; sin embargo, en los casos en donde los valores de pendiente fueron superiores a la unidad, indicaron la interacción de los antagonistas con más de una población de receptores α_1 -adrenérgicos en este lecho vascular. Este hecho, hace evidente el uso de diferentes agonistas y antagonistas sobre un mismo lecho vascular, para hacer una mejor caracterización sobre cuales son los receptores involucrados en la contracción, debido a que no todos los agonistas estimulan la misma población de receptores.

AGONISTA	BMY7378		RS100329		BMY 7378		RS100329
	CONTROL	ANG II	CONTROL	ANG II	α_{1A}	6.6	9.6
A61603	8.39±0.17 <i>m</i> =1.28	9.11±0.21 <i>m</i> =0.97	8.60±0.11 <i>m</i> =0.97	8.98±0.16 <i>m</i> =0.9	α_{1B}	6.2	7.5
FENILEFRINA	8.72±0.21 <i>m</i> =1.32	8.97±0.02 (pK_B)	8.51±0.15 <i>m</i> =0.95	8.76±0.08 (pK_B)	α_{1D}	8.2	7.9

Tabla 3. Valores de pA_2 o pK_B y *m* (pendientes) para el BMY 7378 y RS 100329 con los diferentes agonistas α_1 -adrenérgicos en aortas de ratas controles y tratadas con Ang II. Valores de pK_i de los antagonistas α_1 (Pares-Hipolito *et al.*, 2006).

AORTAS DE RATAS CONTROLES



AORTAS DE RATAS TRATADAS CON ANG II

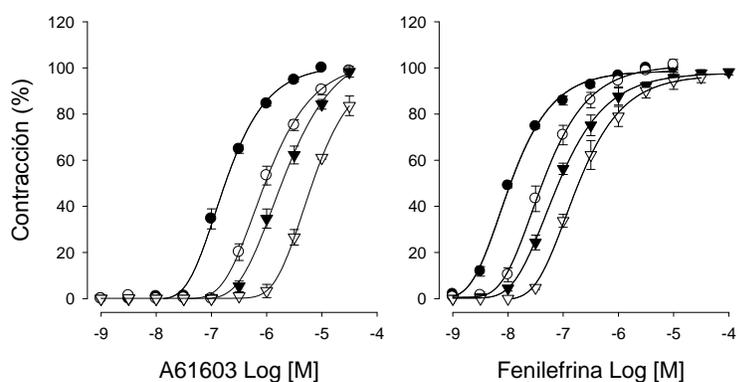
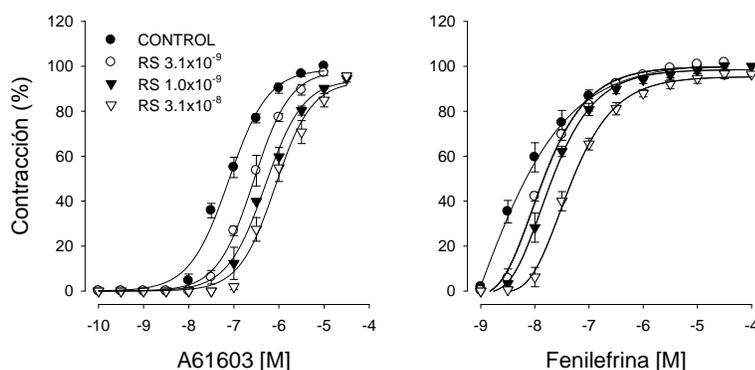


Figura 8. Curvas Concentración-respuesta a los agonistas, A61603 y fenilefrina en condiciones control y en presencia de concentraciones crecientes de BMY 7378 en aorta de ratas controles y tratadas con Ang II.

AORTAS DE RATAS CONTROLES



AORTAS DE RATAS TRATADAS CON ANG II

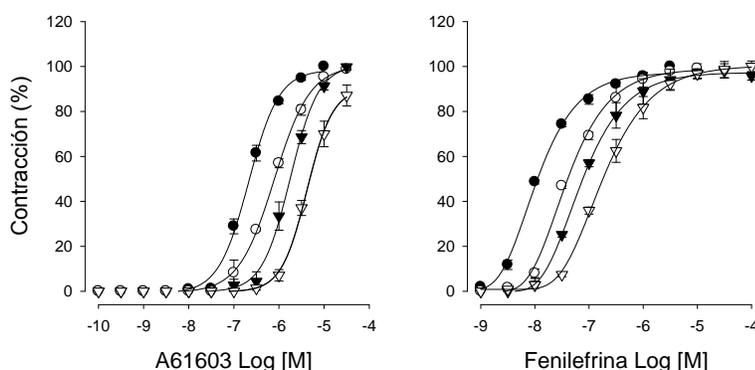


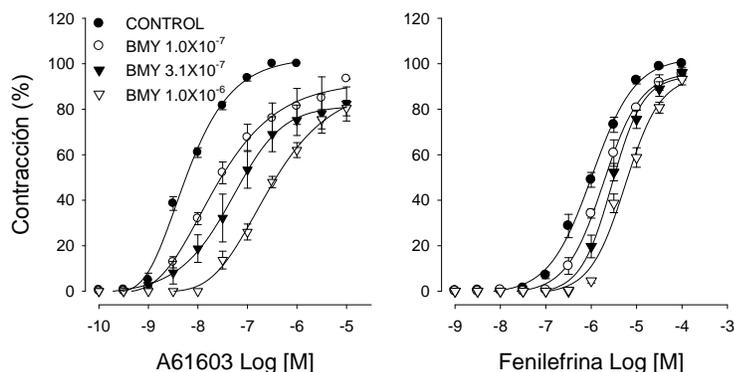
Figura 9. Curvas concentración-respuesta a los agonistas, A61603 y fenilefrina en condiciones control y en presencia de concentraciones crecientes de RS100329 en aorta de ratas controles y tratadas con Ang II.

En la arteria caudal de ratas controles y de ratas tratadas con Ang II, el BMY 7378 desplazó a la derecha, con baja afinidad, a los agonistas A61603 y fenilefrina (Figura 10, Tabla 4), sugiriendo la ausencia del receptor α_{1D} -adrenérgico en este lecho. En cambio, el RS 100329 desplazó con alta afinidad a los mismos agonistas, confirmando la presencia de receptores α_{1A} -adrenérgicos; sin embargo, los valores de la pendiente de Schild, en la mayoría de los casos, fueron mayores de 1, indicando la participación de más de una población de receptores α_1 -adrenérgicos en la arteria caudal (Figura 11, Tabla 4). Es importante hacer notar, que tanto en la arteria caudal como en la aorta, la afinidad de los antagonistas BMY 7378 y RS 100329, no se modifica por el tratamiento con Ang II, indicando que los mismos receptores participan en la contracción después del tratamiento.

AGONISTA	BMY7378		RS100329		BMY 7378		RS100329
	CONTROL	ANG II	CONTROL	ANG II	α_{1A}	6.6	9.6
A61603	7.32±0.16 (pK _B)	7.41±0.11 (pK _B)	9.88±0.018	9.97±0.24 (pK _B)	α_{1B}	6.2	7.5
FENILEFRINA	7.14±0.07 (pK _B)	6.85±0.30 (pK _B)	9.22±0.18 (pK _B)	8.82±0.02 (pK _B)	α_{1D}	8.2	7.9

Tabla 4. Valores de pA₂ o pK_B para el BMY 7378 y RS 100329 con los agonistas α_1 -adrenérgicos en arteria caudal de ratas controles y tratadas con Ang II. Valores de pK_i de los antagonistas α_1 (Pares-Hipolito *et al.*, 2006).

CAUDALES DE RATAS CONTROLES



CAUDALES DE RATAS TRATADAS CON ANG II

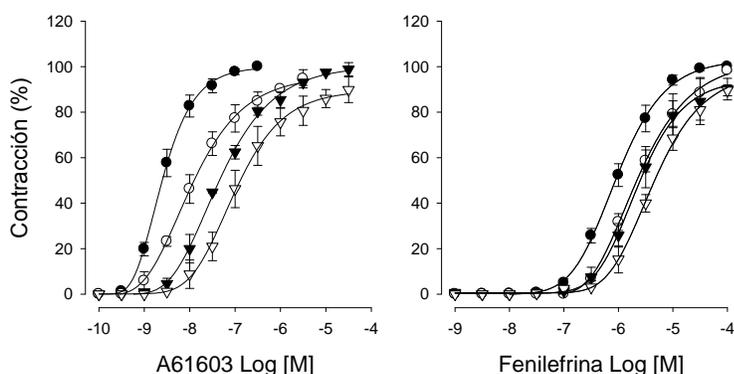
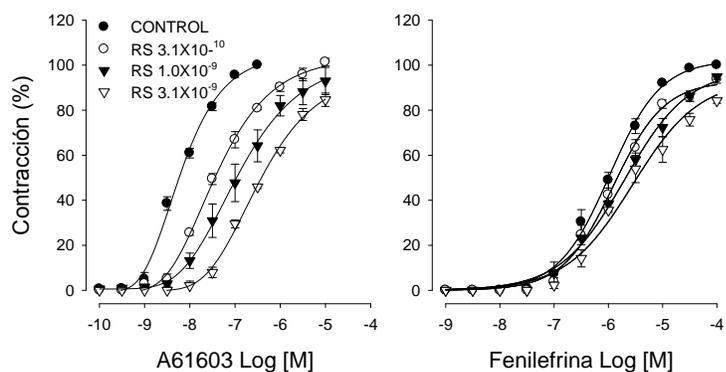


Figura 10. Curvas concentración-respuesta a los agonistas, A61603 y fenilefrina en condiciones control y en presencia de concentraciones crecientes de BMY 7378 en arteria caudal de ratas controles y tratadas con Ang II

CAUDALES DE RATAS CONTROLES



CAUDALES DE RATAS TRATADAS CON ANG II

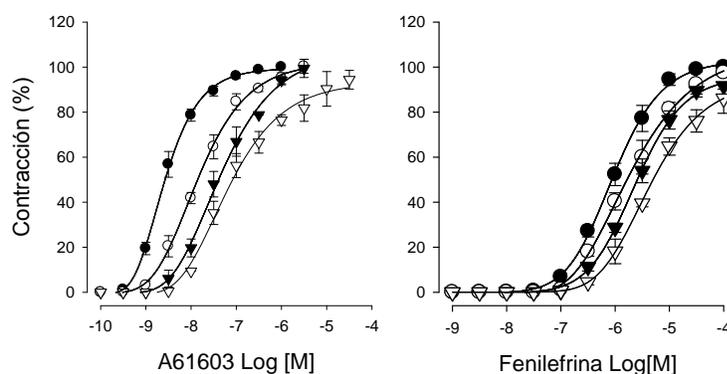


Figura 11. Curvas concentración-respuesta a los agonistas, A61603 y fenilefrina en condiciones control y en presencia de concentraciones crecientes de RS100329 en arteria caudal de ratas controles y tratadas con Ang II.

6.9 Expresión de RNAm de los receptores α_1 -adrenérgicos en la arteria aorta de ratas controles y tratadas con Ang II a diferentes tiempos.

De manera inicial solo determinamos la expresión de receptores α_1 -adrenérgicos al final de las 2 semanas de tratamiento con Ang II con la finalidad de identificar cambios en la expresión de RNAm, empleando “primers” específicos para cada receptor α_1 -adrenérgico, previamente descritos y probados por Scofield (Scofield *et al.*, 1995) por Transcripción Reversa seguida de una amplificación por PCR de punto final (RT-PCR), y encontramos que después de 2 semanas de infusión con la Ang II, la expresión del RNAm que codifica para el receptor α_{1D} -adrenérgico

así como la proteína se encontraba disminuida. Estos resultados nos sorprendieron, pues hasta ese momento, los datos generados con nuestro modelo se comportaba de acuerdo a lo esperado en un modelo de hipertensión inducido por Ang II, como por ejemplo, se desarrolló la hipertensión arterial, la hipertrofia y la hiperreactividad vascular al menos en las aortas de ratas con Ang II; sin embargo, los datos de la expresión del receptor α_{1D} -adrenérgico tanto a nivel de RNAm como de proteína no eran consistente con los datos previos reportados sobre la relación del aumento de los niveles de Ang II con el aumento de la expresión del receptor α_{1D} -adrenérgico (Villalobos-Molina & Ibarra, 2005; Villalobos-Molina *et al.*, 2008). Con el propósito de investigar si en algún momento durante la infusión con Ang II, la expresión de los receptores α_{1D} -adrenérgicos se veía incrementada por el tratamiento, realizamos un curso temporal y observamos de manera sorprendente, que desde las 24 h post implante, la Ang II disminuyó la expresión de estos receptores en un 34.72 % ($P < 0.05$) además, este efecto se mantuvo en el tiempo (Figura 14).

La amplificación de los RNAm que codifican para los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1B} en la aorta de ratas controles y tratadas con Ang II, durante diferentes tiempos, se muestra en las Figuras 12 y 13, en donde se observa que el RNAm basal del receptor α_{1A} adrenérgico no se altera de manera significativa por la Ang II. Este mismo patrón se obtuvo con la expresión del receptor α_{1B} adrenérgico ya que el análisis estadístico no mostró diferencias entre los grupos.

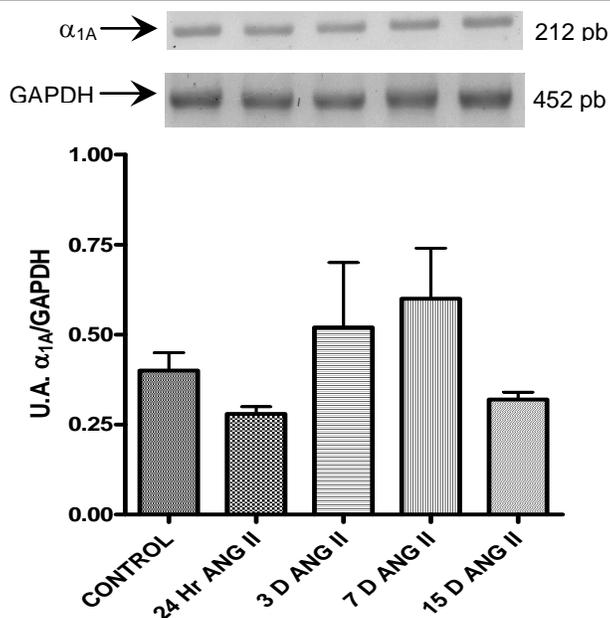


Figura 12. Expresión del RNAm que codifica para el receptor α_{1A} -adrenérgico en aorta de ratas controles y tratadas con Ang II por diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen control (“house keeping”) GAPDH. Las barras representan el promedio \pm e.e.de al menos 4 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento tipo. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett

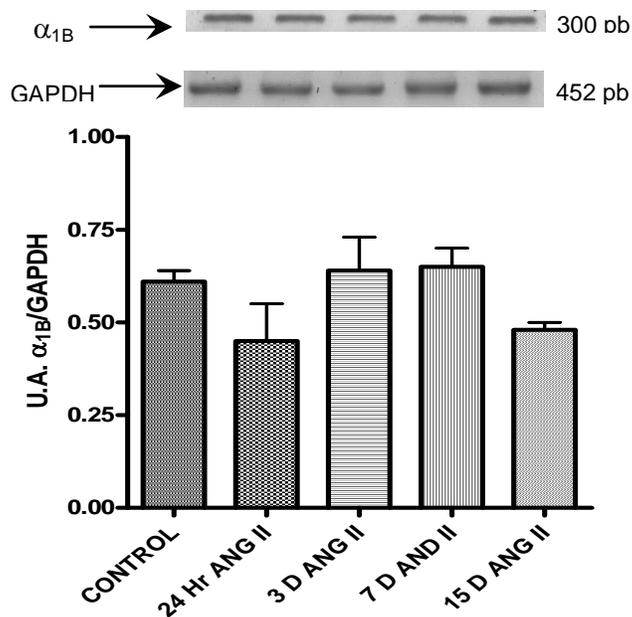


Figura 13. Expresión del RNAm que codifica para el receptor α_{1B} -adrenérgico en aorta de ratas controles y tratadas con Ang II por diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados por la expresión del gen control GAPDH. Las barras representan el promedio \pm e.e.de al menos 4

experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento tipo. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett

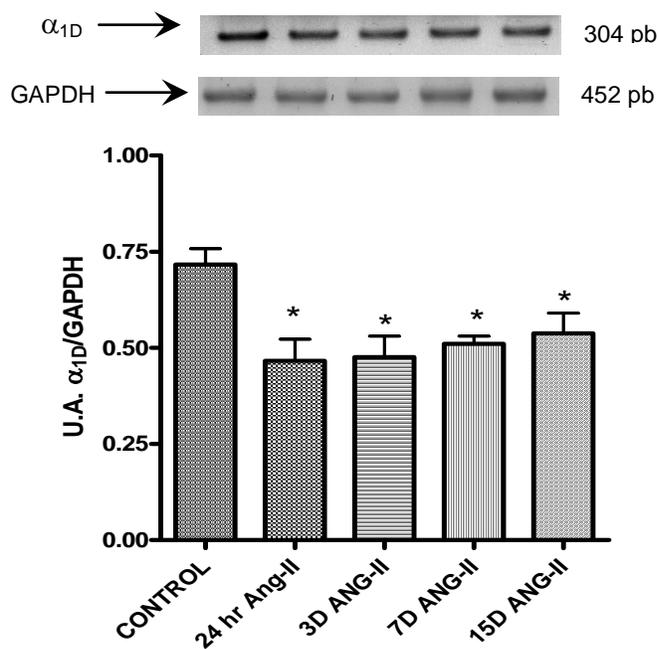


Figura 14. Expresión del RNAm que codifica para el receptor α_{1D} -adrenérgico en aorta de ratas controles y tratadas con Ang II por diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados contra la expresión del gen control GAPDH. Las barras representan el promedio \pm e.e. de al menos 4 experimentos y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento tipo. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett

Resulta interesante observar que, a nivel de RNAm, los 3 receptores α_1 adrenérgicos se expresan de manera basal en la aorta de ratas y que la Ang II solo produce cambios en la expresión del receptor α_{1D} adrenérgico desde tiempos cortos, mientras que los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos permanecen sin cambios significativos.

6.10 Determinación proteica de los receptores α_1 -adrenérgicos en la arteria aorta de ratas controles y tratadas con Ang II a diferentes tiempos

La proteína de los receptores α_1 -adrenérgicos en aortas de ratas controles y tratadas por diferentes tiempos con Ang II, se determinó por Western Blot vía electroforesis (SDS-PAGE), en condiciones desnaturalizantes, seguida de transferencia e inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra los receptores α_1 -adrenérgicos, y que fueron detectados por quimioluminiscencia con peroxidasa de rábano. Se corrieron controles positivos utilizando células Rat-1 transfectadas con cada receptor α_1 -adrenérgico para corroborar las bandas obtenidas de las muestras, obteniendo las bandas correspondientes para el receptor α_{1A} y α_{1D} en un peso ≈ 72 kDa y para el receptor $\alpha_{1B} \approx 60$ kDa.

De manera basal los tres receptores α_1 -adrenérgicos se expresan en la aorta de ratas controles y tratadas con Ang II; sin embargo, en las ratas controles se observa que la proporción de receptor α_{1D} es mayor que la de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos. De manera interesante, la Ang II produjo una marcada disminución en la expresión del receptor α_{1D} -adrenérgico, que se mantiene en el tiempo (Figura 17); mientras que los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos permanecen sin cambios significativos durante el tratamiento con Ang II (Figuras 15 y 16). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos con el RT-PCR.

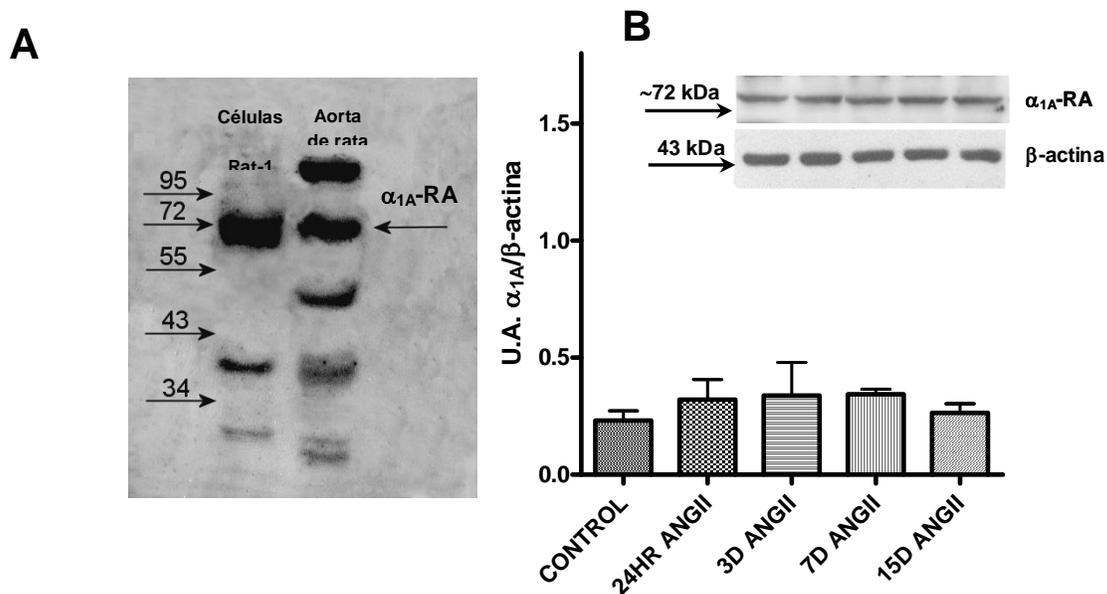


Figura 15. Immunoblot del receptor α_{1A} -adrenérgico en aorta de ratas control y tratadas con Ang II (200ng/kg/min) a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína constitutiva (β -actina). Las bandas representan el promedio \pm e.e.de al menos 4 ratas. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett

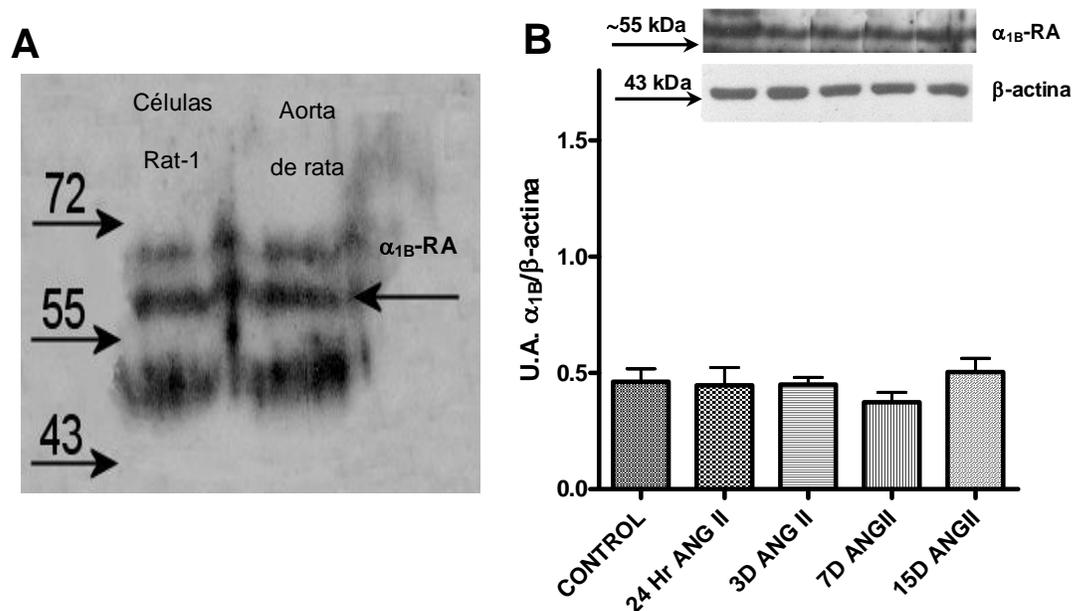


Figura 16. Immunoblot del receptor α_{1B} -adrenérgico en aorta de ratas control y tratadas con Ang II (200ng/kg/min) a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína constitutiva (β -actina). Las bandas representan el promedio \pm e.e.de al menos 4 ratas. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett

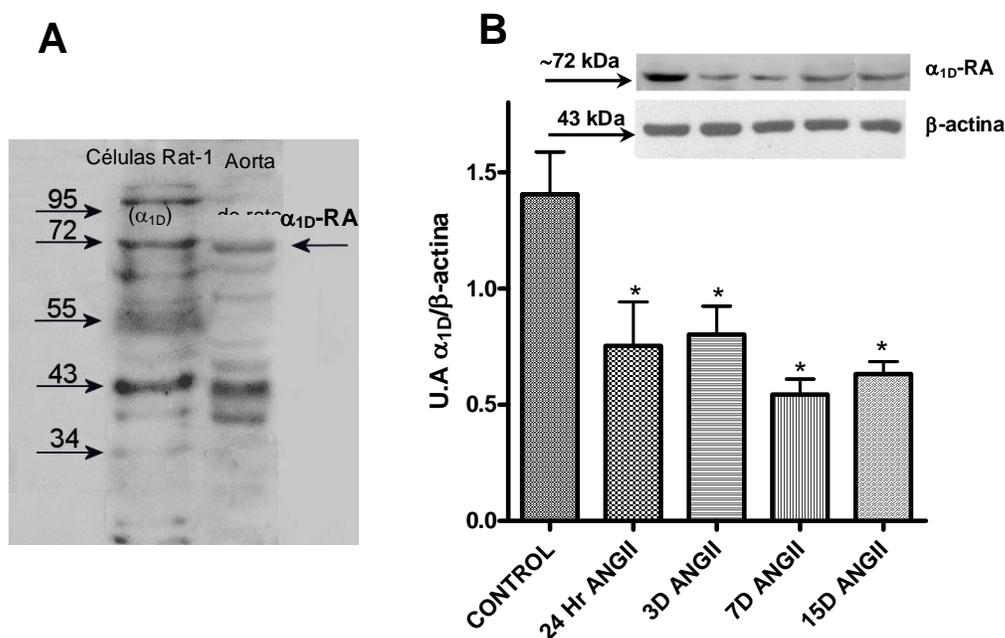


Figura 17. Immunoblot del receptor α_{1D} -adrenérgico en aorta de ratas control y tratadas con Ang II (200ng/kg/min) a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína constitutiva (β -actina). Las bandas representan el promedio \pm e.e.de al menos 4 ratas. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett

6.11 Determinación de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular estimuladas con Ang II a diferentes tiempos

Se determinó la proteína (Western Blot) para los receptores α_1 -adrenérgicos durante la estimulación con Ang II (100 nM), en células de músculo liso vascular de aorta de rata, con anticuerpos específicos. Se obtuvieron las bandas correspondientes para el receptor α_{1A} y α_{1D} con peso ≈ 72 kDa y para el receptor $\alpha_{1B} \approx 60$ kDa.

De manera basal, los tres receptores α_1 -adrenérgicos se expresan en células de músculo liso vascular en cultivo, aunque el receptor α_{1B} -adrenérgico esta en menor proporción (Figura 18). La estimulación con Ang II (100nM) disminuyó, transitoria y significativamente, al receptor α_{1A} -adrenérgico, observándose el efecto

máximo a las 2 horas. En el caso del receptor α_{1B} -adrenérgico, no hubo cambios durante la estimulación con Ang II. Sin embargo, de manera muy interesante, observamos que la Ang II produjo una respuesta bifásica sobre el receptor α_{1D} -adrenérgico, ya que a tiempos cortos (30 minutos) aumentó 2.73 veces sobre el basal, y con el tiempo disminuyó hasta ser 0.62 veces menor que en estado basal, a las 12 horas.

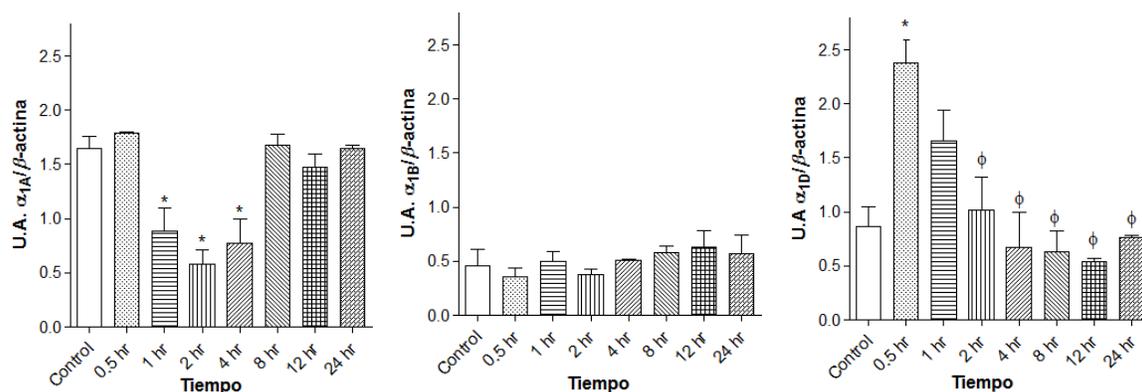


Figura 18. Western Blot de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular estimuladas con Ang II (100nM) a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína constitutiva (β -actina). Las bandas representan el promedio \pm e.e.de 4 ratas.* VS control $P < 0.05$, ANOVA, Dunnett; ϕ VS 0.5hr $P < 0.05$, ANOVA, Bonferroni.

6.12 Efecto del losartán sobre el receptor α_{1D} -adrenérgico en células de músculo liso vascular tratadas con Ang II

Se trataron células de músculo liso vascular con losartán, antagonista AT_1 (10 μ M) o cicloheximida (10 μ g/ml), un inhibidor de la síntesis de proteínas, durante 30 min. Posteriormente, las células se estimularon con Ang II (100nM) durante 30 min (tiempo del máximo efecto sobre el receptor α_{1D} -adrenérgico) y se observó un bloqueo significativo en la cantidad relativa de los receptores con los 2 tratamientos, sugiriendo que la estimulación del receptor AT_1 conduce al aumento

del receptor α_{1D} -adrenérgico; y que este efecto ocurrió por síntesis de *ново*, ya que la cicloheximida inhibió la síntesis del receptor α_{1D} -adrenérgico (Figura 19).

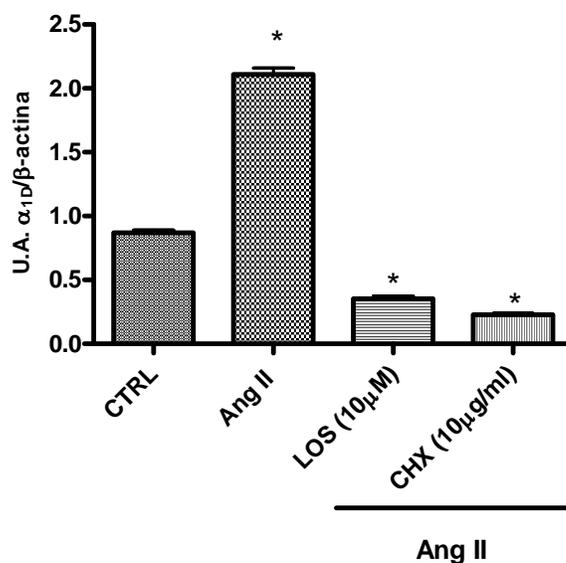


Figura 19. Inhibición de la síntesis del receptor α_{1D} -adrenérgico con losartán (LOS) y cicloheximida (CHX), en células de músculo liso vascular estimuladas con Ang II (100nM). Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína constitutiva (β -actina). Las bandas representan el promedio \pm e.e.estándar de 3 ratas. * $P < 0.05$; Prueba de Dunnett's

7 Discusión

De manera general, el presente estudio mostró algunos hallazgos importantes que hacen evidente la comunicación (cross-talk) entre el sistema renina angiotensina y los receptores α_{1D} -adrenérgicos en la vasculatura.

Primero, confirma que la Ang II favorece mecanismos fisiopatológicos a nivel de la vasculatura, relacionados con el desarrollo de hipertensión arterial, como la hiperreactividad e hipertrofia vascular y que dichos eventos son producidos en parte por la activación de receptores AT_1 .

Segundo, el proceso de hipertrofia e hiperreactividad observado solo en la arteria aorta producido por la infusión continua con la Ang II, se evitó con el cotratamiento con el BMY 7378, un antagonista α_{1D} -adrenérgico, haciendo evidente la participación de este receptor en el desarrollo de estas alteraciones vasculares y su comunicación con el sistema renina angiotensina.

En este mismo sentido, una tercera observación interesante fue, la disociación entre los efectos producidos por el bloqueo de receptores α_{1D} -adrenérgicos sobre el incremento en la presión arterial y los cambios vasculares producidos por la infusión con la Ang II, ya que aunque el aumento en la reactividad vascular e hipertrofia observado solo en la arteria aorta, se evitó completamente por el tratamiento con el BMY 7378, este fármaco no fue capaz de evitar o al menos disminuir el desarrollo de la hipertensión aun cuando la dosis utilizada fue muy elevada (10 mg/kg/día).

Un cuarto hallazgo particularmente interesante, fue encontrar en un curso temporal, disminuida la expresión del ARNm que codifica para el receptor α_{1D} -adrenérgico en un 34.72% desde las primeras 24 hrs de infusión, así como la proporción relativa de la proteína la cual también se encontraba disminuida en 46.42% en las aortas de animales tratados con Ang II. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con la Ang II produjo una disminución en la expresión del

receptor α_{1D} -adrenérgico en la arteria aorta, éste receptor siguió siendo el responsable de la contracción del vaso.

El quinto hallazgo de llamar nuestra atención, fue demostrar que la infusión con Ang II favorece la generación de metabolitos bioactivos como la Ang III y la Ang IV, las que encontramos elevadas en muestras plasmáticas de los animales tratados con Ang II.

En células de músculo liso vascular, encontramos que la Ang II, produce cambios bifásicos en la expresión de receptores α_{1D} -adrenérgicos, ya que a tiempos cortos el estímulo con Ang II favorece el aumento en la expresión de estos receptores, sin embargo con el paso del tiempo, esta expresión disminuye drásticamente. Además se observó que el incremento de receptores α_{1D} -adrenérgicos se llevaba a cabo por síntesis de *NOVO* y que era debido a estimulación de receptores AT_1 .

7.1 Efecto de la Ang II sobre la presión arterial, remodelamiento y reactividad vascular

Datos en la literatura demuestran el importante papel de la Ang II en la fisiopatología del remodelamiento vascular durante la hipertensión (Schiffrin & Touyz, 2004; Mulvany, 2008). La vasculatura es un órgano efector para el SRA, el cual está provisto de receptores AT_1 localizados sobre las células de músculo liso vascular en donde al ser estimulados aumentan la concentración intracelular de Ca^{+2} , permitiendo que este ion se una a la calmodulina, estableciendo la interacción actina-miosina y la contracción de las fibras musculares produciendo la vasoconstricción (Paul *et al.*, 2006). En este sentido, nuestros datos muestran que la infusión con Ang II (200 ng/kg/min) produce el esperado aumento de la presión arterial de manera dependiente del tiempo, mostrando incrementos significativos a partir el cuarto día de la infusión; además, en este modelo, el receptor involucrado con el desarrollo de la hipertensión es el receptor AT_1 , ya que el cotratamiento con losartán (10mg/kg/día) previene el proceso hipertensivo, datos similares fueron reportados por otros grupos (Griffin *et al.*, 1991; Daigle *et al.*, 2004; Castoldi *et al.*, 2007) quienes han descrito diversos mecanismos

involucrados en la hipertensión generada con la Ang II. Sin embargo, para nuestra sorpresa, el cotratamiento con BMY 7378 (10mg /kg/día) no fue capaz de evitar el desarrollo de la hipertensión producida por la infusión Ang II, a pesar de que este compuesto se ha descrito como un agente antihipertensivo, debido a sus propiedades de antagonista selectivo sobre receptores α_{1D} -adrenérgicos ($K_i=1.3nM$) (Testa *et al.*, 1999; Villalobos-Molina & Ibarra, 1999), y a sus efectos de agonista sobre receptores 5HT_{1A} a nivel de sistema nervioso central ($K_i=0.93nM$) (Goetz *et al.*, 1995; Testa *et al.*, 1999).

7.2 Remodelamiento Vascular

El presente estudio mostró de manera clara que los cambios estructurales en la vasculatura producidos por la Ang II, son debidos a efectos directos e indirectos, en este sentido, la infusión de Ang II produce el esperado incremento en el grosor de la pared vascular y en la relación media/lúmen (datos no mostrados) en la arteria aorta y no en la arteria caudal de los mismos animales. La aparición de la hipertrofia en la arteria aorta utilizando el modelo de infusión con Ang II se había descrito por otros autores desde hace varios años, utilizando ratones C57BL6 (Guzik *et al.*, 2007), ratas Sprague-Dawley (Simon & Csiky, 1998; Simon *et al.*, 1998; Ishizaka *et al.*, 2005) o ratas Wistar (Parker *et al.*, 1998) además, el remodelamiento vascular producido por este péptido, también se ha descrito en vasos de resistencia como el lecho mesentérico (Csiky & Simon, 1997; Virdis *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de esta información, este trabajo probablemente sea uno de los pocos que muestra que los cambios estructurales producidos por estímulo generalizado con la Ang II son diferenciales es decir, que los cambios vasculares no se desarrollan de manera generalizada en todos los vasos del mismo individuo, por ejemplo en nuestro caso, la arteria caudal no presenta desarrollo de la hipertrofia vascular a pesar de que las ratas desarrollan hipertensión y hay hipertrofia en la arteria aorta.

De manera muy interesante observamos que, los antagonistas losartán (antagonista del receptor AT₁) y el BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adrenérgico),

fueron capaces de prevenir el desarrollo de la hipertrofia vascular producido por la Ang II en la arteria aorta sin producir cambios en la arteria caudal de los mismos animales. Estos resultados demuestran que al menos en nuestro modelo, la Ang II, a través de el receptor AT_1 inicia los eventos que llevan al desarrollo del remodelamiento vascular en la arteria aorta, sin embargo, este efecto no es sorprendente, pues más allá del efecto contráctil en músculo liso, Ang II promueve diversos procesos en tejido cardiovascular (Feihl *et al.*, 2008), por ejemplo, se ha descrito que la Ang II influye en la arquitectura e integridad de la pared vascular por modulación de crecimiento celular de todos los tipos celulares que forman la pared vascular, incluyendo células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos así como en la regulación en la composición de la matriz extracelular (Kim & Iwao, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2003; Schiffrin & Touyz, 2004; Mulvany, 2008); las acciones de la Ang II que llevan al crecimiento de la pared vascular dependen entre otros mecanismos, de la estimulación de diversos factores de crecimiento (Kayanoki *et al.*, 1999). Asimismo, reportes en la literatura muestran que este péptido mediante la activación de receptores AT_1 , aumenta la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de diferentes enzimas, en todos los tipos celulares de la vasculatura, incluyendo las células endoteliales, células de músculo liso vascular, fibroblastos de la capa adventicia y los adipocitos de la periferia vascular (Inoguchi & Nawata, 2005; Touyz & Briones, 2011).

Bajo condiciones patológicas, ROS están relacionadas con la inflamación, disfunción endotelial, proliferación celular, deposición de matriz extracelular, fibrosis, angiogénesis y remodelamiento vascular (Touyz & Briones, 2011).

Aunado a todos estos efectos, Ang II se describe como un agente pro-inflamatorio, debido que estimula la producción de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión a través de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y Ref-1 (Touyz, 2000; Sanz-Rosa *et al.*, 2005; Touyz, 2005). A través de estas acciones, Ang II aumenta la inflamación vascular y promueve la disfunción endotelial y el remodelamiento, es por ello que la Ang II se le ha visualizado como un factor

preponderante en el remodelamiento del sistema cardiovascular. Así mismo, Wang y colaboradores reportaron que la señalización del receptor AT_1 durante la infusión con Ang II induce la transcripción, translocación y la activación de la metaloproteasas de la matriz tipo II (MMP2), así como activación de TGF- β 1 y deposición de colágeno que conducen a un engrosamiento de túnica media y túnica íntima en la arteria carótida y señalan que eventos similares ocurren en la arteria aorta con Ang II o por efecto del envejecimiento (Wang *et al.*, 2005).

En el análisis histológico presentado en este proyecto, el resultado más sorprendente, fue el observar de que el BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adrenérgico), fue capaz de evitar el proceso de hipertrofia vascular en la arteria aorta de animales tratados con Ang II, aun cuando la dosis utilizada de este fármaco no evitó el desarrollo de la hipertensión, sugiriendo que al menos en el proceso de remodelamiento vascular de la aorta de animales tratados con Ang II, está involucrado de manera indirecta el receptor α_{1D} -adrenérgico.

En este sentido, desde hace tiempo se ha sugerido que parte de los efectos tróficos de la Ang II pueden estar reforzados por la concomitante activación del sistema nervioso simpático, lo que por sí mismo podría tener propiedades tróficas (Lever, 1986), por ejemplo hace más de una década se reportó que la infusión continua de Ang II junto con un bloqueador ganglionar previene el efecto presor del péptido así como cambios estructurales en la vasculatura (Li *et al.*, 1996), además algunas investigaciones han demostrado que la administración de Ang II en roedores produce hipertrofia en las arterias mesentéricas, aun cuando se evite el aumento de la presión arterial por la administración de hidralazina (Griffin *et al.*, 1991; Viridis *et al.*, 2004).

Por otro lado, datos que parecerían estar en contraposición a los nuestros muestran que, en ratas simpatectomizadas con infusión de Ang II, se observan cambios estructurales en la vasculatura de resistencia (en arterias pequeñas del mesenterio vascular), sugiriendo que en estos lechos el efecto hipertrófico es debido a efecto directo de la Ang II y no a un efecto de estimulación de sistema

nervioso simpático, sin embargo, la simpatectomía atenúa el desarrollo de estos cambios en arterias grandes (Simon & Csiky, 1998), sugiriendo que los cambios estructurales que sufren los vasos por la Ang II, puede tener diferencias regionales a lo largo de la vasculatura (Simon *et al.*, 1995).

En otras palabras, nuestros datos permiten sugerir que la hipertrofia vascular producida por la Ang II en la arteria aorta, puede estar mediada en gran parte por activación nerviosa simpática o por alguna otra vía que promueva la activación del sistema adrenérgico en especial la activación de los receptores α_{1D} -adrenérgicos, los cuales se sabe que tiene un papel preponderante en el desarrollo de la hipertrofia vascular (Chen *et al.*, 1995; Xin *et al.*, 1997; Erami *et al.*, 2002), es decir, estos datos hacen evidente la interacción que existe entre estos dos sistemas aunque ya había sido reportada por otros autores (van Kleef *et al.*, 1992), este grupo encontró que la infusión con Ang II producía incrementos en la síntesis de DNA sin embargo, prazosina (antagonista α_1 -adrenérgico) evitó el efecto mitogénico de la hormona sin modificar el desarrollo de la hipertensión. Es importante hacer notar, que estos dos sistemas ejercen efectos uno sobre otro, es decir que tiene efectos bidireccionales, por ejemplo el grupo de Edward Lakatta reportó que la infusión continua con fenilefrina induce la expresión de la Ang II y expresión y actividad de MMP-2 en músculo liso vascular de ratas jóvenes, efectos que son semejantes a los producidos por la infusión con Ang II, sin embargo lo que llama la atención, es que el losartán (antagonista AT_1) reduce de manera importante los efectos producidos tanto de la Ang II pero también los efectos producidos por la fenilefrina, evidenciando una vez más la comunicación (cross-talk) entre estos sistemas (Wang *et al.*, 2005).

Por otro lado, es importante mencionar que en el remodelamiento vascular ocurrido durante la HA, la túnica adventicia es la capa más sensible de los vasos en respuesta a la elevación de la presión arterial (Schulze-Bauer *et al.*, 2002), y existen grupos que sugieren que los fibroblastos que conforman esta capa, son el principal tipo celular implicado en el remodelamiento vascular (McGrath *et al.*, 2005) ya que la adventicia también es una importante fuente generadora de ROS

(Touyz, 2005) además, las células de la adventicia poseen receptores acoplados a proteínas G de los cuales aún desconocemos su papel fisiológico, por ejemplo, se han identificado receptores α_1 -adrenérgicos en la adventicia de arterias de rata y ratón y su expresión es tan alta como en la capa media (Faber *et al.*, 2001) y se ha observado al menos en estudios *in vitro*, la noradrenalina estimula receptores α_1 -adrenérgicos favoreciendo la proliferación y migración de fibroblastos de la túnica adventicia, eventos importantes en el remodelamiento vascular (Faber *et al.*, 2001; Sartore *et al.*, 2001) y que pueden ser inhibidos por antagonistas α_1 -adrenérgicos.

Estos y otros datos sugieren que los receptores α_1 -adrenérgicos en la túnica adventicia tienen un papel activo en el desarrollo del remodelamiento vascular (McGrath *et al.*, 2005), es decir, que cada capa que constituye los vasos sanguíneos contribuye con el desarrollo del remodelamiento vascular y que en tanto en la túnica media como la adventicia, los receptores α_1 -adrenérgicos tienen efectos tróficos.

Con toda esta información podemos sugerir que la hipertrofia observada en la arteria aorta de ratas tratadas con Ang II, es el resultado de los diversos efectos que produce el péptido en cada una de las capas que conforman a las arterias, sin embargo lo que llama la atención es el hecho de que este efecto solo se visualice en la arteria aorta y no en la caudal. En un intento por tratar de explicar esta diferencia, es importante recordar que en la arteria aorta el receptor que se encuentra en mayor proporción es el receptor α_{1D} -adrenérgico, y es este receptor el responsable de la contracción frente a estímulos adrenérgicos, en contraste en la arteria caudal, el receptor involucrado en la contracción es principalmente por el receptor α_{1A} -adrenérgico, mientras que los receptores α_{1D} -adrenérgicos tienen poca participación durante la contracción, sin embargo a pesar de que este receptor se encuentra expresado tanto a nivel RNAm como la proteína, desconocemos su localización intracelular y esto puede ser importante para la función.

En este sentido, el grupo de Dianne Perez y Michael Piascik describieron que al menos en fibroblastos transfectados (Rat 1), los receptores α_1 -adrenérgicos (α_{1B} - y α_{1D} -) exhiben diferente distribución dentro de las células, y mostraron que una proporción considerable de receptores α_{1D} -adrenérgicos se encontraba a nivel perinuclear (McCune *et al.*, 2000) es decir, que estos receptores se encuentran en el interior de las células, en donde muy probablemente no puede ejercer su función, es por ello que a pesar de que el receptor α_{1D} -adrenérgico tenga efectos tróficos y esté presente en el vaso, no se produzcan eventos que lleven al remodelamiento vascular en la arteria caudal.

En otras palabras, nuestros datos hacen sugerir que la hipertrofia vascular producida por la Ang II en la arteria aorta, puede estar mediada en gran parte por activación nerviosa simpática o por alguna otra vía que promueva la activación del sistema adrenérgico en especial a la activación de los receptores α_{1D} -adrenérgicos, los cuales se sabe que tiene un papel preponderante en el desarrollo de la hipertrofia vascular.

A pesar de que se ha incrementado de manera considerable nuestro conocimiento sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de la hipertensión, aun no conocemos todo. Lo que sí se sabe es que, múltiples factores (algunos conocidos y seguramente otros aun desconocidos) participan en la patogénesis de la HA. Las evidencias indican que en la vasculatura periférica existen anormalidades intrínsecas que pueden, por sí solas, explicar el aumento de la resistencia.

En este sentido la HA es una enfermedad vascular, sin embargo también es cierto que muchas de estas anormalidades vasculares parecen ser cambios adaptativos que permiten al sistema vascular mantener una presión arterial elevada más convenientemente. Esto sugiere, en cierto modo, una paradoja: las alteraciones vasculares son tanto la causa como la consecuencia de la presión arterial elevada (Risler *et al.*, 2002) y visto de esta manera hace sentido con la controversia en torno al origen de la HA tomando en cuenta los cambios en la vasculatura. Por ejemplo, se ha sugerido que las anormalidades en la microvasculatura ocurren en

etapas tempranas durante el desarrollo de la hipertensión en humanos y han sido detectadas en individuos con predisposición familiar a padecer hipertensión, aún si ellos son normotensos (Antonios *et al.*, 2003).

Estudios con modelos matemáticos sugieren que el grado de rarefacción y remodelamiento puede causar incrementos significativos en la resistencia periférica y puede amplificar y estabilizar un incremento inicial en el flujo de presión, el cual conduce a un círculo vicioso que termina en hipertensión (Levy *et al.*, 2008).

7.3 Reactividad Vascular

Con el propósito de investigar el efecto de la Ang II sobre la sensibilidad en respuesta a los agonistas α_1 -adrenérgicos, en las arterias aorta y caudal de ratas, se realizaron estudios funcionales *in vitro*, detectando marcadas diferencias en la sensibilidad de los vasos sanguíneos (aorta y caudal) en la respuesta contráctil a los agonistas α_1 -adrenérgicos, fenilefrina y A61603.

Diversos datos han mostrado que las diferencias en la sensibilidad en los vasos, es debida a mecanismos locales que influyen en su efecto o a la concentración del agonista en los sitios de acción.

Entre los factores que pudieran influir en el efecto contráctil están las sustancias relajantes o contráctiles producidas por el endotelio (Furchgott & Zawadzki, 1980; Ibarra *et al.*, 1995), a la densidad de inervación adrenérgica, así como a la cantidad o subtipos de receptores (β -, α_1 - α_2 -adrenoceptores) presentes en el músculo liso vascular.

Es importante hacer notar que en el presente estudio se excluyó la participación del endotelio vascular y de los receptores β - y α_2 -adrenérgicos, con la finalidad de

determinar el efecto de la Ang II sobre la contracción producida por la estimulación de los subtipos α_1 -adrenérgicos en la vasculatura con relación a la sensibilidad de las arterias frente a los agonistas adrenérgicos.

Bajo estas condiciones, la fenilefrina y el A61603, provocaron la contracción de las arterias aorta y caudal de ratas controles y tratadas con Ang II, aunque se encontraron diferencias regionales en la potencia de los agonistas utilizados. Los valores de sensibilidad a fenilefrina en la arteria aorta son altos para los 2 grupos (pD_2 control 8.14 ± 0.13 , Ang II 7.96 ± 0.01) y baja en la arteria caudal (pD_2 control 6.07 ± 0.05 , Ang II 6.01 ± 0.09) mientras que los valores de sensibilidad para el A61603 en la arteria aorta fueron bajos (pD_2 control 6.84 ± 0.14 , Ang II 6.77 ± 0.06) y altos para la arteria caudal (pD_2 control 8.23 ± 0.05 , Ang II 8.58 ± 0.06)

Estos datos hacen evidente que la Ang II no modifica la sensibilidad a los agonistas en ninguno de los lechos vasculares analizados, lo que nos sugiere que la respuesta adrenérgica está mediada por el mismo subtipo de receptor es decir, que la Ang II no cambia la expresión funcional en la arteria aorta ni en la arteria caudal.

Los valores obtenidos de pD_2 nos permiten apreciar las diferencias regionales en la sensibilidad de la respuesta al agonista, mostrando el siguiente orden de potencia a la fenilefrina: aorta>caudal, mientras que para el A61603 se observó el patrón contrario: caudal>aorta. Estos órdenes de potencia observados para fenilefrina y para A61603, fueron similares a los reportados por nuestro grupo (Ibarra *et al.*, 1998; Pares-Hipolito *et al.*, 2006) y otros autores para noradrenalina (Buckner *et al.*, 1996; Muramatsu *et al.*, 1998). En este sentido, evidencias experimentales muestran que los subtipos de receptores α_1 -adrenérgico clonados, tiene diferente afinidad por los agonistas adrenérgicos (Minneman *et al.*, 1994; Ibarra, 2000).

En estudios funcionales las diferencias en la potencia (pD_2) a los agonistas α_1 -adrenérgicos, están directamente relacionadas con la afinidad por el subtipo de receptor α_1 -adrenérgico que predomina en el tejido (Oriowo *et al.*, 1987; Minneman *et al.*, 1994), es decir, las diferencias son debidas a la expresión característica o distintiva de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos sobre cada lecho vascular. Además, existen datos en la literatura que proponen que las diferencias regionales en la sensibilidad a la noradrenalina en la aorta de conejo, están relacionadas con variaciones en la afinidad por un mismo receptor (Bevan *et al.*, 1986).

Otros grupos sugieren que estas diferencias regionales en potencia (pD_2) de los agonistas α_1 -adrenérgicos como la noradrenalina, son el resultado no solo de las diferencias en la o las poblaciones de receptores, sino también de la densidad de los diferentes subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en las arterias de conejo (Takayanagi *et al.*, 1991; Satoh *et al.*, 1998), o a la presencia de receptores de reserva (Ruffolo, 1982).

Esta información hace inferir, que la correlación existente entre la afinidad a diferentes agonistas α_1 -adrenérgicos obtenida mediante estudios de unión en receptores clonados y la sensibilidad obtenida en estudios funcionales en distintos tejidos, indica que las diferencias regionales en la sensibilidad a los agonistas son el resultado de diferencias en la población de receptores α_1 -adrenérgicos presentes en estos vasos (Ibarra *et al.*, 2000).

En conjunto, nuestros datos y los de otros grupos confirman que, la diversidad en la respuesta fisiológica por estimulación con los agonistas adrenérgicos, es un reflejo de la expresión diferencial de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos que se encuentran funcionales en las arterias, con la finalidad de contribuir de manera adecuada con los requerimientos regionales en el flujo para mantener la homeostasis.

Por otro lado, diversos grupos han reportado que en las arterias de rata, se han detectado los RNAm de los 3 subtipos receptores α_1 -adrenérgicos (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}) (Piascik *et al.*, 1994; Scofield *et al.*, 1995); sin embargo, al realizar estudios de unión con radioligandos, así como en estudios funcionales o utilizando anticuerpos específicos contra estos receptores, se observó que sólo uno o dos de los receptores α_1 -adrenérgicos predominan o permanecen funcionales durante la contracción del músculo liso vascular (Piascik *et al.*, 1995; Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha reportado que la aorta de rata adulta expresa funcionalmente al receptor α_{1D} -adrenérgico, mientras que en la arteria caudal, por varios años se describió que el receptor funcional era α_{1A} , sin embargo estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron, que la contracción producida por agonistas α_1 -adrenérgicos en la arteria caudal, es mediada por α_{1A} y α_{1B} , aunque la contracción sea preferentemente por el receptor α_{1A} -adrenérgico (Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Pares-Hipolito *et al.*, 2006).

En la arteria aorta, los valores de pD_2 y son similares al valor de afinidad descrito en la literatura para noradrenalina en células transfectadas con el receptor α_{1D} -adrenérgico (Horie *et al.*, 1995), además en estudios funcionales también muestran que la noradrenalina y la fenilefrina tienen cierta selectividad por este subtipo de receptor, de manera que podemos sugerir que el receptor α_1 -adrenérgico involucrado en la contracción de la arteria aorta es preferentemente el receptor α_{1D} -adrenérgico (Minneman *et al.*, 1994; Ibarra *et al.*, 1998; Gomez-Zamudio *et al.*, 2002; Gomez-Zamudio & Villalobos-Molina, 2009).

De manera interesante, observamos que la reactividad vascular, expresada como efecto máximo (E_{max}), en la arteria aorta, inducida por los agonistas fenilefrina y a dosis altas de A61603, se ve incrementada en un 40% en los animales tratados con Ang II, es decir, observamos un evidente aumento en la reactividad vascular.

En este sentido, recordemos que la hiperreactividad está dada un aumento en la sensibilidad al agonista y/o un aumento en el E_{max} , como se muestra en nuestros resultados. El parámetro E_{max} es totalmente dependiente de la eficacia del agonista (es decir, la capacidad del agonista para producir un cambio en el receptor), de la densidad de receptores (cantidad de receptores) y de la eficiencia del sistema biológico o propiedades transduccionales de un tejido, para convertir el estímulo del receptor en una respuesta tisular (Kenakin, 2004).

De manera que, si en nuestros datos la sensibilidad o la potencia de los agonistas no se modifica con la Ang II y la respuesta contráctil en la arteria aorta, parece estar mediada por los receptores α_{1D} -adrenérgicos, asumíamos que las propiedades transduccionales del tejido, la eficiencia del acoplamiento estímulo-respuesta y la eficacia del agonista no se alteraban con el tratamiento con Ang II, de manera que el aumento en el E_{max} en la arteria aorta de animales tratados con Ang II, eran debidas a un incremento en la densidad de receptores α_{1D} -adrenérgicos de manera que parecía ser cierta nuestra hipótesis, es decir, que la Ang II iba a favorecer la expresión en número de receptores α_{1D} -adrenérgicos y que este aumento se reflejaría como hiperreactividad vascular.

Sin embargo, al analizar si el aumento en el efecto contráctil, es decir, la reactividad vascular en la arteria aorta producido por la Ang II, era debido a un efecto mediado por receptores, realizamos experimentos de contracción con KCl (80 mM), recordemos que en las células de músculo liso, las concentraciones altas de potasio (K^+) inducen la despolarización de la membrana y activan a canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje produciendo así la contracción del vaso (Izzo JL, 2008), y observamos que el KCl también produce un aumento en la contracción de un 40 % en aortas de animales tratados con Ang II, es decir, observamos el mismo incremento en la reactividad que cuando inducimos la contracción por estimulación de receptores.

Este evento, junto con la hipertrofia observada en el análisis histológico, nos hacen suponer que quizá bajo estas condiciones, el aumento en la reactividad vascular observada en la arteria aorta no es debida a un aumento en el número de receptores α_{1D} -adrenérgicos.

En estos mismo experimentos, observamos que los cotratamientos con el losartán (antagonista AT_1) y con el BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adrenérgico), previenen el desarrollo de la hiperreactividad en animales tratados con Ang II, observándose contracciones con KCl (80mM) en las aortas similares a las del grupo control.

En el caso de los animales tratados con losartán, la inhibición de la hiperreactividad en la arteria aorta por Ang II, no es sorprendente, pues éste compuesto presenta alta afinidad por el receptor AT_1 [Ki 10nM (Garcia-Sainz *et al.*, 1997); pA2 9 (Zwart *et al.*, 1998)] y es en este receptor donde se inicia la cascada de eventos celulares que llevan a la hiperreactividad e hipertrofia en este lecho vascular.

En otras palabras, el losartán evitó el desarrollo del remodelamiento vascular en la arteria aorta de animales tratados con Ang II y con ello se evitó la hiperreactividad vascular en este lecho. En el mismo sentido, el tratamiento con el BMY 7378 evitó completamente la hiperreactividad determinada por contracción con KCl; sin embargo, recordemos el análisis histológico en donde el BMY 7378, fue capaz de evitar el desarrollo de la hipertrofia vascular, y es probable que esta sea la razón por la que no observamos el aumento en la reactividad vascular en ratas con tratamiento con BMY 7378.

En el caso de la arteria caudal, tampoco se modificó la sensibilidad a los agonistas adrenérgicos, sin embargo, a diferencia de la arteria aorta, en la arteria caudal no se ve alterada la reactividad vascular (E_{max}) por el tratamiento con Ang II. Los valores de potencia bajos a fenilefrina y altos para A61603, nos hacen sugerir que

bajo nuestras condiciones experimentales, en la arteria caudal el principal receptor involucrado en la contracción frente a agonistas adrenérgicos es el receptor α_{1A} -adrenérgico; estos valores están de acuerdo a los reportados por nuestro grupo (Pares-Hipolito *et al.*, 2006).

En ese mismo reporte demostramos que en la arteria caudal, los receptores α_{1A} - y α_{1B} -adrenérgico están involucrados en la contracción, aunque el receptor α_{1B} -adrenérgico tiene un papel secundario sin embargo, otros autores que han sugerido que es la mezcla de receptores α_{1A} - y α_{1D} -adrenérgicos son los responsables de la contracción de la arteria caudal (Kamikihara *et al.*, 2007).

En un intento por tratar de explicar cuál es la razón por la que en la arteria caudal no se desarrolla la hipertrofia, ni la hiperreactividad vascular con el tratamiento con Ang II, pensemos en los datos previos reportados por nuestro grupo (Pares-Hipolito *et al.*, 2006) y los valores generados en este proyecto de afinidad aparente en la arteria caudal por los agonistas fenilefrina y A61603 (pD₂) así como por los antagonistas BMY 7378 y RS 100329 (pA₂ o pK_B) (ver en la siguiente sección), de manera que podemos sugerir que los receptores que se encuentran funcionales en este lecho vascular son los receptores α_{1A} - y α_{1B} -adrenérgicos.

Es importante hacer notar que el grupo de D´Ocon reportó, que a nivel de RNAm, los 3 subtipos de receptores α_1 -adrenérgico se encuentran presentes en la arteria caudal (61.7% para el receptor α_{1A} -adrenérgico, 27.2 % para el receptor α_{1D} -adrenérgico y 11.1% para el receptor α_{1B} -adrenérgico) (Marti *et al.*, 2005); sin embargo, a pesar de que el receptor α_{1D} -adrenérgico se encuentre en ésta arteria, parece no estar funcional, y esto es realmente importante, pues gran parte del efecto de hipertrofia e hiperreactividad vascular producido por la Ang II, parece ser debida a la interacción (comunicación cruzada “cross talk”) del sistema renina angiotensina con el sistema adrenérgico, involucrando de manera específica al receptor α_{1D} -adrenérgico; en otras palabras, nuestros datos sugieren, que en los

lechos vasculares donde la respuesta funcional esté mediada de manera parcial o de manera importante por el receptor α_{1D} -adrenérgico, como en el caso de la arteria aorta, la Ang II será capaz de producir efectos tróficos (hipertrofia) que conlleven a un aumento en la reactividad del vaso, mientras que en los lechos vasculares en donde el receptor funcional en la respuesta contráctil es diferente al receptor α_{1D} -adrenérgico, la Ang II parece no favorecer el remodelamiento ni aumentar la reactividad vascular.

Efectos similares a los observados en la arteria aorta han sido reportados para otros lechos vasculares en donde el receptor α_{1D} -adrenérgico tiene un papel funcional, como en el caso de la arteria carótida (van Kleef *et al.*, 1992) o en vasos grandes y pequeños (de resistencia) del lecho mesentérico (Illyes *et al.*, 2000) aunque es importante señalar que en el caso de los vasos pequeños del mesenterio, es el receptor α_{1A} -adrenérgico quien media principalmente la contracción, sin embargo el receptor α_{1D} -adrenérgico también participa en esta función aunque su papel sea menor; sin embargo, éste receptor también se encuentra de manera funcional en estos vasos.

7.4 Caracterización de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en las arterias aorta y caudal de ratas con y sin tratamiento con Ang II

Los datos de sensibilidad a los agonistas adrenérgicos, sobre las arterias aorta y caudal de animales controles y tratados con Ang II, mostraron que el péptido no modificó la respuesta funcional, sin embargo con el propósito de caracterizar cual es el receptor α_1 -adrenérgico involucrado en la respuesta contráctil producida por fenilefrina y A61603 en las arterias aorta y caudal, se llevó a cabo con la construcción de curvas concentración-respuesta a fenilefrina y a A61603 en presencia y ausencia de los antagonistas competitivos BMY 7378 y RS 100329.

El uso de antagonistas, es una poderosa herramienta para la subclasificación farmacológica de receptores, ya que la afinidad del antagonista, es la propiedad que gobierna su interacción con el receptor (Kenakin, 1984; Drew, 1985). En este sentido, se ha descrito al BMY 7378 como un antagonista α_{1D} -adrenérgico, y lo utilizamos en un rango de concentraciones desde 1-1000nM, para cubrir las afinidades descritas de cada subtipo de receptor: α_{1D} -AR [$pK_B \sim 8.7$; (Kenny *et al.*, 1995; Testa *et al.*, 1995; Satoh *et al.*, 1998; Daly *et al.*, 2002; Tanoue *et al.*, 2002; Deighan *et al.*, 2005)], mientras que la afinidad por α_{1A} -AR [$pK_B \sim 6.6$; (Lachnit *et al.*, 1997; Zacharia *et al.*, 2004; Deighan *et al.*, 2005)] y por α_{1B} -AR [$pK_B \sim 6.2$ (Pares-Hipolito *et al.*, 2006)].

En el caso del RS 100329, este agente se ha descrito como un antagonista α_{1A} -adrenérgico, y de igual manera lo utilizamos en un rango de concentraciones desde 0.31-31.6nM, cubriendo las afinidades de los receptores α_1 -adrenérgicos: α_{1A} -AR [$pK_B \sim 9.6$], α_{1B} -AR [$pK_B \sim 7.8$] y α_{1D} -AR [$pK_B \sim 7.9$] (Williams *et al.*, 1999; Pares-Hipolito *et al.*, 2006) .

En relación a la arteria aorta de animales controles como los tratados con Ang II, el BMY 7378 desplazó a la derecha la respuesta contráctil a la fenilefrina y al A61603 con alta afinidad (con valores de pA_2 o pK_B entre 8.39-9.11; Tabla 3), además, en todos los casos las curvas alcanzaron el 100% del E_{max} y su desplazamiento es paralelo a las curvas control, lo cual es un comportamiento característico de un antagonista competitivo.

Como dato adicional, en la mayoría de los casos las pendientes de Schild fueron cercanas a la unidad, sugiriendo que una sola población de receptores está mediando la contracción y que bajo nuestras condiciones se llegó al equilibrio entre los complejos que se forman con el receptor y el agonista o el antagonista (Kenakin, 2004). Solo en el caso donde el valor de la pendiente fue diferente de 1, se calculó el pK_B .

Por otro lado, en este mismo lecho vascular (en la arteria aorta), el RS 100329 desplazó la respuesta contráctil a los agonistas adrenérgicos, A61603 y fenilefrina, de manera dependiente de la concentración obteniendo valores de afinidad (pA_2 o pK_B) entre 8.5 y 8.9; estos valores son cercanos a los valores reportados para el receptor α_{1D} -adrenérgico.

Con nuestros datos concluimos que, la alta afinidad por BMY 7378, y los valores de afinidad para el RS100329, indican que el receptor involucrado en la contracción de la arteria aorta, es el receptor α_{1D} -adrenérgico, tanto en animales controles como en animales tratados con Ang II.

En este sentido, estos datos están de acuerdo con estudios previos en donde ya habían reportado que en la aorta de rata adulta se expresa de manera funcional al receptor α_{1D} -adrenérgico (Kenny *et al.*, 1995; Piascik *et al.*, 1995; Testa *et al.*, 1995; Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Godinez-Hernandez *et al.*, 2006).

Por otra parte, el tratamiento con Ang II no modifica la expresión funcional, de manera que el receptor α_{1D} -adrenérgico está involucrado en la contracción a la fenilefrina y al A61603 en la arteria aorta en los 2 grupos (control y Ang II), a pesar de que el péptido incrementó en E_{max} en un 40% con los agonistas adrenérgicos y con KCl, aunque como ya habíamos mencionado, las aortas de animales tratados con Ang II mostraron desarrollo de hipertrofia vascular, sin embargo con estos datos aun teníamos que comprobar que el tratamiento con Ang II pudiera modificar la expresión de receptores α_{1D} -adrenérgicos produciendo un aumento en la densidad de estos.

En el caso de la arteria caudal de animales controles como los tratados con Ang II, los valores de afinidad aparente (pK_B) para los antagonistas BMY 7378 fueron bajos y altos para el RS100329, sin importar cual fuera el agonista utilizado (fenilefrina y A61603) (Tabla 4), indicando que el receptor α_{1D} -adrenérgico no se

encuentra presente de manera funcional en este vaso, además las pendientes de Schild fueron diferentes de 1, sugiriendo que en la arteria caudal existe una población heterogénea de receptores α_1 -adrenérgicos, es decir que hay más de un subtipo de receptores α_1 -adrenérgicos mediando la contracción.

Datos similares fueron obtenidos por nuestro grupo (Pares-Hipolito *et al.*, 2006), en donde se sugiere que esta población heterogénea de receptores α_1 -adrenérgicos presente en la arteria caudal, está constituida por los subtipos α_{1A} - y α_{1B} -adrenérgicos. Sin embargo, datos contrarios reportados por el grupo de Pupo (Kamikihara *et al.*, 2007) quienes sugieren que en la región proximal de la arteria caudal de ratas el valor de afinidad por el BMY 7378 era de 8.45 indicando que el receptor α_{1D} -adrenérgico se encontraba funcional en este lecho vascular.

Nuestros datos apoyan la observación de Pares-Hipolito (2006), no solo porque los datos de afinidad aparente (pK_B) por el BMY 7378 fueron bajos, sino también por el hecho de que la Ang II no causó hipertrofia vascular, recordemos que la aparente comunicación (cross-talk) entre el sistema renina angiotensina y el sistema adrenérgico, al menos en el remodelamiento vascular, parece involucrar al receptor α_{1D} -adrenérgicos.

Por otro lado, el tratamiento con Ang II tampoco modificó la expresión funcional en la arteria caudal, de manera que en la arteria caudal de animales controles y animales tratados con Ang II, las mismas poblaciones de receptores α_1 -adrenérgico (α_{1A} - y α_{1B} -adrenérgicos) están involucradas en la contracción a la fenilefrina y al A61603.

7.5 Expresión de RNAm y proteína de los receptores α_1 -adrenérgicos y su relación con la Ang II.

Algunos reportes en la literatura describen que durante la HA se presenta hiperreactividad a diferentes agentes contráctiles, incluidos los adrenérgicos, y se ha propuesto que la hiperreactividad a la noradrenalina está relacionada con el aumento en la resistencia vascular periférica durante la HA (Takata & Kato, 1996), por otro lado, el subtipo α_{1D} -adrenérgico tiene mayor afinidad por la noradrenalina, y se ha descrito a este receptor como el principal involucrado en la contracción en la aorta y en la carótida, y participa en la contracción de arterias mesentéricas (tejido que coexpresa de manera funcional a los receptores α_{1A} - y α_{1D} -), es por esto que se ha sugerido que este receptor podría ser responsable de la hiperreactividad del músculo liso vascular en la HA.

Por el contrario, la arteria caudal de ratas SHR fue hiporreactiva a la noradrenalina, fenómeno que pueda estar relacionado con la activación del subtipo α_{1A} - presente en esta arteria (Lachnit *et al.*, 1997; Piascik *et al.*, 1997) , o quizá a la ausencia funcional del receptor α_{1D} -adrenérgico.

Estos datos plantearon la posibilidad de que los mecanismos que conducen a la hipertensión o la hipertensión *per se*, afecten de manera diferencial a la actividad del los subtipos α_1 -adrenérgicos en los vasos sanguíneos, en este sentido, se ha propuesto que los receptores α_1 - podrían jugar diferentes papeles durante la contracción del músculo liso vascular y/o tener una influencia moduladora sobre esta función (Hrometz *et al.*, 1999).

Por otro lado, desde hace una década, se sugirió que la hiperreactividad a la noradrenalina observada en la aorta y la arteria carótida en ratas SHR podría estar relacionada con el aumento en la afinidad o en el número de receptores α_{1D} -adrenérgicos o en los eventos transduccionales asociados con este receptor

(Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Ibarra, 2000; Gisbert *et al.*, 2002), además varios trabajos hacen sugerir que este receptor esté asociado en la génesis y/o el mantenimiento de la hipertensión, basados en el hecho de que este receptor sólo se encuentra en vasos sanguíneos (Piascik *et al.*, 1994; Piascik *et al.*, 1995; Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Villalobos-Molina *et al.*, 1997).

Se encuentra presente en la vasculatura de ratas prehipertensas (ratas jóvenes SHR en donde la HA aun no está establecida) (Villalobos-Molina & Ibarra, 1999; Villalobos-Molina *et al.*, 1999), participa en el mantenimiento del tono presor y aparece con la edad (Zhou & Vargas, 1996; Ibarra *et al.*, 1997; Villalobos-Molina *et al.*, 1999), así como la existencia de una población de receptores α_{1D} -adrenérgicos constitutivamente activa en vasos de ratas SHR (Gisbert *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2002), además su ausencia en el modelo de ratones knockout α_{1D}^- , produce animales hipotensos (Tanoue *et al.*, 2002).

De manera adicional, datos sugieren que hay un incremento en las respuestas vasculares a la Ang II, que hay un mayor número de receptores para Ang II coexistiendo con el incremento en la densidad de receptores α_1 -adrenérgicos en arterias mesentéricas de ratas SHR de 4 semanas de edad (Schiffirin *et al.*, 1984), y años más tarde, nuestro grupo reportó la hipótesis de que la Ang II favorece la expresión de receptores α_{1D} -adrenérgicos en la vasculatura, y que este evento pudiera estar relacionado con la génesis y el mantenimiento de la hipertensión (Villalobos-Molina & Ibarra, 2005) y que las ratas SHR de 4 semanas de edad la expresión de RNAm que codifica para el receptor α_{1D} -adrenérgico así como la proteína se encuentra en mayor proporción que en la aortas de ratas WKY (Godínez-Hernández *et al.*, 2006).

En este sentido, se ha reportado que los ratones knockout para el receptor de hidrocarburos aromáticos (ratones AhR^{-/-}) presentaba HA, niveles elevados de Ang II plasmática e hipertrofia cardíaca (Lund *et al.*, 2003) haciendo de este ratón, un

modelo ideal para la evaluación de la hipótesis anterior, y más tarde demostramos que estos animales mostraban un incremento en la expresión de los receptores α_{1D} -adrenérgicos, y que este efecto estaba asociado a los altos niveles de Ang II, de manera que estos 2 eventos participen en la generación de la HA, ya que el tratamiento con captopril, disminuye los niveles de presión arterial, así como la expresión y la función de receptores α_{1D} -adrenérgicos (Villalobos-Molina *et al.*, 2008).

A pesar de toda esta información, en el presente trabajo encontramos que al final de las 2 semanas de tratamiento, la expresión de receptores α_{1D} -adrenérgicos en las aortas de animales tratados con Ang II, se encontraba disminuida tanto a nivel del RNAm que codifica para este receptor (determinada por RT-PCR), como de proteína (determinada por inmunodetección) en comparación con el grupo control.

En un intento por explicar estos hallazgos, determinamos los niveles plasmáticos de Ang II a las 2 semanas de tratamiento, con la finalidad de verificar si las bombas osmóticas funcionaban de manera adecuada hasta el final del experimento, y encontramos que los animales implantados tenían niveles muy superiores al grupo control (38.3 veces más que los animales control, Figura 2).

Estos datos no correlacionan con los datos reportados en la literatura; de manera que supusimos que realizando un curso temporal podríamos encontrar en algún momento del tratamiento, un incremento en la expresión o en los niveles de receptores α_{1D} -adrenérgicos en las aortas de animales tratados con Ang II, sin embargo encontramos, que desde las 24hr de infusión con Ang II, la expresión y la proporción de receptores α_{1D} -adrenérgicos se encontraba disminuida en comparación con las aortas de ratas control, mientras que la expresión de RNAm y proteína de los subtipos α_{1A} - y α_{1B} -adrenérgicos, no se ve modificada por el tratamiento con la Ang II en ninguno de los tiempos evaluados.

Como se puede apreciar, los resultados obtenidos no estaban de acuerdo con los datos que nosotros mismos habíamos reportado sobre ratones AhR^{-/-}; sin embargo, debemos de tomar en cuenta que, este ratón fue modificado genéticamente para noquear un receptor que media efectos de toxicidad a agentes ambientales y que por algún razón aún desconocida, presenta niveles elevados de presión arterial, Ang II y endotelina, es decir, desconocemos cuantos y/o cuales mecanismos estén alterados en esos animales para compensar la ausencia del receptor AhR, además que no se sabía siquiera que este receptor estuviera involucrado en el control cardiovascular.

En otro modelo, el grupo de Hoffman reportó que, en células aisladas de músculo liso vascular (CMLV) de ratas Sprague-Dawley, un estímulo con Ang II (100nM) induce un incremento en la expresión de receptores α_{1D} -adrenérgicos, y que este efecto era dependiente del tiempo; sin embargo, este efecto no solo se observó a nivel de RNAm, ya que en estudios de unión, utilizando prazosina (antagonista no selectivo α_1 -adrenérgico) marcada, también se observó que la Ang II produce un aumento en el número de receptores α_1 -adrenérgicos, además la gráfica de Scatchard mostró una relación lineal, lo que sugiere que una sola población de receptores se ve incrementada en número por el tratamiento con Ang II, y que este aumento se lleva a cabo por síntesis de *ново* (Hu *et al.*, 1995).

En este sentido, datos similares obtuvimos en el presente trabajo en CMLV aisladas de ratas Wistar, en donde la Ang II (100nM) incrementó la proporción de receptores α_{1D} -adrenérgicos (2.73 veces más que el control) en los primeros 30 minutos de estimulación, efecto que se disminuye con el paso del tiempo, además esta expresión máxima fue bloqueada por un pretratamiento con losartán (antagonista AT₁) o cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteína), sugiriendo que los receptores AT₁ son los responsables del incremento en la proporción de receptores α_{1D} -adrenérgicos en CMLV y que este efecto es debido a síntesis de *ново*.

En esta misma serie de experimentos, también encontramos cambios bifásicos dependientes del tiempo, con la proporción de receptores α_{1A} -adrenérgicos, en donde observamos una disminución a tiempos cortos que posteriormente es revertida hasta alcanzar valores basales, mientras que el receptor α_{1B} -adrenérgico no se ve modificado por el estímulo con Ang II.

En contraposición con esos resultados, Clements y Faber reportaron que en CMLV la Ang II (0.3, 1 y 3 nM) produjo una disminución en la expresión del RNAm que codifica para los receptores α_{1B} - y α_{1D} -adrenérgicos después de 3 horas de exposición; sin embargo, al igual que nosotros, estos eventos fueron inhibidos por el losartán, sugiriendo que este efecto era mediado por estimulación de receptores AT_1 (Clements & Faber, 1997).

Nuestros resultados, junto con los reportados por otros grupos, hacen evidente la mutua interacción entre el sistema renina angiotensina y la vía adrenérgica, en donde la Ang II produce efectos directos e indirectos, y éstos últimos a través de receptores α_1 -adrenérgicos, sin embargo las diferencias en la expresión de los 3 subtipos α_1 -adrenérgicos pueden ser debidas a varios factores que van desde la especie, la cepa, el género, la edad del individuo bajo estudio, el modelo de hipertensión utilizado, el tejido analizado así como las poblaciones de receptores presentes en él, si los datos son obtenidos a partir de experimentos *in vivo*, *in situ* o *in vitro*, y si se realizan en cultivos celulares el tipo celular empleado, entre otras, es decir, con frecuencia no es fácil correlacionar los datos de un sistema aislado, con datos obtenidos en un animal íntegro, en donde tenemos la participación de múltiples sistemas (centrales y/o humorales), que intentarán compensar las alteraciones que estamos generando con el modelo.

7.6 Catabolismo de Ang II y efectos de sus metabolitos

El concepto “clásico” del relativamente simple sistema renina angiotensina (SRA) circulante, con el angiotensinógeno generado en el hígado, el cual es hidrolizado por la renina producida por los riñones para dar Ang I, la cual a su vez es convertida en la Ang II por la ECA, en donde el principal efector sistema es la Ang II, péptido que actúa sobre sus receptores AT₁ y AT₂. Sin embargo, con la creciente información generada en torno a este sistema, hoy sabemos que existen SRA locales en diversos órganos como el corazón, los riñones, el cerebro, en las glándulas adrenales y en la vasculatura, cabe señalar que en las 3 capas que conforman a los vasos sanguíneos, se han encontrado componentes del SRA (Mehta & Griendling, 2007; Fyhrquist & Saijonmaa, 2008), de hecho existen reportes que sugieren la existencia de SRA intracelulares (Kumar *et al.*, 2007), además que esta no es la única vía de síntesis de Ang II, pues se han descrito vías alternas como la de la catepsina G, la vía de las quimasas y algunas otras carboxipeptidasas.

Por otro lado, actualmente sabemos que la Ang II no es el único componente activo del sistema, ya que se han identificado enzimas como la aminopeptidasa A, aminopeptidasa N, la endopeptidasa neutra y la ECA₂ (Figura 2), que participan en el catabolismo de Ang II y producen péptidos activos que pueden estimular a receptores específicos, produciendo efectos similares o distintos a los producidos por la Ang II (Kramkowski *et al.*, 2006; Fyhrquist & Saijonmaa, 2008), así tenemos a la Ang II y a la Ang III (heptapéptido angiotensina 2-8) que pueden estimular con la misma afinidad a receptores AT₁ y AT₂, de manera que la Ang III produce vasoconstricción, estimulación de sistema nervioso simpático, liberación de aldosterona, efectos hipertróficos, etc. a través de la estimulación de receptores AT₁.

El péptido Ang IV (hexapéptido angiotensina 3-8), que interactúa con su receptor AT₄ también llamado como IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina), para producir la activación del factor NFκB así como la expresión de moléculas proinflamatorias (PAI-1, MCP-1, ICAM-1, IL-6, TNFα) (Kerins *et al.*, 1995; Chai *et al.*, 2004), es por ello que se ha asociado en la vasculatura en procesos de hipertrofia y en la generación de placas ateromatosas, es por ello que la Ang IV juega un papel importante en la fisiopatología cardiovascular (Savoia & Schiffrin, 2006; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007).

Un péptido del sistema que ha cobrado gran interés es la Ang 1-7, debido a que este metabolito tiene acciones opuestas a las generadas por Ang II. Esta angiotensina se une a su receptor Mas para mediar efectos como vasodilatación, efectos antihipertróficos, antifibróticos y antitrombóticos, además amplifica la vasodilatación generada por bradicinina y produce mejoramiento de la función endotelial (Ferrario, 2006; Santos *et al.*, 2006) por ello, se ha propuesto que la Ang 1-7 parece jugar un papel de contrabalance de varias de las acciones de la Ang II (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Con toda esta información, en el presente trabajo decidimos investigar si la infusión con Ang II, así como los tratamientos con losartán y BMY 7378 modificaban las concentraciones plasmáticas de los metabolitos Ang III, Ang IV y Ang 1-7, con la finalidad de tratar de determinar si alguno de estos metabolitos se ve modificado por el tratamiento y pudiera estar involucrado en la generación de la hipertrofia vascular observada en las aortas de animales tratados con Ang II.

Encontramos que los animales con infusión de Ang II, presentan niveles elevados de Ang III y Ang IV, así como la disminución en los niveles de Ang 1-7 en comparación con el grupo control, estos datos nos sugieren que los niveles elevados de Ang II, activan las vías de degradación del sistema y que probablemente, parte de los efectos producidos por el tratamiento con Ang

II, son debidos al incremento de la Ang III y Ang IV que ahora sabemos que pueden participar en procesos de hipertrofia, aunado a estos eventos, la disminuci3n de la Ang 1-7 tambi3n podr3a favorecer el proceso de hipertrofia, pues recordemos que este p3ptido se ha asociado por procesos antitr3ficos.

De manera interesante encontramos que los tratamientos con losart3n (antagonista AT₁) y BMY 7378 (antagonista α_{1D} -adren3rgico), disminuyen parcialmente los niveles de Ang III y Ang IV sugiriendo en el caso del losart3n que, es el receptor AT₁ quien favorece la degradaci3n de Ang II a trav3s de la v3a de las aminopeptidasas, enzimas que dan origen a la Ang III y Ang IV, mientras que en el caso del cotratamiento con BMY 7378 hace evidente la comunicaci3n entre estos dos sistemas, en donde de manera indirecta por alg3n mecanismo a3n desconocido, el receptor α_{1D} -adren3rgico tambi3n favorece la misma v3a de degradaci3n de la Ang II.

Por otro lado, en estos mismos grupos los niveles de Ang 1-7 se ven incrementados de manera considerable, sugiriendo que en casos en los que la v3a de degradaci3n de la Ang II por aminopeptidasas est3 bloqueada, se ve favorecida la v3a de ECA₂ para generar Ang 1-7 es decir, probablemente al estar inhibida la v3a de las aminopeptidasas, se vea favorecida la expresi3n y/o la actividad de la ECA₂. Estos datos inducen a la b3squeda de nuevas alternativas o estrategias para el tratamiento de la HA, en donde involucremos a inhibidores de las aminopeptidasas como nuevos blancos terap3uticos.

8 Conclusiones

1. La Ang II incrementó la presión arterial y este efecto es dependiente del tiempo.
2. La Ang II incrementó la respuesta contráctil en lechos vasculares en donde el receptor α_{1D} -adrenérgico predomina de manera funcional.
3. La Ang II no modificó al receptor α_1 -adrenérgico involucrado en la contracción de las arterias aorta y caudal.
4. La Ang II produjo hiperreactividad en la aorta y este efecto parece ser mediado, en parte, por hipertrofia de la *tunica* media de la arteria.
5. La infusión de Ang II promueve sus vías de degradación, lo que aumentó la concentración de los metabolitos Ang III y Ang IV, y la disminución de Ang 1-7. Estos metabolitos podrían favorecer la hipertrofia en la arteria aorta.
6. El antagonismo del receptor AT_1 , y el del receptor α_{1D} -adrenérgico, parecen favorecer el catabolismo de la Ang II a través de las vías alternas (aminopeptidasas y ECA2).
7. La Ang II, vía el receptor AT_1 , aumentó la síntesis de *novo*, a corto plazo, de los receptores α_{1D} -adrenérgicos en células de músculo liso vascular.
8. Se confirma la comunicación cruzada entre la Ang II y los receptores α_{1D} -adrenérgicos vasculares. Esta interacción puede explicar la hipertensión y la hipertrofia inducida por la Ang II.

9. Perspectivas

El presente trabajo hace evidente la interacción del SRA con los receptores α_{1D} -adrenérgicos sin embargo, sería interesante identificar, la vía de señalización de Ang II asociada con los fenómenos de hipertrofia e hiperreactividad vascular, y su relación con los receptores α_1 -adrenérgicos en células aisladas de aortas de ratas Wistar, identificando si existen alteraciones con las posibles proteínas de señalización involucradas en la hipertrofia celular como son la activación de Akt, S6K-1, 4EBP1 y MAPK.

Por otro lado, en animales tratados con Ang II podríamos analizar la importancia de los metabolitos Ang III y Ang IV en la generación de la hipertensión e hipertrofia vascular es decir, los datos generados en este trabajo, sugieren que existen otros blancos terapéuticos sobre el sistema SRA, que pudiesen ser útiles para la terapia antihipertensiva.

10. Bibliografía

AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM & Quitterer U. (2001). The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* **276**, 39721-39726.

Agabiti-Rosei E, Heagerty AM & Rizzoni D. (2009). Effects of antihypertensive treatment on small artery remodelling. *J Hypertens* **27**, 1107-1114.

Anthony S. Fauci EB, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, and Joseph Loscalzo,. (2006). *Harrison Principios de Medicina Interna*. México.

Antonios TF, Rattray FM, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS & MacGregor GA. (2003). Rarefaction of skin capillaries in normotensive offspring of individuals with essential hypertension. *Heart* **89**, 175-178.

Arakawa K & Urata H. (2000). Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension* **36**, 638-641.

Arevalo-Leon LE, Gallardo-Ortiz IA, Urquiza-Marin H & Villalobos-Molina R. (2003). Evidence for the role of alpha1D- and alpha1A-adrenoceptors in contraction of the rat mesenteric artery. *Vascul Pharmacol* **40**, 91-96.

Arunlakshana O & Schild HO. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* **14**, 48-58.

Assimacopoulos-Jeannet FD, Blackmore PF & Exton JH. (1982). Studies of the interaction between glucagon and alpha-adrenergic agonists in the control of hepatic glucose output. *J Biol Chem* **257**, 3759-3765.

Balcells E, Meng QC, Johnson WH, Jr., Oparil S & Dell'Italia LJ. (1997). Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol* **273**, H1769-1774.

Bevan JA, Oriowo MA & Bevan RD. (1986). Physiological variation in alpha-adrenoceptor-mediated arterial sensitivity: relation to agonist affinity. *Science* **234**, 196-197.

Boadle MC, Hughes J & Roth RH. (1969). Angiotensin accelerates catecholamine biosynthesis in sympathetically innervated tissues. *Nature* **222**, 987-988.

Buckner SA, Oheim KW, Morse PA, Knepper SM & Hancock AA. (1996). Alpha 1-adrenoceptor-induced contractility in rat aorta is mediated by the alpha 1D subtype. *Eur J Pharmacol* **297**, 241-248.

Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr. & Timmermans PB. (1991). Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* **17**, 720-721.

- Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME & Johnston CI. (2005). Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* **26**, 369-375; discussion 322-364.
- Callera G, Tostes R, Savoia C, Muscara MN & Touyz RM. (2007). Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **5**, 531-552.
- Carey RM. (2005). Update on the role of the AT2 receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**, 67-71.
- Carrillo JJ, Pediani J & Milligan G. (2003). Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins. *J Biol Chem* **278**, 42578-42587.
- Castoldi G, di Gioia CR, Travaglini C, Busca G, Redaelli S, Bombardi C & Stella A. (2007). Angiotensin II increases tissue-specific inhibitor of metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo: evidence of a pressure-independent effect. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 205-209.
- Clements ML & Faber JE. (1997). Mechanical load opposes angiotensin-mediated decrease in vascular alpha 1-adrenoceptors. *Hypertension* **29**, 1165-1172.
- Csiky B & Simon G. (1997). Effect of neonatal sympathectomy on development of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol* **272**, H648-656.
- Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA & Albiston AL. (2004). The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2728-2737.
- Chen G, Kamal M, Hannon R & Warner TD. (1998). Regulation of cyclo-oxygenase gene expression in rat smooth muscle cells by catalase. *Biochem Pharmacol* **55**, 1621-1631.
- Chen L, Xin X, Eckhart AD, Yang N & Faber JE. (1995). Regulation of vascular smooth muscle growth by alpha 1-adrenoreceptor subtypes in vitro and in situ. *J Biol Chem* **270**, 30980-30988.
- Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T & Ichikawa I. (1997). Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* **272**, F299-304.
- Chen ZJ & Minneman KP. (2005). Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 1281-1287.
- Chu KY, Lau T, Carlsson PO & Leung PS. (2006). Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* **55**, 367-374.
- D'Amore A, Black MJ & Thomas WG. (2005). The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension* **46**, 1347-1354.

- Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM & Moreau P. (2004). Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord* **4**, 6.
- Daly CJ, Deighan C, McGee A, Mennie D, Ali Z, McBride M & McGrath JC. (2002). A knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular alpha1B-adrenoceptors in mouse. *Physiol Genomics* **9**, 85-91.
- Daniels DV, Gever JR, Jasper JR, Kava MS, Lesnick JD, Meloy TD, Stepan G, Williams TJ, Clarke DE, Chang DJ & Ford AP. (1999). Human cloned alpha1A-adrenoceptor isoforms display alpha1L-adrenoceptor pharmacology in functional studies. *Eur J Pharmacol* **370**, 337-343.
- Danser AH. (1996). Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem* **157**, 211-216.
- De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM & Schiffrin EL. (2005). Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2106-2113.
- Deighan C, Methven L, Naghadeh MM, Wokoma A, Macmillan J, Daly CJ, Tanoue A, Tsujimoto G & McGrath JC. (2005). Insights into the functional roles of alpha(1)-adrenoceptor subtypes in mouse carotid arteries using knockout mice. *Br J Pharmacol* **144**, 558-565.
- Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI & Fabiani ME. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* **100**, 481-492.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE & Acton S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* **87**, E1-9.
- Drew GM. (1985). What do antagonists tell us about alpha-adrenoceptors? *Clin Sci (Lond)* **68 Suppl 10**, 15s-19s.
- Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD & Sterzel RB. (1997). Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **6**, 88-105.
- Erami C, Zhang H, Ho JG, French DM & Faber JE. (2002). Alpha(1)-adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1577-1587.
- Faber JE, Yang N & Xin X. (2001). Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 441-452.
- Feihl F, Liaudet L, Levy BI & Waeber B. (2008). Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovasc Res* **78**, 274-285.

- Ferrario CM. (2006). Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* **47**, 515-521.
- Flavahan NA & Vanhoutte PM. (1986). Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor: response coupling in canine saphenous and femoral veins. *J Pharmacol Exp Ther* **238**, 131-138.
- Folkow B. (1956). *Structural, myogenic, humoral and nervous factors controlling peripheral resistance*. Pergamon, Press, London.
- Folkow B. (1982). Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* **62**, 347-504.
- Furchgott RF. (1972). *The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory.*, vol. 33. Springer-Verlag, New York.
- Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Fuhrquist F & Saijonmaa O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* **264**, 224-236.
- Gammelgaard I, Wamberg S & Bie P. (2006). Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol (Oxf)* **188**, 129-138.
- Ganong WF. (2002). *Fisiología Médica*. México.
- Garcia-Sainz JA, Martinez-Alfaro M, Romero-Avila MT & Gonzalez-Espinosa C. (1997). Characterization of the AT1 angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver. *J Endocrinol* **154**, 133-138.
- Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J & Villalobos-Molina R. (1999). Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* **30**, 449-458.
- Garcia-Sainz JA & Villalobos-Molina R. (2004). The elusive alpha(1D)-adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *Eur J Pharmacol* **500**, 113-120.
- Geisterfer AA, Peach MJ & Owens GK. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* **62**, 749-756.
- Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD & D'Ocon P. (2000). Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **295**, 810-817.
- Gisbert R, Ziani K, Miquel R, Noguera MA, Ivorra MD, Anselmi E & D'Ocon P. (2002). Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **135**, 206-216.

Godínez-Hernández D, Gallardo-Ortiz IA, Lopez-Sanchez P & Villalobos-Molina R. (2006). Captopril therapy decreases both expression and function of alpha-adrenoceptors in pre- hypertensive rat aorta. *Auton Autacoid Pharmacol* **26**, 21-29.

Godínez Hernández D. (2002). Modulación endotelial de la contracción vascular en ratas normotensas e hipertensas durante el desarrollo: Participación del óxido nítrico y de las prostaglandinas. In *Departamento de Farmacobiología*, pp. 86. CINVESTAV, México.

Goetz AS, King HK, Ward SD, True TA, Rimele TJ & Saussy DL, Jr. (1995). BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **272**, R5-6.

Gomez-Zamudio J, Lazaro-Suarez ML, Villalobos-Molina R & Urquiza-Marin H. (2002). Evidence for the use of agonists to characterize alpha 1-adrenoceptors in isolated arteries of the rat. *Proc West Pharmacol Soc* **45**, 159-160.

Gomez-Zamudio JH & Villalobos-Molina R. (2009). Adventitia removal does not modify the alpha1D-adrenoceptors response in aorta during hypertension and ageing. *Auton Autacoid Pharmacol* **29**, 117-133.

Gonzalez-Hernandez MdL, Godínez-Hernández D, Bobadilla-Lugo RA & Lopez-Sanchez P. (2010). Angiotensin-II type 1 receptor (ATR) and alpha-1D adrenoceptor form a heterodimer during pregnancy-induced hypertension. *Auton Autacoid Pharmacol*.

Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ & Lever AF. (1991). Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* **17**, 626-635.

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

Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA & Coffman TM. (2006). Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest* **116**, 2218-2225.

Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C & Harrison DG. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* **204**, 2449-2460.

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

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

Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK & Krekler M. (2001). Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* **38**, 884-890.

- Hollenberg. (2000). *Hypertension: Mechanisms and Therapy, in Atlas of Heart Diseases*.
- Horie K, Obika K, Foglar R & Tsujimoto G. (1995). Selectivity of the imidazoline alpha-adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* **116**, 1611-1618.
- Hrometz SL, Edelmann SE, McCune DF, Olges JR, Hadley RW, Perez DM & Piascik MT. (1999). Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 452-463.
- Hu ZW, Shi XY, Okazaki M & Hoffman BB. (1995). Angiotensin II induces transcription and expression of alpha 1-adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **268**, H1006-1014.
- Ibarra BM. (2000). Caracterización de los subtipos receptores alfa1-adrenérgicos en arterias de ratas normotensas y espontáneamente hipertensas. In *Departamento de Farmacología. CINVESTAV, México, Tesis Doctoral*.
- Ibarra M-M, R., Lopez-Guerrero JJ & Villalobos-Molina R. (1998). Further Evidence for the predominance of alfa1D-adrenoceptors in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology Review and Communications* **10**, 135-142.
- Ibarra M, Meneses A, Ransanz V, Castillo C & Hong E. (1995). Changes in endothelium-dependent vascular responses associated with spontaneous hypertension and age in rats. *Arch Med Res* **26 Spec No**, S177-183.
- Ibarra M, Pardo JP, Lopez-Guerrero JJ & Villalobos-Molina R. (2000). Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors in contraction. *Br J Pharmacol* **129**, 653-660.
- Ibarra M, Terron JA, Lopez-Guerrero JJ & Villalobos-Molina R. (1997). Evidence for an age-dependent functional expression of alpha 1D-adrenoceptors in the rat vasculature. *Eur J Pharmacol* **322**, 221-224.
- Igarashi M, Hirata A, Yamaguchi H, Tsuchiya H, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M & Kato T. (2001). Candesartan inhibits carotid intimal thickening and ameliorates insulin resistance in balloon-injured diabetic rats. *Hypertension* **38**, 1255-1259.
- Illyes G, Talarico PJ & Simon G. (2000). Different structural vascular changes in angiotensin II-treated and cold-stressed rats. *Am J Hypertens* **13**, 802-809.
- Inagami T. (1995). Recent progress in molecular and cell biological studies of angiotensin receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **4**, 47-54.
- Inoguchi T & Nawata H. (2005). NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* **6**, 495-501.

Ishizaka N, Saito K, Mori I, Matsuzaki G, Ohno M & Nagai R. (2005). Iron chelation suppresses ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2282-2288.

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

Kamikihara SY, Mueller A, Lima V, Akinaga J, Nojimoto FD, Castilho A, Buratini J, Jr. & Pupo AS. (2007). alpha1-Adrenoceptors in proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **376**, 117-126.

Kava MS, Blue DR, Jr., Vimont RL, Clarke DE & Ford AP. (1998). Alpha1L-adrenoceptor mediation of smooth muscle contraction in rabbit bladder neck: a model for lower urinary tract tissues of man. *Br J Pharmacol* **123**, 1359-1366.

Kayanoki Y, Higashiyama S, Suzuki K, Asahi M, Kawata S, Matsuzawa Y & Taniguchi N. (1999). The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding EGF-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 50-55.

Kenakin T. (2004). *A Pharmacology Primer*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA.

Kenakin TP. (1984). The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev* **36**, 165-222.

Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC & Naylor AM. (1995). Characterization of an alpha 1D-adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br J Pharmacol* **115**, 981-986.

Kerins DM, Hao Q & Vaughan DE. (1995). Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* **96**, 2515-2520.

Kim S & Iwao H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* **52**, 11-34.

Ko EA, Amiri F, Pandey NR, Javeshghani D, Leibovitz E, Touyz RM & Schiffrin EL. (2007). Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1789-1795.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP & Walther T. (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* **111**, 1806-1813.

- Kramkowski K, Mogielnicki A & Buczko W. (2006). The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol* **57**, 529-539.
- Kumar R, Singh VP & Baker KM. (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* **18**, 208-214.
- Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE & Ford AP. (1997). Pharmacological characterization of an alpha 1A-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br J Pharmacol* **120**, 819-826.
- Landon EJ & Inagami T. (2005). Beyond the G protein: the saga of the type 2 angiotensin II receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 15-16.
- Lever AF. (1986). Slow pressor mechanisms in hypertension: a role for hypertrophy of resistance vessels? *J Hypertens* **4**, 515-524.
- Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaut E, Safar ME & Struijker-Boudier HA. (2008). Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* **118**, 968-976.
- Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U & Unger T. (2005). Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *Faseb J* **19**, 617-619.
- Li Q, Dale WE, Hasser EM & Blaine EH. (1996). Acute and chronic angiotensin hypertension: neural and nonneural components, time course, and dose dependency. *Am J Physiol* **271**, R200-207.
- Lund AK, Goens MB, Kanagy NL & Walker MK. (2003). Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol* **193**, 177-187.
- Majewski H, Hedler L, Schurr C & Starke K. (1984). Modulation of noradrenaline release in the pithed rabbit: a role for angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* **6**, 888-896.
- Marin J. (1993). Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol* **13**, 127-176.
- Marti D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, Baretino D & D'Ocon P. (2005). Correlation between mRNA levels and functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of alpha1L as a functional isoform of the alpha1A-adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1923-1932.
- McCune DF, Edelmann SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, Perez DM & Piascik MT. (2000). Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol* **57**, 659-666.

- McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E & Daly CJ. (2005). New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* **90**, 469-475.
- Mehta PK & Griendling KK. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C82-97.
- Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C & Esbenshade TA. (1994). Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **46**, 929-936.
- Mulvany MJ. (2008). Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput* **46**, 461-467.
- Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL & Heistad DD. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension* **28**, 505-506.
- Muramatsu I, Murata S, Isaka M, Piao HL, Zhu J, Suzuki F, Miyamoto S, Oshita M, Watanabe Y & Taniguchi T. (1998). Alpha1-adrenoceptor subtypes and two receptor systems in vascular tissues. *Life Sci* **62**, 1461-1465.
- Muramatsu I, Ohmura T, Kigoshi S, Hashimoto S & Oshita M. (1990). Pharmacological subclassification of alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **99**, 197-201.
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T & Sraer JD. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* **109**, 1417-1427.
- Olaiz G RJ, Shamah T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M. . (2006). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición pp. 80-81. Instituto Nacional de Salud Pública - SSA, Mexico.
- Oriowo MA, Bevan JA & Bevan RD. (1987). Variation in sensitivity of alpha adrenoceptor-mediated contraction of the vascular smooth muscle of rabbit elastic and muscular arteries is related to receptor affinity. *J Pharmacol Exp Ther* **241**, 239-244.
- Padia SH, Howell NL, Siragy HM & Carey RM. (2006). Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. *Hypertension* **47**, 537-544.
- Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Siragy HM, Fournie-Zaluski MC, Roques BP & Carey RM. (2007). Intrarenal aminopeptidase N inhibition augments natriuretic responses to angiotensin III in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. *Hypertension* **49**, 625-630.
- Pares-Hipolito J, Gomez-Zamudio JH, Gallardo-Ortiz IA, Lopez-Guerrero JJ, Santamaria-Ortiz J, Ibarra M & Villalobos-Molina R. (2006). Selective agonists reveal alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenoceptor subtypes in caudal artery of the young rat. *Auton Autacoid Pharmacol* **26**, 371-378.

Parker SB, Wade SS & Prewitt RL. (1998). Pressure mediates angiotensin II-induced arterial hypertrophy and PDGF-A expression. *Hypertension* **32**, 452-458.

Paul M, Poyan Mehr A & Kreutz R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* **86**, 747-803.

Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Jr. & Perez DM. (1995). The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **275**, 1583-1589.

Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW & Brown RD. (1997). Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 854-868.

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

Ramracheya RD, Muller DS, Wu Y, Whitehouse BJ, Huang GC, Amiel SA, Karalliedde J, Viberti G, Jones PM & Persaud SJ. (2006). Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia* **49**, 321-331.

Ran J, Hirano T & Adachi M. (2004). Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E227-232.

Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K & Adachi M. (2006). Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism* **55**, 478-488.

Risler N, Miatello R & Cruzado M. (2002). La pared vascular en la hipertensión. *Rev Fed Arg Cardiol* **31**, 315-320.

Rubenstein EyF, DD. (1992). *Hipertensión Arterial*

Ruffolo RR, Jr. (1982). Review important concepts of receptor theory. *J Auton Pharmacol* **2**, 277-295.

Ruiz-Ortega M, Esteban V & Egidio J. (2007). The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 19-25.

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V & Egidio J. (2003). Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep* **5**, 73-79.

- Salomonsson M, Brannstrom K & Arendshorst WJ. (2000). alpha(1)-adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F138-147.
- Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT & Ferreira AJ. (2006). Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* **47**, 996-1002.
- Santos RA & Ferreira AJ. (2007). Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **16**, 122-128.
- Santos RA, Ferreira AJ & Simoes ESAC. (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* **93**, 519-527.
- Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, Lahera V & Cachofeiro V. (2005). Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H111-115.
- Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S & Pauletto P. (2001). Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* **89**, 1111-1121.
- Satoh M, Enomoto K, Niwano H, Fujimura H, Toyama Y, Takayanagi I & Koike K. (1998). Regional differences in alpha1-adrenoceptor subtypes and mechanisms in rabbit arteries. *Eur J Pharmacol* **350**, 67-73.
- Savoia C & Schiffrin EL. (2006). Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**, 152-158.
- Saxena PR. (1992). Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J Cardiovasc Pharmacol* **19 Suppl 6**, S80-88.
- Scofield MA, Liu F, Abel PW & Jeffries WB. (1995). Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther* **275**, 1035-1042.
- Scheuer DA. (2008). Pathways to hypertension. *J Physiol* **586**, 5033.
- Schiffrin EL. (2008). The flame that lights the fire: oxidative stress, inflammation, and renal damage in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* **52**, 205-206.
- Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD & Touyz RM. (2000). Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* **101**, 1653-1659.
- Schiffrin EL, Thome FS & Genest J. (1984). Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension* **6**, 682-688.

- Schiffrin EL & Touyz RM. (2004). From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H435-446.
- Schulze-Bauer CA, Regitnig P & Holzapfel GA. (2002). Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H2427-2440.
- Simon G, Cserep G & Limas C. (1995). Development of structural vascular changes with subpressor angiotensin II administration in rats. *Am J Hypertens* **8**, 67-73.
- Simon G & Csiky B. (1998). Effect of neonatal sympathectomy on the development of structural vascular changes in angiotensin II-treated rats. *J Hypertens* **16**, 77-84.
- Simon G, Illyes G & Csiky B. (1998). Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure, and time. *Hypertension* **32**, 654-660.
- Stam WB, Van der Graaf PH & Saxena PR. (1999). Analysis of alpha 1L-adrenoceptor pharmacology in rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **127**, 661-670.
- Stanasila L, Perez JB, Vogel H & Cotecchia S. (2003). Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J Biol Chem* **278**, 40239-40251.
- Suzuki S, Takata Y, Kubota S, Ozaki S & Kato H. (1994). Characterization of the alpha-1 adrenoceptors in the mesenteric vasculature from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats: studies on vasoconstriction, radioligand binding and postreceptor events. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 576-583.
- Takata Y & Kato H. (1996). Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life Sci* **58**, 91-106.
- Takayanagi I, Onozuka S & Koike K. (1991). Variation in sensitivity of alpha 1-adrenoceptor stimulants and alpha 1-adrenoceptor mechanisms in rabbit arteries. *Jpn J Pharmacol* **55**, 513-522.
- Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S & Tsujimoto G. (2002). The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest* **109**, 765-775.
- Testa R, Destefani C, Guarneri L, Poggesi E, Simonazzi I, Taddei C & Leonardi A. (1995). The alpha 1d-adrenoceptor subtype is involved in the noradrenaline-induced contractions of rat aorta. *Life Sci* **57**, PL159-163.
- Testa R, Guarneri L, Poggesi E, Angelico P, Velasco C, Ibba M, Cilia A, Motta G, Riva C & Leonardi A. (1999). Effect of several 5-hydroxytryptamine(1A) receptor ligands on the micturition reflex in rats: comparison with WAY 100635. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 1258-1269.

Touyz RM. (2000). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **2**, 98-105.

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

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

Touyz RM & Briones AM. (2011). Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res* **34**, 5-14.

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

Uberti MA, Hall RA & Minneman KP. (2003). Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. *Mol Pharmacol* **64**, 1379-1390.

Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM & Husain A. (1990). Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* **66**, 883-890.

Urata H, Nishimura H & Ganten D. (1996). Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens* **9**, 277-284.

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

Vicentic A, Robeva A, Rogge G, Uberti M & Minneman KP. (2002). Biochemistry and pharmacology of epitope-tagged alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 58-65.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A & Tummino P. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* **277**, 14838-14843.

Villalobos-Molina R & Ibarra M. (1996). Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol* **298**, 257-263.

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

Villalobos-Molina R & Ibarra M. (2005). Increased expression and function of vascular alpha1D-adrenoceptors may mediate the prohypertensive effects of angiotensin II. *Mol Interv* **5**, 340-342.

Villalobos-Molina R, Lopez-Guerrero JJ & Ibarra M. (1997). Alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur J Pharmacol* **322**, 225-227.

Villalobos-Molina R, Lopez-Guerrero JJ & Ibarra M. (1999). Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **126**, 1534-1536.

Villalobos-Molina R, Vazquez-Cuevas FG, Lopez-Guerrero JJ, Figueroa-Garcia MC, Gallardo-Ortiz IA, Ibarra M, Rodriguez-Sosa M, Gonzalez FJ & Elizondo G. (2008). Vascular alpha-1D-adrenoceptors are overexpressed in aorta of the aryl hydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Auton Autacoid Pharmacol* **28**, 61-67.

Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM & Schiffrin EL. (2004). Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* **22**, 535-542.

Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H & Luft FC. (1999). Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* **103**, 945-952.

Wang LJ, Ma H, Liao XX, He JG, Zhang WW, Tian F, Cai YM, Gu HB, Hao YH, Hu XS, Zou HM & Zhou QL. (2008). [An experimental study of expression of angiotension converting enzyme 2 in myocardium and effect of telmisartan treatment in pressure-overloaded rats]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* **20**, 218-222.

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

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

Williams GHaB, E. . (1994). *Harrison's Internal Medicina*

Williams TJ, Blue DR, Daniels DV, Davis B, Elworthy T, Gever JR, Kava MS, Morgans D, Padilla F, Tassa S, Vimont RL, Chapple CR, Chess-Williams R, Eglen RM, Clarke DE & Ford AP. (1999). In vitro alpha1-adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel alpha1A-adrenoceptor selective antagonists. *Br J Pharmacol* **127**, 252-258.

Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA & Law RE. (1999). Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 73-82.

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

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

Zacharia J, Hillier C & Macdonald A. (2004). Pharmacological characterization of alpha1-adrenoceptors in mouse isolated femoral small arteries. *Eur J Pharmacol* **503**, 155-163.

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

Zhou L & Vargas HM. (1996). Vascular alpha 1D-adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. *Eur J Pharmacol* **305**, 173-176.

Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD & D'Ocon P. (2002). Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in conductance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H475-481.

Zimmerman BG. (1981). Adrenergic facilitation by angiotensin: does it serve a physiological function? *Clin Sci (Lond)* **60**, 343-348.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P & Llorens-Cortes C. (1996). Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11968-11973.

Zwart AS, Davis EA & Widdop RE. (1998). Modulation of AT1 receptor-mediated contraction of rat uterine artery by AT2 receptors. *Br J Pharmacol* **125**, 1429-1436.